

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire de domiciliation Laboratoire Biologie, Eau et Environnement (LBEE)

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT EN 3^{ème} CYCLE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

ALIOUECHE KARBOUA Keltoum

Intitulée

**Analyse structurale et activités anti-inflammatoire et anti-oxydante des
polysaccharides extraits d'*Anacyclus pyrethrum*.**

Soutenue le : 13/03/2022

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. BENOURETH Djamel Eddine	Pr.	Univ. de Guelma	Président
Mme. BENDJEDDOU Dalila	Pr.	Univ. de Guelma	Encadreur
Mme. GRARA Nedjoud	Pr.	Univ. de Guelma	Examinatrice
Mme. KHALDI Fadhila	Pr.	Univ. de Souk-Ahras	Examinatrice
Mme. DAHAMNA Saliha	Pr.	Univ. de Sétif	Examinatrice

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

Louange absolue à ALLAH, le créateur généreux et omnipotent, le tout puissant, maître des cieux et de la terre qui nous a garni la santé et la force durant toutes ces années.
Louange absolue à ALLAH, pour sa miséricorde, sa grâce et pour tous ses dons et ses faveurs accordés nous ont permis de mener à bien ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement :

Ma directrice de thèse, Mme. Bendjeddou Dalila
Professeur au département de Biologie à la Faculté SNV - STU
de l'université de Guelma 8 Mai 1945.

Je suis heureuse et honorée de votre encadrement, merci pour le thème proposé. Je vous remercie vivement pour votre esprit critique et votre rigueur en matière de rédaction. Merci pour ces nombreuses heures de lecture et pour votre patience dans la correction. Sans vous ce travail n'aurait pu aboutir, merci également pour les conseils prodigués et pour l'intérêt porté à ce sujet.

Les membres du jury,
Pr. Benouareth Djamel Eddine (Université de Guelma)
Pr. Grara Nedjoud (Université de Guelma)
Pr. Khaldi Fadhila (Université de Souk-Ahras)
Pr. Dahamna Saliha (Université de Sétif)

Vous nous faites l'honneur en faisant partie de ce jury de thèse. Nous vous en sommes sincèrement reconnaissants. Nos vifs remerciements à vous pour votre témoignage. Merci pour votre présence.

Le personnel des laboratoires pédagogiques et de recherche de l'université de Guelma, et plus particulièrement Leila, et Ghaliaoui Nora ingénieur au laboratoire de recherches au CRAPC de Boussmail. Le personnel de laboratoire d'anatomie-pathologique à l'hôpital Ibn Zôhr (Guelma). Dr. Boutaouche et Dr. Zaàboub de Skikda

Merci pour l'accueil, pour les conseils. Les manipulations se sont passées à l'amiable. Merci pour les aides techniques si précieuses. Soyez assurés de notre profonde reconnaissance.

Tous nos enseignants de la première année théorique et surtout Mr. Bousbia Issam, Mr. Benguettaf Mohamed, Mme. Alioui Nora et Mr. Djerrou Zoheir de l'université de Skikda

Qui ont déployé leurs efforts pour nous faire profiter de leurs vastes connaissances et leurs conseils fructueux et judicieux, un grand merci à vous.

Mes parents Tarek et Souad et ma sœur Firdaous

Avec leur patience, leurs sacrifices et encouragements, j'ai pu continuer cette expérience scientifique. Ils ont cru en moi, et ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études. Merci beaucoup à vous.

*A la fin, j'exprime mes profondes reconnaissances à ma sœur **Chaima** et mes frères **Islam** et **Adlene**, à mon futur mari **Abdelhamid Bousnane**, mes amis et plus particulièrement **Ibtisem Boussouf**, mes confrères **Demba Sanogo** et **Houdou Diarra**, qui m'ont aidé d'un sourire, d'une critique, d'un encouragement ou d'un service pour tous les sacrifices consentis, et à toute la promo de doctorat de biochimie appliquée 2016 parrainée par **Pr. Grara Nedjoud**, à qui nous devons une grande reconnaissance de nous avoir offert cette opportunité, Merci.*

Et à la fin Je dédie ce travail scientifique à :

Mes chers parents Tarek et Souad.

Keltoum

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Physiopathologie de l'inflammation respiratoire

1.1. Anatomie et histologie du système respiratoire	4
1.2. Le système immunitaire respiratoire.....	5
1.2.1. L'immunité innée.....	6
1.2.2. L'immunité adaptative.....	6
1.3. La réaction inflammatoire	7
1.4. Les pathologies inflammatoires respiratoires.....	8
1.4.1. La rhinite allergique ou rhume des foins	8
1.4.2. L'asthme.....	9
1.4.3. Les pneumonies.....	9
1.4.4. Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)	9
1.4.5. Les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)	10
1.5. Agents exogènes provoquant des inflammations respiratoires	10
1.5.1. Les allergènes (pneumallergènes)	10
1.5.2. Les virus.....	11
1.5.3. Les bactéries	11
1.6. Les acteurs de la réaction inflammatoire.....	12
1.6.1. Les acteurs cellulaires.....	12
1.6.2. Les acteurs chimiques	14
1.7. Les différentes phases de l'inflammation respiratoire.....	15
1.7.1. Phase de sensibilisation et immunisation	15
1.7.2. Phase effectrice	16
1.7.3. Phase de résolution inflammatoire.....	16
1.8. Traitement anti-inflammatoire.....	17

1.8.1. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)	17
1.8.2. Glucocorticoïdes.....	17

Chapitre 2. Phytopharmacologie d'*Anacyclus pyrethrum*

2.1. Phytothérapie et utilisation de plantes médicinales	19
2.2. Description botanique, taxonomie et nomenclature d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	20
2.3. Habitat et culture d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	21
2.4. Etude phytochimique d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	22
2.5. Usage traditionnelle d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	23
2.6. Toxicité et activités thérapeutiques d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	24
2.6.1. Activité immunostimulante.....	24
2.6.2. Activité anticancéreuse.....	24
2.6.3. Activités sur le système nerveux.....	25
2.6.4. Activité antidiabétique.....	25
2.6.5. Activité anti-oxydante.....	25
2.6.6. Activité hépato-protectrice.....	26
2.6.7. Activité spermatogène.....	26
2.6.8. Activité Antimicrobienne	26

Chapitre 3. Aperçus sur les polysaccharides

3.1. Généralités sur les polysaccharides	28
3.1.1. Définition.....	28
3.1.2. Structure et nomenclature.....	28
3.1.3. Classification des polysaccharides.....	29
3.1.3.1. Selon les fonctions biologiques.....	29
3.1.3.1.1. Les polysaccharides de structure ou PS pariétaux.....	29
3.1.3.1.2. Les polysaccharides de réserve.....	29
3.1.3.2. Selon les origines.....	30
3.1.3.2.1. Les polysaccharides d'origine végétale.....	30
3.1.3.2.2. Les polysaccharides d'origine animale.....	31
3.1.3.2.3. Les polysaccharides d'origine microbienne (bactérienne et fongique)...	32
3.1.4. Propriétés physico-chimiques des polysaccharides.....	33

3.2. Activités biologiques des polysaccharides.....	33
3.2.1. Activité immunomodulatrice	34
3.2.2. Activité anti-inflammatoire.....	34
3.2.3. Activité anticancéreuse et anti-tumorale.....	35
3.2.4. Activité anti-oxydante.....	36
3.2.5. Activité anticoagulante.....	37
3.2.6. Activité antivirale et antibactérienne.....	37
3.2.7. Autres activités.....	38
3.3. Méthodes d'extraction et de caractérisation structurale des polysaccharides.....	39
3.3.1. Extraction et purification des polysaccharides.....	39
3.3.2. Caractérisation structurale des polysaccharides.....	40
3.3.2.1. Hydrolyse de liaisons glycosidiques.....	40
3.3.2.2. Méthodes chromatographiques.....	41
3.3.2.3. Méthodes spectrales.....	42

Partie II. Etude expérimentale

Chapitre1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal	43
1.2. Extraction des polysaccharides	43
1.3. Fractionnement de l'extrait polysaccharidique par précipitation	45
1.4. Model animal	47
1.5. Tests <i>In Vivo</i>	49
1.5.1. Formule leucocytaire sanguine.....	49
1.5.2. Lavage nasal (LN)	49
1.5.3. Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	50
1.5.4. Détermination du poids relatif de la rate et du nombre de cellules spléniques	50
1.5.5. Examen d'histopathologie des poumons et des surrénales.....	51
1.6. Activité anti-oxydante des PST et des fractions polysaccharidiques d'Ap	51
1.7. Caractérisation structurale des polysaccharides d'Ap	53
1.7.1. Par microscopie électronique à balayage (MEB)	53
1.7.2. Par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FTIR)	53
1.7.3. Purification de la fraction active.....	54
1.7.4. Détermination des monosaccharides constitutifs.....	54

1.7.5. Détermination des liaisons glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	55
1.8. Analyse statistique	56

Chapitre 2. Résultats et discussion

2.1. Le rendement de l'extraction des polysaccharides.....	57
2.2. Effet du traitement avec les polysaccharides totaux (PST) d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	57
2.2.1. Effet sur la formule leucocytaire sanguine	57
2.2.2. Effet sur le nombre de cellules du LN et LBA	61
2.2.3. Effet sur le poids relatif de la rate et sur le nombre de splénocytes	64
2.2.4. Effet sur l'aspect macroscopique et microscopique des poumons	67
2.3. Effet du traitement avec les fractions polysaccharidiques d'Ap (F1et F2)	70
2.3.1. Effet sur la formule leucocytaire sanguine	70
2.3.2. Effet sur le nombre de cellules du LN et du LBA	73
2.3.3. Effet sur le poids relatif de la rate et sur le nombre de splénocytes	76
2.3.4. Effet sur l'aspect macroscopique et microscopique des poumons	78
2.3.5. Effet sur l'aspect microscopique des glandes surrénales	82
2. 4. Activité antioxydante des PST et des fractions polysaccharidiques F1 et F2 d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> : pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP)	84
2.5. Caractérisation structurale des polysaccharides d'Ap	86
2. 5. 1. Par microscopie électronique à balayage (MEB)	86
2. 5. 2. Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	87
2.5.3. Purification de la fraction active.....	88
2.5.4. Détermination des monosaccharides constitutifs.....	89
2.5.5. Détermination des liaisons glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	90

Conclusion et perspectives.....	93
--	-----------

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AAPM : Acétates d'Alditols Partiellement Méthylés

Abs : Absorbance

AChE : Acétylcholine Estérase

ACTH : Hormone Corticotrope Hypophysaire

ADN : Acide Désoxy –Ribonucléique

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens

AIS : Anti-Inflammatoire Stéroïdiens

Ap : *Anacyclus pyrethrum*

ARN : Acide Ribo-nucléique

BALT : Bronchiol Associated Lymphoid Tissue

BHT : Butylated hydroxytoluène

BPCO : Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstructives

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDs : Cellules Dendritiques

CEP : Cellules d'Exsudats Péritonéaux

CES : Chromatographie d'Exclusion Stérique

CGP : chromatographie sur Gel Perméable

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COVID - 19 : Corona Virus Disease – 2019

COX : Cyclo-oxygénases

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CRF : Cortico Tropin Releasing Factor

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns

Der p : *Dermatophagoides pteronyssinus*

DL₅₀ : Dose Létale à 50%

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : Diphénylpicrylhydrazyle

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

F1 : Fraction 1

F2 : Fraction 2

FcεRI : Récepteur de haute affinité d'IgE

Foxp3 : Fork head box protein 3

FPLC : Fast Performance Liquid Chromatography

FRAP: Ferric-Reducing Antioxidant Power

FTIR : Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

Glc : Glucose

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GOLD : Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease

HDL: High Density Lipoproteins

HDM : House Dust Mite

HE : Hématoxyline Eosine

HHS : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HMQC : Heteronuclear Multiquantum Coherence

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

hsp : heat shock protein

I.p : Intra-péritonéale

IFN-γ : interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

Il : Interleukine

iNOS : inductible NO Synthétase

IR : Infrarouge

LBA : Liquide Bronchoalvéolaire

LDH : High Density Lipoproteins

LDL: Light Density Lipoproteins

LN : Liquide Nasal

LPS : Lipopolysaccharides

LTh: Lymphocytes T helper

LTreg : Lymphocytes T régulateurs

LTs : Lymphocytes T

MCP- 1 : Monocyte Chemotactic Protein -1

MEB: Microscope Electronique à Balayage

MM : Masse molaire

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NKT : Natural Killer T Cells

NO : Nitric Oxide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns

PARs : Protease Activated Receptors

PBS : Phosphate Buffered Saline

PGs : Prostaglandines

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

PNs : Polynucléaires

PRR : Poids Relatif de la Rate

PRRs : Pattern-Recognition Receptors

PS : Polysaccharides

PSA : Polysaccharides Acides

PST : Polysaccharides Totaux

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

SARS-CoV 2 : Syndrome Respiratoire Aigüe Sévère-CoronaVirus 2

SD : Standard Déviation

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe

SEM : Scanning Electron Microscopy

SGOT : Sérum Glutamooxaloacétate Transférase

SGPT : Sérum Glutamate Pyruvate Transaminase

SRE : Système Réticulo-Endothélial

TCR : T Cell Receptor

TGF-β : Tumor Growth Factor-β

TLR : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

Tpm : Tours par minutes

TPTZ : Tripyridyl-s-triazine

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	La taxonomie d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	20
2	Détermination de monosaccharides constitutifs du PS. <i>Ap</i> par CPG après méthanolyse.	90

Liste des figures

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Les structures anatomiques des voies respiratoires	4
02	Physiologie inflammatoire induite par un allergène	8
03	Rôle des LTreg dans le contrôle la réponse inflammatoire	17
04	Les différentes parties d' <i>Anacyclus pyrethrum</i>	21
05	Structure de la cellulose	30
06	Structure ramifiée du glycogène	31
07	Structure du dextrane	32
08	(A) Les racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> , (B) la poudre des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> obtenue après séchage et broyage.	43
09	(A) Les polysaccharides totaux d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> , (B) Fraction 1, (C) Fraction 2	44
10	Les étapes d'extraction des polysaccharides à partir des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .	45
11	Les étapes de fractionnement des polysaccharides d' <i>Anacyclus Pyrethrum</i> .	46
12	Le protocole expérimental des tests <i>in vivo</i> .	48
13	(A) Instillation nasale des souris avec l'allergène HDM, (B) Ampoule d'HDM ; <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (<i>Der p</i>).	49
14	Droite d'étalonnage du sulfate de fer pour le test FRAP.	53
15	Le rendement de l'extraction des polysaccharides des racines d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> .	58
16	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de leucocytes.	60
17	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre des sous populations leucocytaires (monocytes, neutrophiles, lymphocytes).	61
18	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de cellules du LN (Liquide nasal).	62
19	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de cellules du LBA (Liquide bronchoalvéolaire).	63
20	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le poids relatif de la rate	65
21	Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de splénocytes.	66
22	Effet des PST d'A.p sur l'aspect macroscopique des poumons.	69
23	Effet des PST d'A.p sur l'aspect microscopique des poumons.	70

24	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de leucocytes sanguines.	71
25	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre des neutrophiles et des lymphocytes sanguins.	72
26	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de cellules du liquide nasal (LN).	74
27	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de cellules du liquide bronchoalvéolaire (LBA).	75
28	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le poids relatif de la rate (PRR).	77
29	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de splénocytes.	78
30	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect macroscopique des poumons.	80
31	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect microscopique des poumons.	81
32	Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect microscopique des glandes surrénales.	84
33	Pouvoir antioxydant réducteur du fer des PST et des fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) en comparaison avec le BHT.	85
34	Morphologie des polysaccharides d'Ap observés au MEB x 3000: (A) PST, (B) F1 et (C) F2.	87
35	Le spectre infrarouge des PST et des fractions F1 et F2 d'Ap	88
36	Purification de la fraction F1 d' <i>Anacyclus pyrethrum</i> sur chromatographie de filtration sur gel.	89
37	Analyse par GC après méthylation du polysaccharide pur PS.Ap.	91
38	Analyse par MS après méthylation du polysaccharide pur PS.Ap.	92

Introduction

Les infections respiratoires sont des causes majeures de mortalité et de morbidité dans le monde entier **(Alonso, 2008)**, elles représentent la troisième cause de décès dans le monde après les troubles vasculaires cardiaques et encéphaliques, cependant, dans les pays à faible statut économique, elles occupent la première place **(Brown, 1982)**. Ces infections sont particulièrement graves chez les enfants et les patients atteints de déficits immunitaires **(Alonso, 2008)**.

Toutes les classes de micro-organismes, y compris les virus, les bactéries, les champignons, les parasites et les protozoaires, sont capables d'infecter les voies respiratoires **(Denny, 1995)**. En outre, les acariens *Dermatophagoides sp.*, principaux constituants de la poussière de maison (HDM : House Dust mite) et qui se retrouvent en forte concentration dans la literie, les moquettes, les tapis, sont la cause de 65 à 90 % des asthmes de l'enfant et de l'adulte jeune **(Alonso, 2008)**.

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique affectant environ 235 millions de personnes dans le monde, ses complications mortelles sont le résultat de tempêtes inflammatoires pures et simples dues à une réaction extrême du système immunitaire, c'est pourquoi de nombreuses études tentent de tester des produits qui réduisent cette réaction **(Ababsa et Aouissi, 2020)**.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine chimique, physique, biologique ou infectieuse **(Sanchez, 2006)**. Elle pourrait également être initiée par le stress oxydatif, qui se définit comme une surproduction de molécules oxydantes: les ROS induisant la libération de cytokines et l'activation d'enzymes pro-inflammatoires impliqués dans le processus inflammatoire **(Manouze et al., 2017)**. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours **(Burmester et Pezzutto, 2000)**, ce qui incite les scientifiques à rechercher et développer d'agents immunomodulateurs naturels présentant une toxicité tolérable ou faible dans les applications cliniques.

Il est connu que les médicaments issus de produits naturels provoquent moins d'effets secondaires que les autres drogues synthétiques **(Piao et al., 2019)**. Sur le plan thérapeutique, des herbes médicinales aux propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices, antimicrobiennes et/ou analgésiques sont utilisées pour traiter les infections aiguës et les

troubles inflammatoires (**Hart, 2005**). En outre, plusieurs rapports ont montré que l'activité thérapeutique de différents extraits de plantes supérieures peut être médiée par une interaction avec le système immunitaire de l'hôte (**Bendjeddou et al., 2003**). Des études d'ethnobotanique et d'ethnopharmacologie ont prouvé que des extraits végétaux enrichis en polysaccharides ont longtemps été utilisés en phytothérapie, par divers groupes culturels, et particulièrement en Afrique (**Angone et al., 2010**). Plusieurs polysaccharides sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire, ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutiques, notamment des propriétés anti-tumorales et anti-inflammatoires (**Sanchez, 2006**).

Les polysaccharides représentent l'un des composés organiques les plus courants dans le règne végétal (**Singh, 2011**), ils représentent le composant majeur de la paroi cellulaire végétale (90%) participant à la défense, la régulation et la rigidité des cellules végétales (**Edwige et al., 2014**). Ils sont les biopolymères naturels les plus abondants, et récemment ils ont attiré plus d'attention en tant que substances applicables dans différents domaines biomédicaux, car ils présentent plusieurs avantages par rapport aux autres polymères synthétiques; ils sont économiques, stables, hydrophiles, biocompatibles, biodégradables et non cytotoxiques (**Mohammed et al., 2021**).

Pendant des siècles, la médecine traditionnelle en Algérie a utilisé les racines d'*Anacyclus pyrethrum* pour traiter les infections respiratoires, elles sont également utilisées pour stimuler les glandes salivaires, guérir le catarrhe chronique de la tête et des narines et nettoyer le cerveau en stimulant la libre circulation des muqueuses nasales, des larmes et stimuler le flux sanguin vers les tissus (**Bendjeddou et al., 2003**). Ils peuvent également être utilisés dans le traitement de l'épilepsie, de la paralysie, de la sciatique, de la névralgie, des maux de dents, des rhumatismes et du rhume (**Usmani et al., 2016**). Cette plante est indigène en Algérie, au Maroc et en Espagne (**Jawhari et al., 2020**), connue sous le nom de *Guenthous* par les Algériens (**Fourment et al., 1942**), *Akarkara* dans le système de médecine ayurvédique et *Pellitory* dans la médecine occidentale (**Thakur et al., 2012**). Elle possède des propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes (**Bendjeddou et al., 2003 ; Wu et al., 2007**), ainsi qu'un potentiel anti-inflammatoire et antioxydant (**Müller et al., 1993 ; Sujith et al., 2011**).

L'extraction à l'eau chaude a été largement utilisée comme méthode conventionnelle pour la préparation des polysaccharides, en raison des avantages dominants, tels que simple et économique (**Jin et al., 2012**). Pour cette raison, nous nous sommes intéressés dans ce travail aux polysaccharides extraits à l'eau chaude à partir des racines d'*Anacyclus pyrethrum* afin d'étudier leur potentiel antioxydant via le test FRAP, et anti-inflammatoire (*In vivo*) sur un modèle murin d'allergie respiratoire à l'HDM (*Der p*), et d'explorer leurs caractérisations chimiques et structurales après fractionnement et purification, par différents outils analytiques (FTIR, MEB, CPG..). Dans ce contexte, ce document sera présenté en deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique, elle aborde les points essentiels à la compréhension du sujet, elle est subdivisée en trois chapitres ; le premier décrit la physiopathologie de la réponse inflammatoire respiratoire, le deuxième illustre l'aspect botanique et pharmacologique de la plante étudiée, et le troisième c'est un aperçu général sur les polysaccharides.
- La deuxième partie est une étude expérimentale, elle englobe deux chapitres ; le premier décrit le matériel ainsi que les différentes méthodes utilisées pour achever nos recherches, le deuxième chapitre illustre les résultats obtenus ainsi que leur discussion, et enfin on a terminé avec une conclusion et des perspectives.

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

Physiopathologie de

l'inflammation respiratoire

1.1. Anatomie et histologie du système respiratoire

Le système respiratoire permet les échanges gazeux entre l'air ambiant et la circulation sanguine, en extrayant l'oxygène (O_2) de l'air et en y rejetant le gaz carbonique (CO_2). Cette fonction est assurée par l'action de trois compartiments fonctionnelles (**Figure 01**): des voies de conduction, des surfaces respiratoires et un appareil ventilatoire (**Boulet, 2013**). L'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx : les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures.

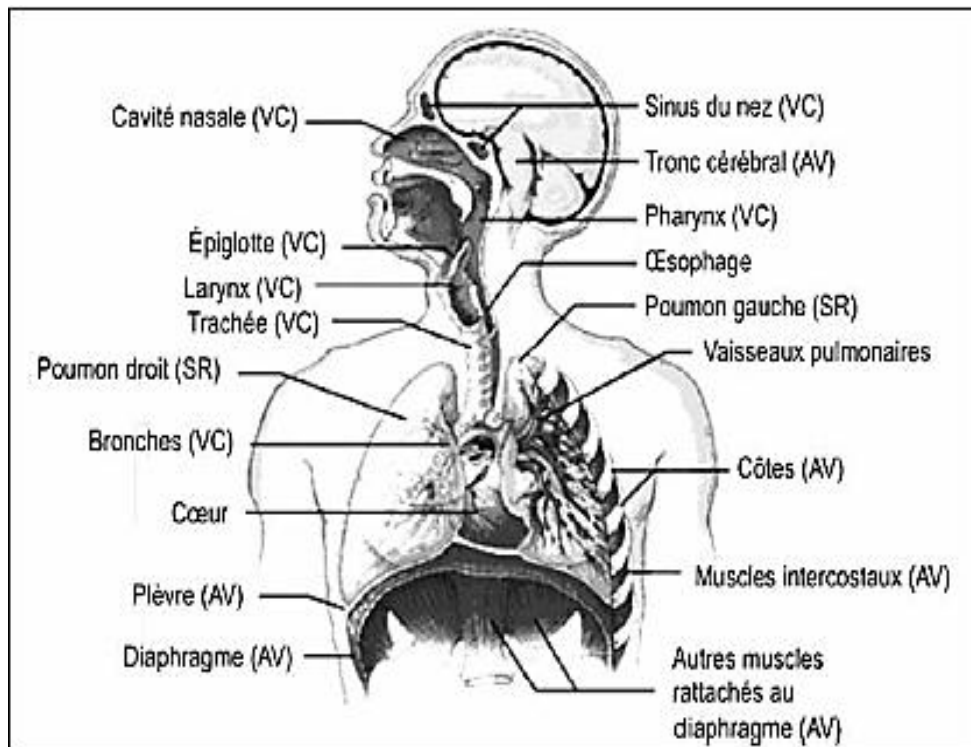


Figure 01: Les structures anatomiques des voies respiratoires (**Boulet, 2013**).

VC (voies de conduction), SR (surfaces respiratoires), AV (appareil ventilatoire)

- Les voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures permettent d'acheminer l'air jusqu'au poumon, ils comprennent une série de cavités communicantes: le nez, les fosses nasales, et le rhinopharynx. Ces voies, formées de structures tubulaires flexibles, filtrent, humidifient et règlent la température de l'air inspiré (**Galmès et al., 2014**).

- Les voies aériennes inférieures

C'est l'appareil broncho-pulmonaire, qui commence par le larynx, continue par la trachée dans le thorax, pour se diviser en deux bronches souches. Ces dernières se divisent en bronches lobaires, et qui vont successivement se diviser deux par deux pour terminer dans les alvéoles, on parle ainsi de dichotomie bronchique. Les alvéoles pulmonaires sont le siège des échanges gazeux, grâce à leur contact étroit avec les capillaires pulmonaires (**Galmès et al., 2014**).

La structure histologique de la paroi des voies aériennes est formée de différentes couches : muqueuse, musculuse, glandulaire et cartilagineuse, dont la composition et la répartition varient de la trachée à la bronchiole afin de s'adapter au mieux au diamètre des voies aériennes et à leur fonction. Cette structure est très bien adaptée à la conduction car elle permet d'associer rigidité, flexibilité et extensibilité (**Galmès et al., 2014**).

L'épithélium respiratoire est le même de la trachée aux bronches terminales, seules son épaisseur et la répartition des cellules varient. Il est principalement composé de 5 types de cellules : les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules basales, les cellules neuroendocrines, les cellules de Clara (**Galmès et al., 2014**).

1.2. Le système immunitaire respiratoire

Le tractus respiratoire possède un système immunitaire très élaboré, à la partie supérieure, le tractus trachéobronchique prolonge le naso-oropharynx en conservant le même type d'épithélium cylindrique sécrétoire pseudo-stratifié, et comporte des formations lymphoïdes constituant le tissu lymphoïde associé aux bronches BALT (*bronchiol associated lymphoid tissue*). L'alvéole pulmonaire possède une paroi constituée de pneumocytes de type 1 et de type 2, de macrophages résidents, de cellules dendritiques plasmocytoïdes, de cellules T et est couverte d'un film comportant de nombreux produits protégeant les cellules et aux fonctions microbicides, tels que le surfactant et la phospholipase A2 (**Alonso, 2008**).

La protection du système respiratoire contre les différents agents infectieux (virus, bactéries, champignons) contenus dans l'air inhalé, fait appel à deux groupes de mécanismes: l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Fridja-Masson, 2015**).

1.2.1. L'immunité innée

Elle constitue la première ligne de défense vis-à-vis des agents microbiens. Elle est caractérisée par sa mise en jeu immédiate et fait intervenir des mécanismes « non spécifiques » qui peuvent être constitutifs, comme la barrière épithéliale, ou très rapidement inductibles, comme la réponse inflammatoire (**Guillon, 2016**).

Les cellules épithéliales ciliées et les cellules sécrétrices de mucus constituent un ascenseur mucociliaire permettant l'élimination mécanique de la majorité des pathogènes pulmonaires. L'étanchéité de l'épithélium respiratoire est aussi une barrière de défense efficace, elle est assurée par quatre principaux types de complexes jonctionnels intercellulaires: les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les jonctions communicantes et les desmosomes (**Galmès et al., 2014**). Les anticorps locaux (IgA et IgG) constituent une autre barrière efficace s'opposant à l'implantation, la prolifération et la dissémination des micro-organismes avec un ratio IgA/IgG variable selon que l'on se situe au niveau du tractus respiratoire supérieur ou des alvéoles pulmonaires (**Denis et al., 2007**). La réponse immunitaire innée met en jeu des récepteurs spécifiques, les PRRs (*pattern recognition receptors*) qui reconnaissent des « signaux de danger » : soit des motifs associés aux micro-organismes, les PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), soit des signaux endogènes dérivés de cellules endommagées, les DAMPs (*damage associated molecular patterns*) (**Guillon, 2016**).

1.2.2. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative ou acquise nécessite un contact préalable avec l'agent microbien en cause et fait intervenir les lymphocytes B, T et NKT (**Fridja-Masson, 2015**). Cette réaction spécifique se manifeste par la production des anticorps spécifiques, et par la mise en place des mécanismes de phagocytose immune et de lyse microbienne complément-dépendante (**Alonso, 2008**). Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, par la synthèse de plusieurs types d'anticorps ou immunoglobulines (IgA, D, E, G et M) (**Fridja-Masson, 2015**). Les Lymphocytes T sont responsables de l'immunité à médiation cellulaire, leur activation est induite par l'interaction entre leur TCR (*T cell receptor*) et des antigènes spécifiques présentés par les monocytes ou les cellules dendritiques, sous forme de peptides associés aux molécules du CMH (**Tanga, 2012**).

1.3. La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire ou l'inflammation est une réaction complexe du système immunitaire inné (**Galmès et al., 2014**), c'est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression (**Rousselet et al., 2005**). Elle forme un ensemble de phénomènes réactionnels qui se produisent en un point donné, en réponse à des dommages cellulaires ou tissulaires, causés par une infection (virus, bactérie, parasites, champignons), des agents physiques (traumatisme, chaleur, froid, radiations) ou des agents chimiques (toxines, venins) (**Galmès et al., 2014**). Son but est de protéger l'organisme contre les agressions, et de faciliter le retour à l'homéostasie et la réparation du tissu contaminé (**Sanchez, 2006**). Les réponses immunitaires adaptatives locales peuvent également être mobilisées afin de réguler l'inflammation (**Galmès et al., 2014**).

Le processus inflammatoire comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement par de la fièvre ou par une altération de l'état général, et par des phénomènes locaux ; rougeur, chaleur, œdème et douleur (**Rousselet et al., 2005**), résultant de la dilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration de cellules et de certaines molécules du sang vers les tissus enflammés (**Iwalewa et al., 2007**). Plusieurs molécules (les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines (PGs) et l'oxyde nitrique (NO), ainsi que plusieurs types de cellules (les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes T), jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire (**Figure 02**), qui peut-être aiguë ou parfois chronique (**Sanchez, 2006**).

- **L'inflammation aiguë** : est un processus rapide et réversible, elle se caractérise par l'exsudation de fluides et de protéines plasmatiques ; et la migration des leucocytes, plus particulièrement des neutrophiles dans la zone lésée. Cette réponse vise à tuer les bactéries, les virus et les parasites tout en facilitant la réparation des plaies.

- **L'inflammation chronique** : est une réaction plus prolongée, elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années, elle se manifeste histologiquement par la présence de lymphocytes et de macrophages, entraînant une fibrose et une nécrose tissulaire. L'inflammation chronique persistante augmente le développement des maladies dégénératives telles que : la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'asthme, le cancer, le diabète... (**Iwalewa et al., 2007**).

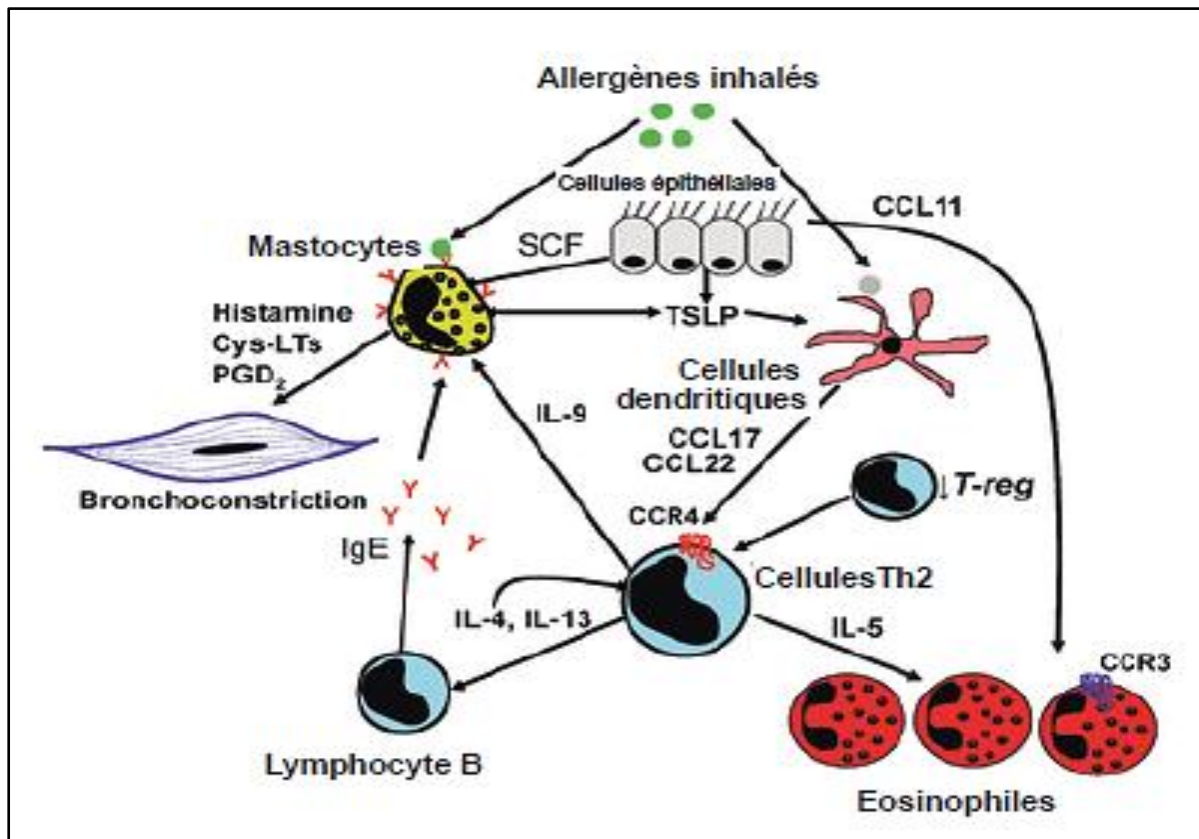


Figure 02 : Physiologie inflammatoire induite par un allergène (Michaud, 2013).

1.4. Les pathologies inflammatoires respiratoires

La réaction inflammatoire, présente une fonction protectrice en contrôlant les infections et en favorisant la cicatrisation des tissus, elle pourrait être aussi à l'origine de lésions tissulaires causant différentes maladies des voies aériennes supérieures et inférieures (Sanchez, 2006) :

1.4.1. La rhinite allergique ou rhume des foins

La rhinite allergique est une inflammation chronique de la muqueuse nasale, c'est une maladie très fréquente touchant environ 30 % de la population (Berthélémy, 2011). Suite à un contact avec les allergènes, elle est également précédée par une phase de sensibilisation où des molécules d'IgE spécifiques des allergènes se fixent sur les mastocytes. Des éternuements et une sécrétion nasale se produisent, 30 à 60 secondes après l'inhalation de l'allergène (Burmester et Pezzutto, 2000). Par la suite, elle entraîne l'apparition d'autres symptômes (congestion nasale bilatérale, prurit palatin et nasal, conjonctivite), qui peuvent avoir des

répercussions sur le sommeil, les activités courantes, ainsi que la vie professionnelle et affective (**Berthélémy, 2011**).

1.4.2. L'asthme

L'asthme est une maladie respiratoire touchant 5 à 10% de la population et en constante progression au cours des dernières décennies (**Virgine, 2012**). C'est un trouble inflammatoire chronique caractérisé par une obstruction réversible des voies aériennes, une hyperréactivité bronchique et une inflammation bronchique en réponse à des stimuli inhalés (allergènes, polluants atmosphériques ou domestiques, virus) (**Tanga, 2012**), cinquante à 85% des asthmatiques sont allergiques aux acariens (**Michaud, 2013**). L'asthme est une maladie multifactorielle résultant d'interactions entre de multiples facteurs génétiques et environnementaux, il a été classiquement divisé en asthme allergique (extrinsèque) et non allergique (intrinsèque), en fonction de la présence d'IgE spécifiques dirigées contre des pneumallergènes (**Létuvé et Taillé, 2013**).

Cette inflammation est secondaire à un infiltrat de cellules inflammatoires, en particulier les mastocytes et les éosinophiles, qui vont stimuler la production d'endothélines par les cellules endothéliales, qui vont engendrer une hyperplasie des muscles lisses, une réaction de broncho-constriction et de vasoconstriction, une hypersécrétion de mucus et la production de NO, qui vont conduire à différents symptômes : toux, oppression thoracique et dyspnée (**Galmès et al., 2014**).

1.4.3. Les pneumonies

Les pneumonies sont caractérisées par une atteinte inflammatoire d'origine infectieuse des structures profondes des poumons (bronchioles et alvéoles). L'infection peut être d'origine virale (virus grippal), bactérienne (*Streptococcus pneumoniae*), et parfois fongique (*Histoplasma capsulatum*) ou parasitaire (*Pneumocystis carinii*). La pathologie peut évoluer vers un syndrome de détresse respiratoire aigüe si la réaction inflammatoire n'est pas contrôlée (**Tanga, 2012**).

1.4.4. Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)

Le SDRA est une inflammation pulmonaire aigüe et persistante qui a pour conséquence une chute radicale de la compliance pulmonaire et de la capacité d'échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolo-capillaire (**Galmès et al., 2014**). C'est la forme la

plus sévère de l'atteinte parenchymateuse aigüe. Il survient à la suite d'une agression pulmonaire directe, le plus souvent d'une pneumonie bactérienne ou d'une agression pulmonaire indirecte, la septicémie (**Tanga, 2012**).

1.4.5. Les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)

Les BPCO (bronchite chronique, emphysème) sont des pathologies caractérisées par une réduction progressive, non réversible des débits respiratoires, associée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires (**Galmès et al., 2014**). Elle se définit comme : « une atteinte pulmonaire caractérisée par une obstruction bronchique qui est en partie irréversible ». L'obstruction bronchique est habituellement d'évolution progressive et est associée à une réponse inflammatoire pulmonaire anormale aux gaz et aux particules Inhalés *GOLD (global initiative for chronic obstructive lung disease)* (**Tanga, 2012**). Cette inflammation chronique pulmonaire, est due à l'accumulation de macrophages, de LT, notamment de LT CD8+ et de neutrophiles (**Galmès et al., 2014**).

1.5. Agents exogènes provoquant des inflammations respiratoires

De nombreux agents d'agression, comme les micro-organismes (bactéries, virus, allergènes), sont véhiculés par l'air ambiant et peuvent pénétrer dans les voies aériennes, et provoquer des inflammations respiratoires :

1.5.1. Les allergènes (pneumallergènes)

- **Les acariens** : sont des organismes minuscules d'environ 0,3 mm de longueur, invisibles à l'œil nu, et ils font partie de la famille des arachnides. Il existe plus de 50 000 espèces d'acariens identifiées (**Michaud, 2013**). Sur notre territoire, deux espèces coexistent appartenant à la famille des pyroglyphides : *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* (**Borry, 2018**). Ces acariens sont retrouvés par millions dans notre environnement intérieur, et sont les principaux constituants de la poussière de maison qui se retrouvent en forte concentration dans la literie, les moquettes, les tapis, les coussins ou les peluches (**Berthélémy, 2011**). Ils sont à l'origine de maladies allergiques telles que l'asthme, la rhinite ou encore la dermatite atopique.

Les allergènes des acariens sont pour la plupart issus de la salive et d'enzymes du tractus digestif, on les retrouve donc dans les particules fécales. Un gramme de poussière peut contenir jusqu'à 10 000 acariens (**Borrry, 2018**).

- **Les pollens** : sont responsables de l'allergie pollinique. La fréquence de la sensibilisation aux pollens est importante : 20 % des sujets allergiques présenteraient au moins un test positif aux pollens (**Berthélémy, 2011**).

- **Les moisissures** : sont des champignons dont l'humidité et des températures élevées sont propices à leur croissance, les principaux sont : *Aspergillus*; présents dans l'atmosphère, les céréales en stockage, la farine ou la poussière de maison, *Penicillium*; retrouvé toute l'année dans le sol, les denrées, les végétaux en décomposition, et *Cladosporium*....

- **Les aliments et les médicaments** : certains médicaments (l'aspirine ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS, les β -bloquants), et certains aliments (l'œuf, le poisson, le lait, l'arachide, surtout chez l'enfant, ou les mollusques chez l'adulte), peuvent également être responsables d'allergie respiratoire même si, en fréquence, les autres manifestations allergiques prédominent (urticaire, œdème, choc, ...) (**Berthélémy, 2011**).

1.5.2. Les virus

Les virus sont des parasites, ils utilisent en effet la machinerie protéique et le métabolisme des sucres de l'hôte, afin de se multiplier puisqu'ils en sont dépourvus (**Hallouet, 2010**). Certains virus à ARN qu'à ADN colonisent les voies aériennes supérieures et inférieures, et sont responsables d'une large proportion des pneumonies, comme le SARS-CoV-2 qu'est un virus hautement contagieux, il provoque une infection respiratoire aigüe nommée le COVID-19, et elle a causé plus de 2,2 millions de décès (**Lone et Ahmad, 2020**). Trois types de virus influenza INF (A, B et C) peuvent être distingués en fonction de leurs déterminants antigéniques spécifiques, peuvent causer une maladie respiratoire aigüe (**Galmès et al., 2014**).

1.5.3. Les bactéries

Chez des sujets sains, les voies respiratoires inférieures ne sont pas colonisées par des bactéries, bien que nos voies aériennes soient continuellement exposées à ces micro-organismes. Les bactéries invasives et pathogènes développent des mécanismes d'échappement à l'immunité naturelle (**Hallouet, 2010**). Certaines bactéries comme

Streptococcus pneumoniae et *Haemophilus influenzae*, sont la cause principale des pneumonies typiques. *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), est l'une des causes la plus commune d'infection pulmonaire opportuniste dans les milieux hospitalier et communautaire (Galmès *et al.*, 2014).

1.6. Les acteurs de la réaction inflammatoire

1.6.1. Les acteurs cellulaires

- **Les cellules épithéliales** : les cellules épithéliales bronchiques forment une barrière mécanique vis-à-vis des agents extérieurs, et en réponse aux allergènes, ils sont capables de produire des médiateurs chimio-attractants, tels l'éotaxine qui assure le recrutement des lymphocytes Th2 et des éosinophiles, le MCP- 1 (*monocyte chemotactic protein*), attractant des monocytes/macrophages, et l'IL-8 qui stimule le recrutement des neutrophiles (Létuvé et Taillé, 2013).

- **Les cellules dendritiques** : les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes, capables de migrer rapidement dans les ganglions lymphatiques, ce qui leur confère un rôle majeur dans l'initiation de la réponse locale aux antigènes inhalés, ils synthétisent des chimokines qui permettent le recrutement ciblé des cellules immunitaires vers le site d'infection (Létuvé et Taillé, 2013). Les CD immatures expriment de nombreux PRRs, elles possèdent également des récepteurs PARs (*protease activated receptors*) qui leur permettent de reconnaître les allergènes protéolytiques tels que l'allergène d'acarien *Der 1* (Tanga, 2012).

- **Les monocytes et les macrophages** : ces cellules proviennent de cellules souches multipotentes. Les monocytes ne demeurent que 2 ou 3 jours dans la circulation, et se transforment en grandes cellules qui présentent un grand nombre de récepteurs membranaires, ce sont les macrophages tissulaires (Attakpa, 2010). Les macrophages alvéolaires sont les cellules immunitaires résidentes du poumon et représentent la première ligne de défense phagocytaire contre tout agent infectieux. Ils jouent un rôle primordial dans l'immunité du poumon en initiant les réponses inflammatoires et immunitaires, ils possèdent des activités bactéricides et sécrétoires très importantes (Tanga, 2012).

- **Les mastocytes** : sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques et circulent dans le sang comme progénitures immatures avant d'achever leur différenciation dans les tissus muqueux et conjonctifs. Ils sont principalement localisés près des surfaces exposées à l'environnement (**Tanga, 2012**). Ils jouent un rôle majeur dans la phase aiguë du processus inflammatoire, et contribuent également à la production de TNF (*tumor necrosis factor*) dans l'asthme, et donc au recrutement des neutrophiles, des lymphocytes CD4⁺ et des cellules dendritiques (**Létuvé et Taillé, 2013**).

- **Les polynucléaires (basophiles, éosinophiles, neutrophiles)** : les PN sont issues de la lignée granulocytaire. Sur la base de leur aspect cytologique, on distingue les polynucléaires neutrophiles (95 % des polynucléaires circulants) qui assurent essentiellement la phagocytose et la bactéricide (**Attakpa, 2010**). Lors d'une infection, ils sont les premiers types cellulaires recrutés aux sites inflammatoires (**Tanga, 2012**). Les basophiles, comme les mastocytes, participent à l'initiation de l'inflammation allergique, par l'intermédiaire de la fixation des IgE spécifiques sur le récepteur FCεR1 (récepteur de haute affinité aux IgE) (**Létuvé et Taillé, 2013**). Les éosinophiles actives sécrètent de multiples médiateurs cytokiniques (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TGF α/β), des chimokines et des médiateurs lipidiques, qui vont favoriser la prolifération et l'activation des LTs ainsi que la polarisation des lymphocytes T auxiliaires (LTh1 et LTh2) (**Tanga, 2012**).

- **Les lymphocytes** : les lymphocytes sont les cellules centrales du système immunitaire. Ils assurent les fonctions essentielles d'identification de l'antigène participant avec les macrophages à la réaction immunitaire qui provoque la neutralisation et l'élimination des agents étrangers (**Tanga, 2012**). Les lymphocytes Th dites auxiliaires ou « helper », sont caractérisés par l'expression de la molécule CD4 (**Attakpa, 2010**). Suite à une stimulation antigénique, ces cellules se différencient en : LTh1, LTh2 et LTh17 (**Bettelli et al., 2007**). Les lymphocytes Th1 ont été décrits comme les cellules orchestrant la réponse inflammatoire dans l'asthme allergique. Une fois activées, ces cellules migrent vers le site de l'inflammation où elles peuvent être restimulées par des CD activées (**Virgine, 2012**). Ils sécrètent l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-25, qui sont essentielles pour la génération de classes appropriées d'anticorps et pour l'élimination des agents pathogènes extracellulaires (**Bettelli et al., 2007**). Les LTh17 produisent de l'IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 et TNF, et participent à la défense contre les pathogènes extracellulaires, et ils majorent l'inflammation éosinophile bronchique induite par les antigènes (**Létuvé and Taillé, 2013**).

- **Les lymphocytes T régulateurs** : les LTreg constituent 5 à 10% des lymphocytes CD4⁺ de la périphérie. Ces cellules expriment le facteur de transcription Foxp3 (*Fork head box protein 3*), et la molécule CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) (**Pham Van, 2010**), qui permet la déplétion des lymphocytes T auto-réactifs. Ils sont alors définis par leur fonction immunosuppressive plus que par leur profil de sécrétion cytokinique. Ils inhibent en particulier la prolifération des lymphocytes CD4⁺ induite par l'allergène ainsi que leur production d'IL-5 (**Létuvé and Taillé, 2013**).

1.6.2. Les acteurs chimiques

- **Les cytokines et les chimokines** : parmi les différentes cytokines inflammatoires, l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF (*tumor necrosis factor*), sous leur action, de nombreuses cellules produisent des médiateurs lipidiques, des enzymes protéolytiques, des radicaux libres et des chimokines, impliqués dans l'entretien du processus inflammatoire. Des cytokines, telles que l'IL-3 ou le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) amplifient la réponse inflammatoire en augmentant les productions d'IL-1 et de TNF par les macrophages. Les chimiokines constituent une famille de petites protéines, de masse molaire comprise entre 8 et 12 kDa, ils ont la capacité à recruter et à activer les cellules circulantes sur les sites inflammatoires (**Cavaillon et Adib Conquy, 2009**). L'IL-8 est une chimokine importante pour l'activation des neutrophiles et des macrophages (**Pham Van, 2010**).

- **Les oxydants dérivés de l'oxygène et de l'azote** : les macrophages pulmonaires alvéolaires produisent au cours des infections, des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), du monoxyde d'azote (NO) qui peuvent participer à la réponse inflammatoire. L'O₂ et le NO s'associent pour former le peroxi-nitrite (ONOO) qui peut avoir un effet apoptotique sur les cellules épithéliales (**Tanga, 2012**). Le NO régule également les mouvements ciliaires et la perméabilité vasculaire, Il agit comme un frein sur la broncho-constriction dépendant du système cholinergique. Le NO exhalé pourrait être considéré comme un index de l'inflammation des voies aériennes (**Pham Van, 2010**).

- **Les médiateurs lipidiques** : ils jouent un rôle primordial dans les effets précoces de l'inflammation. Au cours des processus inflammatoires, l'IL-1 et le TNF induisent la néo-synthèse de la phospholipase A2 (**Cavaillon et Adib Conquy, 2009**). Cette enzyme produit

à partir des phospholipides membranaires de l'acide arachidonique, qui sert de substrat pour la production des eicosanoides : leucotriènes, thromboxanes, prostacyclines et prostaglandines.

On distingue deux iso-enzymes, COX1 et COX2. L'enzyme COX1 se charge de la production de prostaglandines avec des fonctions physiologiques importantes : régulation de la résistance vasculaire périphérique, protection de la muqueuse gastrique à l'aide d'une production accrue de mucus, augmentation de la sensibilité des récepteurs à la douleur, dilatation des bronches. Sous l'influence d'un stimulus inflammatoire tel que des endotoxines ou de l'IL-1, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et synoviales produisent l'enzyme COX2 qui est ainsi responsable d'une synthèse accrue de prostaglandines lors d'une réaction inflammatoire (**Burmester et Pezzutto, 2000**).

- **Les amines vaso-actifs (l'histamine)** : l'histamine est sécrétée essentiellement par les basophiles et les mastocytes. Elle a une propriété broncho-constrictrice puissante par son action directe sur les récepteurs H1 exprimés sur les cellules musculaires lisses. Elle entraîne aussi une extravasation vasculaire également dépendante des récepteurs H1, et par conséquent, un œdème muqueux qui participe à l'obstruction bronchique (**Pham Van, 2010**).

1.7. Les différentes phases de l'inflammation respiratoire

Au cours des infections respiratoires, et lorsque les premières lignes de défense sont altérées, une réponse inflammatoire sera mise en place afin de protéger l'hôte contre l'agent étranger (**Tanga, 2012**). Elle se déroule en deux étapes suivies d'une étape de résolution de l'inflammation et réparation tissulaire :

1.7.1. Phase de sensibilisation et immunisation

Cette phase est cliniquement muette, le sujet est asymptomatique. Les antigènes sont pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), puis, ils sont présentés via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) aux lymphocytes T CD4 naïfs au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les LTCD4 vont alors se différencier en lymphocytes capables d'engendrer une réponse immunitaire humorale de type Th2. Ces cellules synthétisent des interleukines (IL-4, IL-10, IL-13) qui entraînent la production d'IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B. C'est l'IL-4 qui induit la maturation des LB en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques de l'allergène, ils se fixent sur les mastocytes,

les macrophages et les polynucléaires basophiles et éosinophiles, via le fragment FcεRI (**Borrry, 2018**).

1.7.2. Phase effectrice

Elle est appelée également phase de révélation clinique (réaction à la suite d'une réexposition à l'allergène). Cette phase est cliniquement symptomatique et elle se déroule en deux étapes :

- **Une réaction immédiate** : survenant après quelques minutes, caractérisée par l'activation des mastocytes et des basophiles par un allergène via les récepteurs à l'IgE et menant à la libération de médiateurs (**Deslee et al., 2004**). Ces médiateurs (tryptases, histamine...) sont stockés dans les granulations. La dégranulation mastocytaire est à l'origine de symptômes immédiats potentiellement très sévères (œdème, érythème, bronchospasme, anaphylaxie) en favorisant le phénomène d'inflammation par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la survenue d'une broncho-dilatation (**Borrry, 2018**).

- **Une réaction inflammatoire retardée** : survenant après 4 à 6 heures, caractérisée par une infiltration de la muqueuse par différentes cellules (lymphocytes, éosinophiles, basophiles, macrophages) responsables de l'inflammation de la sous-muqueuse et diminuant le calibre des voies aériennes (**Deslee et al., 2004**).

1.7.3. Phase de résolution inflammatoire

Lorsque les antigènes sont éliminés, la réponse inflammatoire va diminuer d'intensité. La résolution de l'inflammation résulte d'un ralentissement progressif du recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire. Elle est caractérisée par un équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires secrétées par les tissus et les neutrophiles actifs (**Tanga, 2012**). Cet équilibre va diminuer l'expression des intégrines au niveau des cellules endothéliales, ce qui va permettre de diminuer le recrutement des différents leucocytes. Les neutrophiles présents sur le site vont entrer en apoptose et vont être éliminés par phagocytose par les macrophages. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques va alors entraîner une vive diminution de la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-8 et le TNF-α par les macrophages, participant ainsi à la résolution de l'inflammation (**Galmès et al., 2014**). Aussi, durant ce processus les capacités de dégranulation et de phagocytose des PN sont atténuées (**Tanga, 2012**).

Les LTreg participent par le contrôle de la réponse immunitaire en inhibant l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices de diverses cellules cibles dont les lymphocytes effecteurs, les CPA et les cellules de l'immunité innée.

Elles produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et expriment des molécules inhibitrices telles que CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*), elles diminuent l'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 par les CPA (**Figure 03**) (**Michaud, 2013**).

Durant cette phase les glucocorticoïdes surrénaliens sont induits indirectement par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF qui stimulent l'axe neuroendocrinien, aboutissant à la production de CRF (*Cortico tropin releasing factor*) et d'ACTH (Hormone corticotrope hypophysaire) (**Cavaillon et Adib Conquy, 2009**). Les corticoïdes produits sont capables de réduire la synthèse de nombreuses cytokines et chimokines pro-inflammatoires par des mécanismes essentiellement trans-répressionnels via l'inhibition des principaux facteurs de transcription (**Sibilia, 2003**).

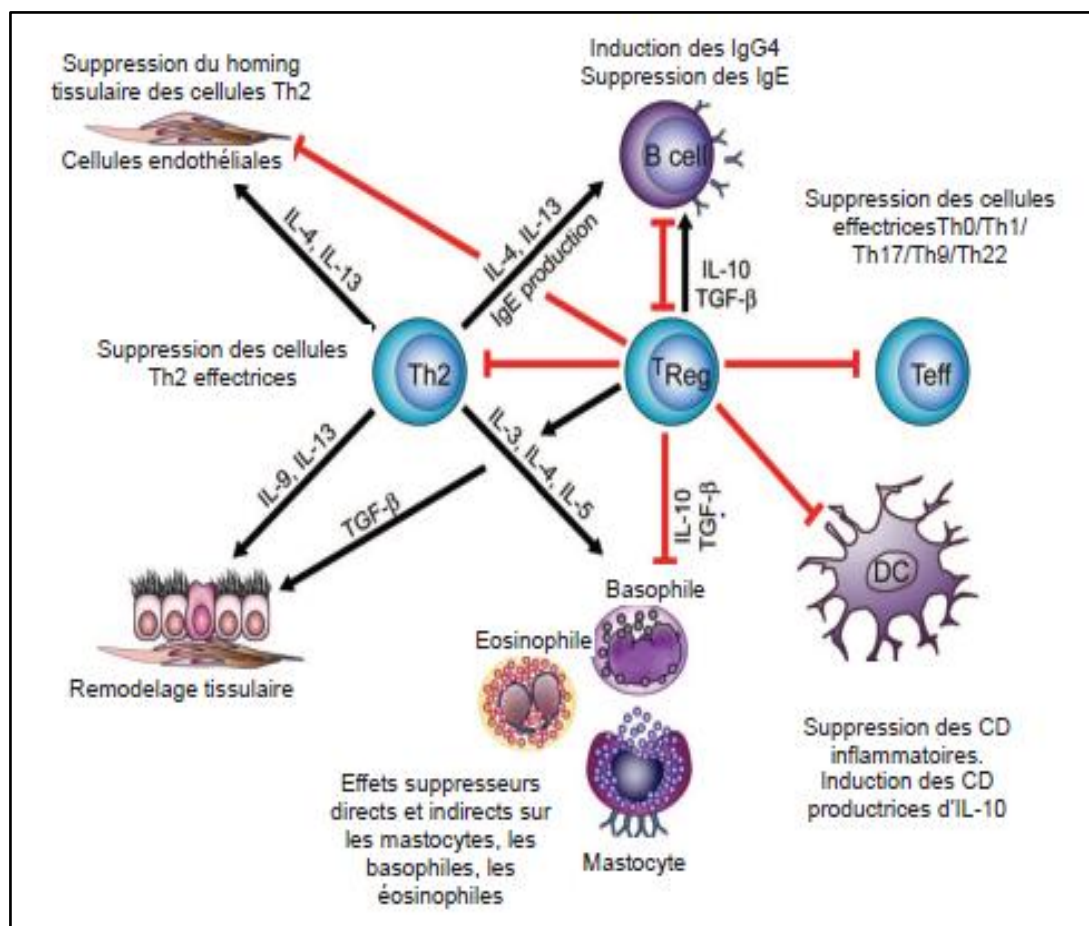


Figure 03 : Rôle des LTreg dans le contrôle la réponse inflammatoire (**Michaud, 2013**).

1.8. Traitement anti-inflammatoire

1.8.1. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS interfèrent dans le métabolisme des prostaglandines à l'aide d'une inhibition des cyclo-oxygénases. Cet inhibition a donc, d'une part, un effet anti-inflammatoire mais inhibe, d'autre part, les effets physiologiques des prostaglandines synthétisées par COX1. L'inhibition de l'enzyme COX1 est responsable de la plupart des effets secondaires, tels que les lésions gastriques qui peuvent entraîner un ulcère. L'inhibition enzymatique peut dans certains cas provoquer une insuffisance rénale et une dysrégulation de la pression artérielle **(Burmester et Pezzutto, 2000)**.

1.8.2. Glucocorticoïdes

Les corticoïdes sont des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS). Ce sont les hormones naturelles synthétisées par des glandes corticosurrénales **(Coumba, 2008)**. Les glucocorticoïdes synthétiques, ont été largement utilisés dans le traitement de diverses affections médicales, où leurs puissants effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires peuvent être souhaitables **(Mogensen, 2009)**. Les glucocorticoïdes interviennent dans le processus inflammatoire et la réponse immunitaire cellulaire de multiples façons : ils inhibent la migration des leucocytes aux foyers inflammatoires, diminuent la production des médiateurs inflammatoires et modulent diverses fonctions effectrices. La plupart des effets reposent sur une modulation de la transcription. Suite à la liaison de l'hormone à son récepteur, ce dernier se détache d'un complexe de protéines de choc thermique hsp (*heat shock protein*) et se lie à certains segments de l'ADN génomique nucléaire appelés « éléments de réponse aux hormones » **(Burmester et Pezzutto, 2000)**.

Les glucocorticoïdes affectent plus de 900 gènes, en inhibant tout particulièrement la transcription de ceux codant pour les cytokines inflammatoires. Notons que les corticoïdes possèdent la capacité d'augmenter l'expression à la surface de divers types cellulaires des récepteurs pour certaines cytokines : par exemple, les récepteurs pour l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-7 à la surface des lymphocytes T, les récepteurs pour le TNF à la surface des monocytes et des cellules épithéliales. En outre, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de la NO synthase, de la NADPH oxydase ou de la cyclo-oxygénase, tout comme ils s'opposent au chimiotactisme **(Cavaillon et Adib Conquy, 2009)**.

Chapitre 2 :

Ethnopharmacologie

*d'*Anacyclus pyrethrum**

2.1. Phytothérapie et utilisation de plantes médicinales

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs : *Phyton*, qui veut dire plante et *Therapeia* qui veut dire thérapie, qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes » **(Jean-Pierre, 2006)**. La phytothérapie reposant sur des remèdes naturels, et le corps humain semble mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapie essentiellement chimique **(Iserin et al., 2001)**, et c'est pour cette raison que l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales contre diverses pathologies a reçu toute l'attention de la communauté scientifique **(Jawhari et al., 2020)**.

Pendant de nombreuses années, les plantes médicinales ont été considérées comme une source prometteuse de matière première essentielle pour la découverte de composés naturels utilisés comme médicaments ultérieurs pour lutter contre les maladies. Les plantes médicinales ont historiquement démontré leur valeur en tant que source épuisable de composés potentiellement bioactifs et représentent encore aujourd'hui un réservoir important pour l'identification de nouveaux médicaments. Au cours des dernières décennies, les plantes médicinales ont été largement utilisées pour lutter contre les maladies dans le monde entier en raison de leur efficacité, de leurs faibles coûts et de leurs effets secondaires limités. Les plantes contiennent une immense variété de molécules bioactives à usage thérapeutique, agroalimentaire et cosmétique **(Jawhari et al., 2020)**.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population de certains pays asiatiques et africains utilisent actuellement des médicaments à base de plantes comme premier moyen de soin **(Srivastava et al., 2015)**, à cause de ses accessibilités géographique, économique et culturelle, faciles ou immédiates **(Nzuki, 2016)**.

En Algérie les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes et cela parce qu'elle bénéficie d'un climat très diversifié. Ces plantes sont considérées comme des remèdes naturels potentiels et peuvent être utilisés en traitement préventif et curatif **(Beloued, 1998)**, citons parmi ces plantes *le pyrèthre d'Afrique* (*Anacyclus pyrethrum*) famille des Asteraceae, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle locale pour le traitement de plusieurs maladies **(Sujith et al., 2012)**.

2.2. Description botanique, taxonomie et nomenclature d'*Anacyclus pyrethrum*

L'espèce *Anacyclus pyrethrum* (synonyme : *Anthemis pyrethrum*) a été définie par Linné et révisée par Link., Il s'agit d'une plante de la famille des astéracées, elle est de 30 cm de haut maximum (**Hamimed, 2009**). C'est une plante herbacée, vivace au tiges ascendantes, ramifiées, plus ou moins poilues dans leur partie supérieure, presque lisse en dessous, et venant de la couronne d'une racine longue, effilée, verticale, brune, légèrement ramifiée, caractérisée par une odeur aromatique et un goût piquant persistant.

Les feuilles sont alternes de couleur vert pâle, celles de la couronne racinaire sont longues pétiolées, et avec de grandes écailles transparentes arrondies sous les fleurs (**Tauheed et al., 2017**). Les fleurs de cette plante sont uniques, c'est la seule plante à avoir une fleur avec un cœur jaune et des pétales blancs à revers rougeâtre rayé de blanc (**Figure 04**), donc il n'y a pas de risque de confusion avec les autres espèces (**Aafi, 2013**). Le stade de floraison s'étend du mois de Mai jusqu'à Septembre (**Selles, 2012b**).

La taxonomie de cette plante est présentée dans (**Tableau 1**). Les noms communs et vernaculaires d'*Anacyclus pyrethrum* sont les suivants :

- **Nom scientifique** : *Anacyclus pyrethrum*.
- **Nom français**: Pyrèthre d'Afrique, La salivaire, Pariétaire d'Espagne.
- **Nom arabe** : Oud Al Attass (le bois sternutatoire), AquirKarha (racine des berbères), Tigenthass, Ignens et Guenthuss فنطس .
- **Nom anglais** : Pellitory, Espagnol Pellitory (**Tauheed et al., 2017**).

Tableau 1: La taxonomie d'*Anacyclus pyrethrum* (**Riaz, 2017**).

Règne	Plantae
Division	Spermatophyta
Sous-division	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Companulatae
Famille	Compositae ou Asteraceae
Genre	<i>Anacyclus</i>
Espèce	<i>Anacyclus pyrethrum</i>

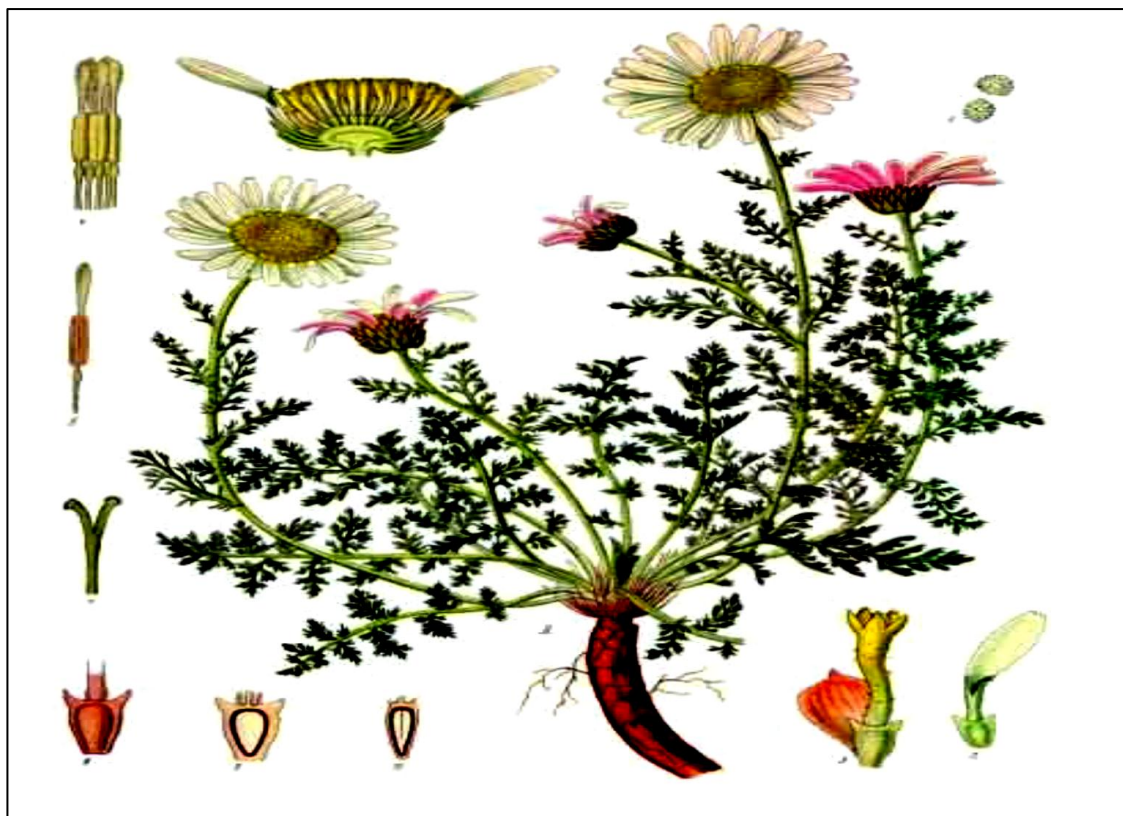


Figure 04: Les différentes parties d'*Anacyclus pyrethrum* (Hamimed, 2009).

2.3. Habitat et culture d'*Anacyclus pyrethrum*

Le genre *Anacyclus* comprend environ 13 espèces annuelles et se concentre essentiellement dans le nord-ouest de l'Afrique mais également présentes dans d'autres pays méditerranéens (Greger, 1978). Le pyrèthre d'Afrique est originaire du littoral méditerranéen, est une plante très répandue au Proche-Orient et au Moyen-Orient et on le cultive en Algérie (Iserin *et al.*, 2001). Cette plante est très commune des hauts plateaux (entre 400 et 3100 m d'altitude) et dans les montagnes du Maroc, d'Algérie et d'Espagne (Ouarghidi *et al.*, 2017). En Algérie, *Anacyclus pyrethrum* est présent dans plusieurs sites; dans les principales chaînes de montagnes de 800 m au-dessus de la mer : Tlemcen, Guelma, Mascara, Constantine et Djurdjura (Daoudi *et al.*, 2014).

Elle est très similaire à la camomille dans l'habitat et l'apparence aussi, et elle se multiplie généralement par graines (Tauheed *et al.*, 2017). Des essais de replantation ont révélé que 23/50 (46 %) morceaux de racines, plantés dans des pots en Août, avaient produit de nouvelles plantes saines en Mai de l'année suivante (Ouarghidi *et al.*, 2017).

Elle a été cultivée à l'échelle expérimentale dans les régions de l'Himalaya à partir de semences importées de l'Algérie (**Bellakhdar, 1998**). Elle se développe dans des prairies ouvertes aux endroits rocheux, et il préfère les sols bien drainés et les expositions ensoleillées.

Il a été répertorié qu'*Anacyclus pyrethrum* est l'une des espèces qui étaient devenues les plus difficiles à obtenir et de plus en plus chères, apparemment en raison de sa rareté dans la nature (**Ouarghidi et al., 2017**).

2.4. Etude phytochimique d'*Anacyclus pyrethrum*

A l'opposé de la chimie des autres espèces du même genre, celle d'*Anacyclus pyrethrum* demeure insuffisamment étudiée. La bibliographie signale que la plante contient une grande quantité de polysaccharides solubles dans l'eau chaude qui se sont avérés être principalement des fructanes de type inuline (**Sharma et al., 2010a**).

L'analyse chromatographique de certains extraits a confirmé la présence de plusieurs composants dans les capitules, les feuilles et les graines, qui pourraient être impliqués dans des activités analgésiques, anti-inflammatoires et cicatrisantes. Vingt composés ont été détectés par GC-MS, et parmi eux, la sarcosine N-(trifluoroacétyl)-butyl ester, l'acide lévulinique, l'acide propanedioïque, l'acide palmitique, la morphinane-6-one, la 4,5 alpha-époxy-3-hydroxy-17-méthyl, 2,4-undécadiène-8,10-diyne-N-tyramide et l'acide isovalérique (**Jawhari et al., 2020**).

Les racines contiennent de l'anacycline, de la pellitorine, de l'alcool énétryne, hydrocaroline, inuline (30 à 50 %), traces d'huile volatile et sésamine, également ils contiennent des amides de tyramine correspondant aux isobutylamides et aux composés polyacétyléniques. La partie corticale de racine contient 5% de pyréthrine (**Tauheed et al., 2017**); c'est un constituant cristallin, incolore, également connu sous le nom de pellitorine. La pellitorine est un alkylamide constitué d'acide undécadiénique ou d'acide nonadiène carboxylique qui possède un goût intensément piquant (**Sharma et al., 2010a**), elle a été isolée en 1895 par Dunstan et Garnett. Ces substances azotées et insaturées sont associées à l'effet sialagogue connu depuis longtemps d'*A.pyrethrum* (**Hamimed, 2009**). Il a été rapporté que la pellitorine avait diverses activités pharmacologiques, notamment des propriétés antiprotozoaires, antiseptiques, antithrombotiques, antituberculeuses, antibactériennes, anticancéreuses et antiplaquettaires et des effets protecteurs de la barrière vasculaire (**Riaz,**

2017). La racine séchée d'A.p contient du Mn ($24,7 \pm 1,51$ g/g), Zn ($22,01 \pm 1,3$ g/g), Cu ($9,5 \pm 0,7$ g/g), Na ($20,13 \pm 4,09$ g/g) et K ($12,13 \pm 0,2$ g/g) (**Tauheed et al., 2017**).

2.5. Usage traditionnelle d'*Anacyclus pyrethrum*

L'utilisation d'*Anacyclus pyrethrum*, plus particulièrement la partie racinaire est décrite dans les pharmacopées de nombreux pays du monde, les racines sont inscrites à la pharmacopée française depuis 1937, pour leurs propriétés sialagogues. La médecine traditionnelle en Algérie utilise depuis des siècles les racines d'A.p pour le traitement des infections respiratoires et dans le traitement des maladies du foie, elle est considéré aussi comme un tonique du système nerveux (**Selles, 2012b**).

L'infusion des racines du pyrèthre d'Afrique est recommandée en bain de bouche contre les maux de dents et les problèmes liés à la sécrétion salivaire comme sialogogue, le décocté des racines est également cité en friction locale en cas de paralysie des membres. Les racines sont également utilisées sous forme de crème à base de graisses animales pour traiter la goutte et la sciatique, un mélange de racines et de lait, additionné de miel est proposé comme aphrodisiaque, contre l'infertilité féminine (**Boulos, 1983**). En faisant décocter les racines dans de l'huile d'olive, on peut préparer un oléate qui sert, en frictions sur la tête, à tuer les poux et la vermine.

Dans le Moyen Atlas, la poudre de cette racine est employée comme antinite. Grâce à leur richesse en vitamine B12 et en Fer, les racines d'A.p purifient le sang, luttent contre l'anémie, et clarifie la vue, il lutte aussi contre les troubles digestifs, le cholestérol et les mucosités (**Selles, 2012b**).

En Inde, elle est couramment utilisée comme stimulant, dans les stades léthargiques de la fièvre typhoïde. Elle est souvent utilisée comme gargarisme et masticateur, dans le cas de l'aphonie, la paralysie de la langue et des muscles de la gorge et dans l'affection névralgique des dents. Elle agit aussi comme un rubéfiant sur la peau car elle est un puissant irritant, et agit également contre la rhinite, tandis que pour l'épilepsie, elle est utilisée en combinaison avec *Withaniasomnifera* et *Vitusvenifera* (**Tauheed et al., 2017**).

2.6. Toxicité et activités thérapeutiques d'*Anacyclus pyrethrum*

Sujith *et al.*, (2012b) ont mené une étude pour évaluer la toxicité sub-chronique de l'extrait éthanolique d'*A.p* chez les rats Albinos, avec une dose de 1000 mg/kg par jour pendant 90 jours par gavage oral, les résultats obtenus ont démontré qu'il y a aucun effet toxicologique de cet extrait sur les paramètres hématologiques et biochimiques testés et qu'il n'y a aucune altération histologique chez les rats, ce qui assure que les racines d'*A.p* peuvent être utilisés sans danger même pour un traitement à long terme. Les valeurs de DL50 de l'extrait de racine chez la souris étaient de 750 mg/kg.

L'*Anacyclus pyrethrum* est largement utilisé dans la pharmacopée traditionnelle de plusieurs populations. Cette plante contient un certain nombre de phytoconstituants qui révèle son utilisation à des fins thérapeutiques différentes. Elle a montré un effet positif sur la régulation du système immunitaire et de certaines fonctions du système nerveux, sur la capacité sexuelle et reproductive des hommes et même sur certaines maladies comme le diabète. On va citer en détails certains travaux scientifiques qui prouvent ces activités pharmacologiques :

2.6.1. Activité immunostimulante

Bendjeddou *et al.*, (2003) ont étudié l'activité immunostimulante de l'extrait polysaccharidiques aqueux des racines d'*A.p* chez les souris. Les fractions obtenus ont démontré une activité stimulante marquée sur le système réticulo-endothélial (SRE) et ont augmenté le nombre de cellules d'exsudats péritonéaux (CEP) et des cellules spléniques de souris. Les résultats obtenus *in vivo* aux doses de 50 et 25 mg/kg, sont plus encourageantes que celles obtenus *in vitro*.

2.6.2. Activité anticancéreuse

Une étude a été menée dans le but d'évaluer l'efficacité d'un extrait d'*A. pyrethrum* sur des lignées cellulaires du cancer colorectal humain. Les résultats indiquent que l'extrait d'*A. pyrethrum* peut induire avec succès l'apoptose de ces cellules (**Mohammadi *et al.*, 2016b**). Une autre étude a testé l'effet cytotoxique et apoptotique de l'extrait éthanolique d'*A. pyrethrum* sur des lignées cellulaires cancéreuses. Le test de la cytotoxicité montre que cet extrait a nettement tué les cellules cancéreuses. Les tests TUNNEL et test de fragmentation

d'ADN indiquent un effet apoptotique caractéristique de l'extrait d'*A.p* chez les cellules traitées. Donc l'extrait éthanolique d'*A.p* est efficace pour induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses et peut être bénéfique pour le traitement du cancer (**Mohammadi et al., 2016a**).

2.6.3. Activités sur le système nerveux

Sujith et al., (2012a) ont évalué l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase in vitro de différents extraits d'*A. pyrethrum*, cette activité améliore la mémoire ainsi que les niveaux d'acétylcholine ce qui augmente la fonction cholinergique surtout pour les patients de la maladie d'Alzheimer. D'après les résultats, parmi les différents extraits testés d'*A.p*, il a été constaté que l'extrait éthanolique indiquait une activité anti-AChE plus élevée que l'extrait chloroformique, donc il a été proposé que les phytoconstituants présents dans l'extrait éthanolique d'*A.p* puissent être isolés pour préparer un médicament idéal pour la maladie d'Alzheimer.

Manouze et al., (2019) ont montré que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique des racines d'*A. pyrethrum* génèrent une activité anticonvulsive chez la souris. De plus, ces deux extraits étaient efficaces pour atténuer l'activation neuronale et la neuroinflammation causées par l'injection de l'acide Kainic. Ces résultats permettent de mieux comprendre les actions de ces extraits dans le cerveau et suggèrent que ce composé naturel peut être utile pour produire une protection neuronale dans le cas d'épilepsie et d'autres troubles cérébraux.

2.6.4. Activité antidiabétique

Dans une étude menée par **Tyagi et al., (2011)** dans le but d'évaluer l'activité anti-diabétique d'un extrait racinaire d'*A.p*, sur des rats diabétiques caractérisés par une hyperglycémie induite par l'alloxane, l'administration orale d'une dose de 150 à 300 mg/kg a démontré une diminution du taux élevé de glucose sanguin jusqu'à une valeur à près de la normale.

2.6.5. Activité anti-oxydante

Sujith et al., (2011) ont évalué l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique d'*A. pyrethrum* in vivo et ex-vivo en utilisant différents modèles expérimentaux à différentes concentrations 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml. Cet extrait éthanolique était capable de piéger le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène de manière dose-dépendante.

A partir de ces résultats, ils ont suggéré que le potentiel antioxydant des racines de pyrèthre peut être dû à leurs constituants phytochimiques tels que le phénol, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes.

2.6.6. Activité hépato-protectrice

Une étude a été menée durant 28 jours afin d'évaluer l'effet hépato-protecteur de l'extrait d'*A. pyrethrum* contre l'hépatotoxicité induite par les antituberculeux chez les rats. Les résultats obtenus ont montré une diminution significative de la SGPT, SGOT, LDH, ALP, bilirubine sérique, cholestérol, et le poids relatif du foie, avec une augmentation significative du poids corporel, des taux de protéines totales et d'albumine, en comparaison avec le groupe contrôle, ces résultats étaient également confirmés par les résultats histopathologiques. Cette étude a montré que les racines d'*A. pyrethrum* possèdent des propriétés hépato-protectrices contre l'hépatotoxicité induite par l'isoniazide et la rifampicine chez les rats (**Usmani et al., 2016**).

2.6.7. Activité spermatogène

Une étude de 28 jours effectués sur des rats Wistar pesant 150-180g traités avec une solution d'un extrait éthanolique d'*A. pyrethrum* riche en alkylamide, révèle une augmentation significative du poids corporel, du nombre de spermatozoïdes ainsi que leurs motilité et viabilité, une augmentation de la concentration du testostérone sérique, de l'hormone lutéinisante, ainsi que l'hormone folliculo-stimulante, chez tous les groupes traités avec différentes doses et en comparaison avec le groupe control et le groupe traité avec la testostérone, ce qui confirme que cet extrait a un effet androgène et peut améliorer l'infertilité masculine en améliorant de la spermatogenèse (**Sharma et al., 2010b**).

2.6.8. Activité antimicrobienne

Selles et al., (2012a) ont évalué l'activité antimicrobienne in vitro des extraits d'*A. pyrethrum* contre quelques souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* (Gram positive), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négative). L'extrait méthanolique a montré une activité inhibitrice la plus élevée contre plusieurs souches bactériennes (*Listeria monocytogenes* : 100 %, *Candida albicans* 81 %, *Bacillus cereus* : 69 % et *Staphylococcus aureus* : 66 %) suivi par l'extrait aqueux (*Listeria monocytogenes* : 71 % et *Candida albicans* : 68%).

D'autre part, l'activité d'inhibition de l'extrait chloroformique était la plus faible (< 50 %) contre toutes les souches bactériennes, alors qu'il n'a montré aucun effet sur les deux souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Par conséquent, *Anacyclus pyrethrum* a montré une activité antibactérienne significative et pourrait être considérée comme l'une des sources d'antibiotiques naturels à usage médical.

Chapitre 3 :

Aperçu sur les polysaccharides

3.1. Généralités sur les polysaccharides

3.1.1. Définition

Les polysaccharides sont des biopolymères glucidiques complexes composés d'unités monosaccharidiques, liées entre elles par des liaisons glycosidiques en chaînes linéaires ou ramifiées de différentes longueurs **(Singh, 2011)**. Ils sont également nommés glycanes, leur hydrolyse complète en utilisant des acides ou des enzymes spécifiques, libère leurs monosaccharides ou oligosaccharides constitutifs **(Chouana, 2017)**. Ils sont issus de plusieurs sources, largement présents dans les plantes, les animaux, les micro-organismes et même dans la vie marine **(Li et al., 2017)**.

Les polysaccharides sont parmi les composés organiques les plus répandus dans le règne végétal, où ils jouent un rôle crucial dans les processus vitaux de toutes les plantes. Ils peuvent être divisés en plusieurs grands groupes selon leurs fonctions, à savoir les polymères structuraux, et les polysaccharides de réserve **(Singh, 2011)**. Certains poly- et oligosaccharides peuvent être impliqués dans des processus de communication cellulaire (reconnaissance structurale, régulation de fonctions métaboliques, et mécanismes de défense) **(Chouana, 2017)**.

Leurs propriétés rhéologiques (gélifiantes, stabilisantes, émulsifiantes, épaississantes,...) sont mises à profit dans l'agro-alimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux, etc. Leur biocompatibilité confère à ce groupe de biomolécules de vastes possibilités d'utilisation dans l'industrie, particulièrement dans l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique et médicale **(Delattre, 2005)**. Un grand nombre d'études pharmacologiques ont montré que les polysaccharides sont dotés de propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes, mais aussi anti-tumorales, antioxydante et anti-virales **(Boual, 2009)**. L'isolement, la purification et l'utilisation des polysaccharides dépendent de leurs caractéristiques structurales mais également des matrices biologiques où ils sont présents **(Benaoun, 2017)**.

3.1.2. Structure et nomenclature

Comme indique la définition, la structure des polysaccharides est formée d'enchaînement covalent d'unités de monosaccharide (hexoses et/ou de pentoses) reliées par des liaisons glycosidiques. Leurs structures sont extrêmement variées et complexes, on distinguera les

homopolysaccharides constitués d'un seul type d'oses ou des hétéropolysaccharides constitués de plusieurs oses. Ces polymères peuvent être linéaires comme la cellulose ou également ramifiés comme le glycogène. Les polysaccharides peuvent posséder un ou plusieurs groupements aglycones comme des groupements phosphate, sulfate, amine ou certains acides organiques de type pyruvate, succinate, acétate ou parfois des protéines. On parlera dans ce dernier cas de protéoglycanes quand la quantité de protéines ne dépasse pas en masse 30%. Si plusieurs monosaccharides sont présents au sein de ces structures, c'est l'ose majoritaire suivi du suffixe « ane » qui donne son nom au polysaccharide, les oses minoritaires seront associés ensuite à ce nom (**Benaoun, 2017**).

3.1.3. Classification des polysaccharides

Les polysaccharides peuvent être classés en fonction de leur structure, leur fonction biologique, leur composition chimique, leur solubilité, leurs sources et leurs applications (**Liu et al., 2015**). Dans la présente étude nous nous limiterons de la classification selon leurs fonctions biologiques, et selon leurs origines.

3.1.3.1. Selon les fonctions biologiques

3.1.3.1.1. Les polysaccharides de structure (PS pariétaux)

Ils sont stables et rigides, et confèrent aux cellules, aux organes ou aux organismes une stabilité mécanique, comme la cellulose et la pectine dans le règne végétal, et la chitine dans le règne animal qui constitue la carapace des insectes et des crustacés. Ils ne sont pas assimilables par l'être humain. Ils jouent cependant un rôle important dans l'alimentation humaine : ce sont les fibres alimentaires (**Ruff, 2008**).

3.1.3.1.2. Les polysaccharides de réserve

Sont des ressources caloriques, ils servent au stockage des sucres riches en énergie, comme l'amidon (aussi appelé dans certains cas féculé) dans le règne végétal, et le glycogène dans le règne animal. Ils sont des polymères du glucose qui assure les réserves d'énergie chez les êtres vivants (**Krausz et al., 2013; Ruff, 2008**).

3.1.3.2. Selon les origines

3.1.3.2.1. Les polysaccharides d'origine végétale

- **La cellulose** : est la molécule la plus abondante dans la nature. Chimiquement c'est un homopolysaccharide linéaire formé par l'enchaînement des résidus de D-glucose reliés entre eux par des liaisons osidiques de type β (1-4) (**Figure 05**). C'est le principal constituant de la paroi cellulaire des végétaux où elle s'organise sous la forme des microfibrilles, au niveau de la paroi primaire (**Mkedder, 2013**). Elle se trouve généralement en association étroite avec d'autres polysaccharides (hémicelluloses, la pectine), avec l'eau, la lignine, la cire, les protéines, et les substances minérales. La cellulose est soluble dans les acides minéraux forts, les solutions de complexes métalliques de cuivre, la solution d'hydroxyde de sodium. Elle est complètement hydrolysée en D-glucose, dans des conditions fortement acides (**Singh et al., 2001**).

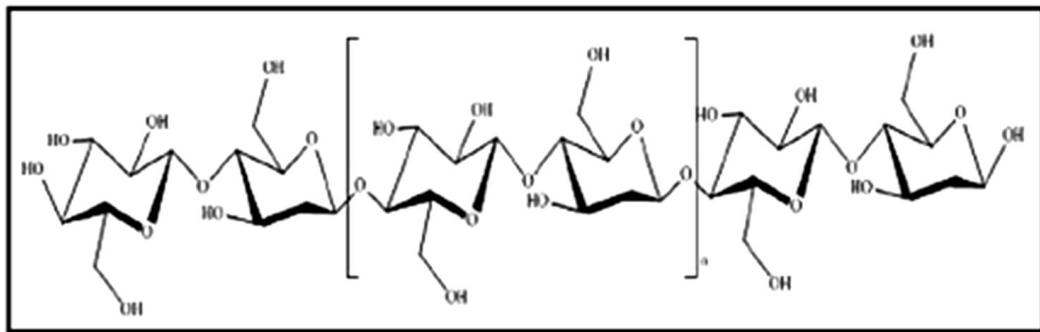


Figure 05 : Structure de la cellulose (**Ummartyotin et Manuspiya, 2015**).

- **L'hémicellulose**: les hémicelluloses sont les biopolymères les plus abondants dans la biosphère après la cellulose, et ils représentent environ 20 à 30 % de la masse de bois. Ils sont majoritairement localisés dans les parois primaires et secondaires. Leur rôle est d'assurer une liaison entre la lignine et la cellulose. Ils ont un poids moléculaire beaucoup plus faible que la cellulose avec un très faible degré de polymérisation. Contrairement à la cellulose, ils sont généralement très solubles dans l'eau (**Singh et al., 2001**). Les hémicelluloses sont des polymères amorphes, constitués de pentoses ou d'hexoses mixtes de sucres neutres (xylose, arabinose, mannose, galactose, glucose) et d'acides uroniques (l'acide glucuronique et l'acide 4-O-méthyl glucuronique), essentiellement. Ils sont classés en quatre grands groupes : Xylanes, Les β -glucanes, les mannanes, xyloglucanes (**Mkedder, 2013**).

- **L'amidon:** c'est le principal polysaccharide de réserve chez les plantes, il se présente sous forme de granules insolubles dans l'eau dans les racines, les graines, les tubercules, les fruits et les tiges de diverses plantes. L'amidon se trouve dans presque toutes les plantes et consiste en un mélange de deux polysaccharides, l'amylose/amylopectine. Le rapport de l'amylose et de l'amylopectine dans l'amidon varie en fonction de la source, de l'âge, etc. Il est dégradé par un certain nombre d'enzymes telles que l'amylase et l'amyloglucosidase (**Singh et al., 2001**).

- **La pectine:** Les pectines sont un groupe de polysaccharides de structure présents dans la plupart des parois cellulaires des plantes terrestres. Deux sources principales de pectines sont le marc de pomme et le zeste d'orange. La pectine se compose principalement de résidus de l'acide galacturonique liés en α (1-4). Elle est soluble dans l'eau et forme des solutions visqueuses (**Singh et al., 2001**).

3.1.3.2.2. Les polysaccharides d'origine animale

- **Le glycogène :** Le glycogène est appelé parfois l'amidon animal, car c'est l'analogue de l'amidon chez les plantes, il a 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 α (1-4) et est branché en α (1-6) tous les 8 ou 12 résidus et une ramification tous les 20 à 30 résidus (**Figure 06**) (**Chouana, 2017**).

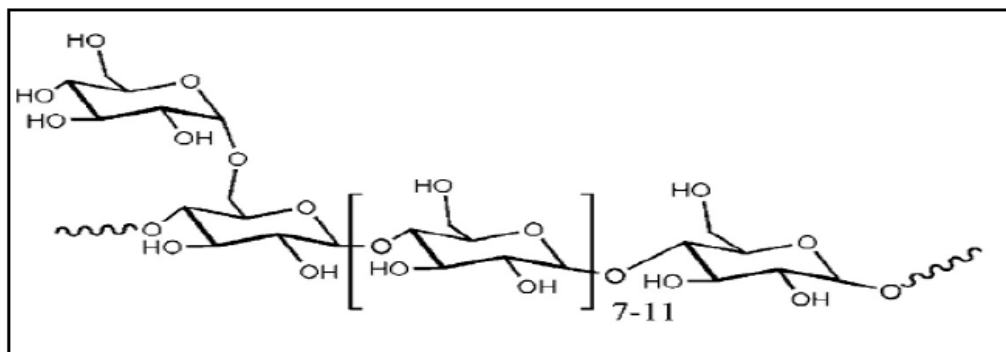


Figure 06 : Structure ramifiée du glycogène (**Pal et al., 2015**).

- **La chitine:** on la trouve chez les mollusques, les insectes, les crustacés, les annélides et chez la plupart des champignons. Ce homopolymère est constitué d'unités β (1-4) N-acétyl-D-

glucosamine. La forme désacétylée de la chitine est connue sous le nom de chitosane. Le chitosane représente un groupe de biopolymères cationiques, qui comprend un homopolymère d'unités β (1-4)-D-glucosamine et tous les copolymères linéaires de β (1-4)-N-acétyl-D-glucosamine (Singh *et al.*, 2001).

- **L'acide hyaluronique** : également appelé hyaluronane, est un polysaccharide de haut poids moléculaire présent dans le corps dans les matrices péri-cellulaires, dans divers fluides corporels et dans des tissus spécialisés tels que le cartilage. Structuralement, il s'agit d'un polydisaccharide contenant de l'acide D-glucuronique et de la N-acétylglucosamine avec des liaisons saccharidiques répétées β (1-3), (1-4) (Falcone *et al.*, 2006).

3.1.3.2.3. Les polysaccharides d'origine microbienne (bactérienne et fongique)

Les micro-organismes produisent une grande variété d'exo-polysaccharides avec des caractéristiques physiques et chimiques uniques.

- **Les dextranes** : ils sont produits par des souches appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Weissella*. Les dextranes sont des polymères de longues chaînes de glucose. Ils sont composés de chaînes principales qui ne contiennent que des unités D-glucopyranose répétées avec des liaisons α (1-6) (Figure 07). Ils peuvent avoir des branches de chaîne latérale qui impliquent d'autres liens différents α (1-2); α (1-3) ou α (1-4) (Mehellou, 2016).

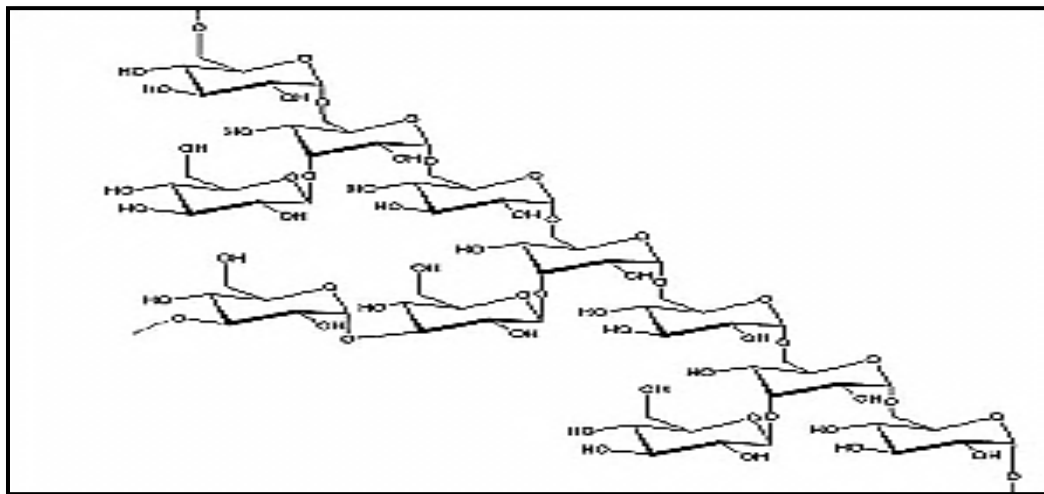


Figure 07: Structure du dextrane (Mehellou, 2016).

- **Les lentinanes** : sont des polymères de glucose isolés d'un champignon (*Lentinus edodes*). Structuralement, c'est un glucane à chaîne principale à liaison β (1-3) liés, substitués par des Glc (1-6) liés. Le Lentinane présente une viscosité très élevée, permet la formation des gels à basse température (**Boual, 2009**).

3.1.4. Propriétés physico-chimiques des polysaccharides

Les caractéristiques physico-chimiques et structurales d'un polysaccharide sont définies par le poids moléculaire, la composition en monosaccharide, la configuration des liaisons glycosidiques, la position des liaisons glycosidiques, la séquence du monosaccharide, la conformation, la taille des particules, la solubilité et les propriétés rhéologiques, etc. (**Nie et Xie, 2011**). Les polysaccharides possèdent de nombreux groupements hautement réactifs (groupes acétamide, amine, carboxyle et/ou hydroxyle), grâce à la présence de nombreux groupements hydroxyle dans leur structure, ils se caractérisent par une hydrophilie élevée (**Benaoun, 2017**).

Les composés ramifiés sont souvent plus solubles que les composés linéaires et forment plus facilement des gels car les interactions intermoléculaires sont moins fortes. Les molécules linéaires forment généralement des solutions plus visqueuses que les molécules branchées car elles ont un volume hydrodynamique plus important, ils ont aussi une plus grande tendance à précipiter en milieux concentré car leur conformation favorise les interactions intermoléculaires. Certains homoglycannes comme la cellulose sont insolubles car les ponts hydrogène intra et intermoléculaires sont très stables et forment un réseau cristallin hautement organisé empêchant la pénétration de l'eau (**Badoud et al., 2010**). Ces propriétés sont largement exploitées dans différents secteurs industriels, essentiellement en agroalimentaire comme agents texturants, gélifiants, stabilisants, émulsifiants et épaississants. Ces substances biocompatibles aux effets thérapeutiques sont utilisées dans le domaine médicale et pharmaceutique (**Roger, 2002 ; Jeddou et al., 2016**).

3.2. Activités biologiques des polysaccharides

La diversité structurale des polysaccharides quelle que soit leurs origines, confère à ces macromolécules de nombreuses activités biologiques :

3.2.1. Activité immunomodulatrice

Les polysaccharides dites : immunomodulateurs, immunostimulateurs ou modificateurs de la réponse biologique, sont celles qui peuvent stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire, puisque les polysaccharides ne peuvent pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille moléculaire, ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunes telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules cytotoxiques naturelles (NK) et les lymphocytes T (**Sanchez, 2006**). L'effet immunomodulateur des polysaccharides végétaux sur les macrophages consiste principalement en la stimulation de la génération de ROS, de la sécrétion de cytokines, de la prolifération cellulaire et de l'activité phagocytaire (**Ligacheva et al., 2020**).

Nie et Xie, (2011) ont rapporté une étude, qui a été menée sur des rats traités avec des polysaccharides de thé, puis immunisés avec des globules rouges de mouton, les résultats obtenus ont montré que le polysaccharide du thé ont le potentiel de promouvoir l'activité phagocytaire du système monocytes-macrophages, améliorant ainsi la capacité d'autoprotection. En outre, il a été trouvé qu'ils exercent des effets inhibiteurs sur la sécrétion trop élevée d'interleukine-1 (**Nie et Xie, 2011**). Les résultats d'une autre étude ont montré que les polysaccharides du CBP, en particulier la fraction F1, pouvaient stimuler les cellules mononuclées du sang périphérique de poulet et les inciter à exprimer des cytokines immunostimulantes IFN- γ (interféron γ) et IL-2 (**Mirzaie, 2020**).

Les travaux réalisés sur une plante médicinale du Mali *Biophytum petersianum*, ont montré que les polysaccharides isolés de la partie aérienne possèdent une activité immunomodulatrice qui stimule les leucocytes, les macrophages et les cellules dendritiques avec une légère activité sur les LT, LB et les NK (**Angone, 2010**).

3.2.2. Activité anti-inflammatoire

La réaction inflammatoire constitue l'un des mécanismes essentiels dans l'orchestration de la réponse immune destinée à protéger l'organisme contre les agressions, elle pourrait être aussi à l'origine de lésions tissulaires causant différentes maladies. Considérant que la production excessive de NO est étroitement liée à certaines maladies inflammatoires, les polysaccharides de

Collybiadryophila ont démontré un effet inhibiteur sur la production de NO induite par le LPS (lipopolysaccharide) et IFN- γ chez les macrophages, et ceci par l'inhibition de l'expression de l'ARNm codant pour iNOS et en conséquence la production de NO, ce qui leur confère un potentiel intéressant comme agent anti-inflammatoire (Sanchez, 2006).

Les polysaccharides acides (PSA) de *Sterculiae lychnophorae* possèdent une activité anti-inflammatoire puissante de façon dose-dépendante sur l'oedème d'oreille induit par di-méthyl benzène chez les souris. Ceci indique que PSA peut jouer un bon rôle d'inhibition sur l'inflammation aigue (Wu et al., 2007). Généralement, l'effet anti-inflammatoire des polysaccharides est expliqué par l'inhibition du cyclo-oxygénase ou lipo-oxygénase, et ainsi par l'inhibition de l'adhérence des leucocytes qui est l'une des premières étapes dans l'initiation de la réponse inflammatoire et pour l'accumulation des cellules immunitaires actives au niveau des sites inflammatoires (Wu et al., 2007).

Les polysaccharides de *Radix iIsatidis* inhibent de manière significative la production de l'oxyde nitrique, la prostaglandine E2 (PGE2), le TNF- α et l'IL-6 à partir des macrophages alvéolaires de rats Wistar en réponse au lipopolysacchrde (LPS) (Du et al., 2013). Dans une autre étude, les polysaccharides isolés d'un champignon (*Golden needlemushroom*), augmentent la sécrétion d'IL-10, et réduisent significativement le taux de myéloperoxydases, et les niveaux d'expression de CD4 et CD8 sur des rats brulés (Wu et al., 2010).

3.2.3. Activité anticancéreuse et anti-tumorale

Le cancer est une maladie multifactorielle complexe typiquement caractérisé par une croissance incontrôlée de cellules transformées (Wang et al., 2014). De nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides peuvent inhiber la croissance tumorale par des mécanismes communs comme la prévention de l'oncogenèse par la consommation orale de préparations actives; une activité anticancéreuse directe, telle que l'induction de l'apoptose des cellules tumorales; l'activité immunopotentialisation associée à une chimiothérapie et l'inhibition de la métastase tumorale (Zong et al., 2012).

Les polysaccharides des champignons exercent leur action antitumorale principalement via l'activation de la réponse immunitaire de l'organisme hôte. Ces substances sont considérées comme des modificateurs de la réponse biologique. Cela signifie essentiellement qu'ils ne

causent aucun mal et n'exercent aucun stress supplémentaire sur le corps ; ils aident le corps à s'adapter à divers stress environnementaux et biologiques. Les polysaccharides des champignons n'attaquent pas directement les cellules cancéreuses, mais exercent leurs effets antitumoraux en activant différentes réponses immunitaires chez l'hôte ; en stimulant les cellules tueuses naturelles NK, les cellules T, les cellules B et les réponses du système immunitaire dépendant des macrophages (**Wasser, 2002**).

Un exopolysaccharide est produit par un champignon psychrophile de l'Antarctique *Thelebolus* sp. avec un squelette de β (1-3)-D-glucane et des branches β (1-6)-D-glucopyrannose, a démontré une activité antiproliférative chez les cellules B16-F0 (lignée cellulaire de carcinome de la peau chez les souris), avec une concentration inhibitrice à 50% (CI50) de 275.42 $\mu\text{g/ml}$. L'action cytotoxique de l'exopolysaccharide est remarquée par une médiation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (**Mukhopadhyay et al., 2014**).

L'administration d'arabinoxylane chez la souris S180, a inhibé de manière significative la croissance de tumeurs transplantables de souris, elle a favorisé la prolifération des splénocytes et des thymocytes, l'activation des cellules tueuses naturelles (NK) et la phagocytose par des macrophages. En outre, elle a augmenté le nombre de leucocytes périphériques et les cellules de la moelle osseuse chez les souris porteuses de tumeur. Pour cela, les arabinoxylanes peuvent être considérés comme un agent anti-tumoral ayant une activité immunomodulatrice (**Benaoun, 2017**).

3.2.4. Activité anti-oxydante

Bien que l'activité anti-oxydante soit généralement associée à des composés de faible poids moléculaire tels que les phénols, les caroténoïdes et les vitamines, plusieurs travaux ont révélé que certains polysaccharides isolés des végétaux présentent également des propriétés antioxydantes (**Mengome et al., 2014**). Ces propriétés dépendent généralement de l'unité d'ose, des liaisons glycosidiques, du degré de ramification et de la conformation du polysaccharide (**Li et al., 2013**).

La peroxydation lipidique induite par les radicaux libres actifs dans l'organisme (Les radicaux libres DPPH, les radicaux libres hydroxyles et les radicaux libres anions superoxydes) est une cause importante de vieillissement, de maladies cardiovasculaires et de tumeurs. Les

polysaccharides de la poire baumière avaient un effet de piégeage sur les radicaux libres des espèces réactives de l'oxygène *in vitro*, ce qui pourrait piéger les radicaux libres peroxyde produits *in vivo*, bloquer la chaîne de réaction des radicaux libres *in vivo* et jouer un certain rôle dans l'anti-oxydation et l'anti-vieillessement (**Mei et al., 2019**).

Les polysaccharides sulfatés des algues *Sargassum fulvellum*, possèdent une forte activité de piégeage des radicaux libres, ils diminuaient la peroxydation lipidique ainsi que la mort cellulaire chez le poisson zèbre, par la régulation des voies de signalisation liées à l'apoptose via la clairance des ROS (**Wang et al., 2019**).

3.2.5. Activité anticoagulante

La thrombose veineuse se produit dans le monde entier à une incidence annuelle de 1 par 1000 adultes. Le traitement de la thrombose utilise des agents thrombolytiques à activités anticoagulantes et antiplaquettaires (**Souza et al., 2015**). Une étude a démontré que quatre classes distinctes de polysaccharides sulfatés (héparine, dermatane-sulfate, chondroïtine sulfate fucosylé et fucoidane des algues) ont une activité anticoagulante, due à leur interaction avec les enzymes et les inhibiteurs du système de la coagulation. Leurs effets anticoagulants dépendent d'un modèle exact de substitution sulfurique. Une petite modification dans la structure, conduit à une perte presque complète de l'activité anticoagulante, en dépit d'un niveau global élevé de sulfatation (**Mulloy et al., 2000**).

Les polysaccharides sulfatés de *Cucurbitapepo*, *Lady Godiva* ont montré des activités anticoagulantes plus élevées *in Vitro*, en agissant comme les héparines, il réagit principalement à travers les charges négatives des groupes sulfate pour neutraliser les résidus d'acides aminés chargés positivement (**Liang et al., 2018**).

3.2.6. Activité antivirale et antibactérienne

Certains polysaccharides extraits d'algues ont des propriétés antivirales et sont beaucoup moins cytotoxiques que les médicaments conventionnels (**Aguilar-Briseño et al., 2015**). Des polysaccharides sulfatés hydrosolubles isolées de deux algues rouges *Sphaerococcus coronopifolius* et *Boergeseniella thuyoides*, et sont constitués de galactose, de 3,6-anhydrogalactose, d'acides uroniques et de sulfate, inhibent la réplication *in vitro* du virus de

l'immunodéficience humaine à 12.5 pg/ml. Ils sont capables d'inhiber la réplication *in vitro* du virus de l'herpès simplex de type 1 par une action spécifique, pendant l'étape d'adsorption du virus de l'herpès simplex de type 1 à la cellule hôte. Alors que pour le virus de l'immunodéficience humaine, il y a un effet inhibiteur direct par réplication et contrôle de l'apparence de nouvelles générations de virus avec effet virucide potentiel **(Bouhlal et al., 2011)**.

Les tests d'activité antimicrobienne d'un extrait de polysaccharides sulfatés de la peau de calmar *Loligo vulgaris* (Loliginidae) constitué de 85.06% d'oses, 2.54% de protéines, 1.87% de cendres, 8.07% de sulfate et 1.72% de l'acide uronique, indiquent que ce polysaccharide montre des activités inhibitrices marquées contre les souches bactériennes dont *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* et contre des souches fongiques tels que *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria solani* **(Abdelmalek et al., 2015)**.

3.2.7. Autres activités

Les polysaccharides peuvent exercer d'autres activités biologiques dont l'activité antidiabétique, l'activité hépato-protectrice et gastro-protectrice.

L'administration orale d'un polysaccharide issu de *Misgurnus anguillicaudatus* (un poisson de la famille des Cobitidae), chez des souris diabétiques induit par la streptozotocine, diminue de manière significative les niveaux de glucose, les triglycérides, le cholestérol total, les lipoprotéines de basse densité-cholestérol (LDL-cholestérol) sanguins. Ce polysaccharide augmente aussi les niveaux des lipoprotéines de haute densité-cholestérol (HDL-cholestérol) et d'insuline chez les souris diabétiques **(Zhou et al. 2015)**. **Yu et al. (2013)** ont rapporté que les polysaccharides provenant d'*Astragalus membranaceus* ont diminué le poids corporel des souris insulino-resistantes induite par un régime riche en graisses.

Quan et al. (2013) ont prouvé que les polysaccharides de *Boschniakia rossica* (Orobanchaceae) jouent un rôle protecteur dans l'atteinte hépatique aiguë induite par le tétrachlorure de carbone suite à un examen histopathologique des coupes de foie. Un effet hépatoprotecteur de ces polysaccharides peut être dû à des potentiels de défense antioxydante élevée, qui suppriment les réponses inflammatoires et l'apoptose des tissus du foie.

La barrière de mucus est un facteur de protection important pour la muqueuse gastrique contre l'attaque aiguë, ce qui empêche la pénétration de l'agent nécrosant. La protection de la muqueuse gastrique pourrait être due à la capacité du polysaccharide à augmenter la synthèse du mucus et/ou de sa capacité à se lier à la muqueuse de la surface et exercer un revêtement protecteur **(Cordeiro et al., 2011)**.

3.3. Méthodes d'extraction et de caractérisation structurale des polysaccharides

L'analyse structurale d'un polymère comprend plusieurs étapes : l'extraction, la purification, la détermination de la composition en monosaccharides et enfin, l'étude de la séquence en monosaccharides, la nature de leurs points de liaisons, leur anomérie et leur conformation. L'analyse structurale des polysaccharides est particulièrement complexe; elle nécessite la mise en œuvre de nombreuses méthodes complémentaires qui peuvent être chimiques et enzymatiques pour les dégradations, et physiques pour l'analyse **(Ruiz, 2005)**.

.

3.3.1. Extraction et purification des polysaccharides

Les polysaccharides des végétaux existent en tant que constituants structurels de la paroi cellulaire, de sorte que la méthode d'extraction dépend de la structure de cette dernière **(Nie et Xie, 2011)**. La règle d'extraction de base est de briser la paroi cellulaire de la couche externe à la couche interne avec des conditions d'extraction douces à fortes (pH et température) sans modifier la structure des polysaccharides **(Jin et al., 2012)**. En général, les polysaccharides ont été extraits à l'aide d'un solvant, telle que l'eau, une solution acide ou une solution alcaline diluée **(Nie et Xie, 2011)**.

L'extraction des polysaccharides solubles se fait habituellement à l'aide d'un alcool (éthanol ou méthanol), les gommes, les mucilages et les composés pectiques sont extraits à l'eau froide en macération pendant plusieurs jours. L'amidon et les composés précédents peuvent être extraits à l'eau bouillante ou par les acides minéraux dilués, tandis que la cellulose est extraite par des solutions alcalines diluées ou par des acides minéraux concentrés **(Marouf, 2009)**. Certaines méthodes auxiliaires peuvent être utilisées pour améliorer ce processus d'extraction, telles que les méthodes utilisant les micro-ondes, les ultrasons, la méthode enzymatique, etc **(Nie et Xie, 2011)**.

L'extraction à l'eau chaude a été largement utilisée comme méthode classique pour la préparation de polysaccharides dans les applications industrielles, en raison des avantages dominants tels que simple et économique (**Jin et al., 2012**). L'extraction par cette méthode est influencée par plusieurs facteurs tels que, la température et le temps d'extraction, la quantité du solvant utilisé et l'agitation (**Djaboun, 1995**). L'étape de purification peut être réalisée par diverses techniques chromatographiques : chromatographie d'exclusion stérique en fonction de la masse moléculaire des composés, ou par chromatographie d'échange d'ions en fonction de la charge des molécules.

La chromatographie sur gel perméable (CGP) ou chromatographie d'exclusion stérique (CES) sépare les macromolécules biologiques en fonction de leur taille, les solutés sont élués dans l'ordre inverse de leur masse molaire MM (**Nadour, 2015**). La chromatographie sur gel est une méthode de routine, rapide et facile à mettre en œuvre. Son principe est basé sur la partition par interactions physiques entre deux phases, l'une est appelée la phase stationnaire constituée par exemple d'un gel polystyrène réticulé, l'autre est la phase mobile (solvant) selon le principe de tamis moléculaire (**Mkedder, 2013**).

La chromatographie échangeuse d'ions peut être appliquée pour analyser des glucides à cause de ces propriétés ioniques, ou la colonne joue le rôle d'échangeuse d'anions. Les glucides hydrosolubles se comportent comme des acides faibles, donc les groupements hydroxyles des oses dans le milieu alcalin peuvent s'ioniser en oxyanions (R-O) (**Chouana, 2017**).

3.3.2. Caractérisation structurale des polysaccharides

Le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides reposent essentiellement sur des techniques chromatographiques et spectrales, et cela nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques (**Ruiz, 2005**).

3.3.2.1. Hydrolyse de liaisons glycosidiques

L'hydrolyse acide consiste à hydrolyser l'échantillon à analyser par un acide. La dépolymérisation peut être conduite avec des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction) selon la nature et la structure du polysaccharide. La méthanolyse a été choisie comme méthode de clivage efficace des liaisons

glycosidiques entraînant peu de dégradation, elle présente l'avantage d'une conversion quasi-totale en méthylglycosides, qui présentent en outre une très forte stabilité en solution **(Ruiz, 2005)**.

L'hydrolyse enzymatique des glycanes utilise des polysaccharides lyases. Ces enzymes sont spécifiques pour différents types de glycanes et peut décomposer les polysaccharides en monosaccharides, disaccharides ou oligosaccharides. La dépolymérisation enzymatique offre l'avantage d'une spécificité élevée, d'une sensibilité élevée et d'une protection des résidus saccharidiques **(Yan, 2014)**.

3.3.2.2. Méthodes chromatographiques

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)** : est une méthode d'analyse couramment utilisée pour l'identification de composés organiques **(Boual, 2009)**. Elle indique le nombre de composants d'un mélange et se base principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse au long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...), fixée sur une plaque de verre ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. Les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant **(Delattre, 2005)**.

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**: est une technique chromatographique largement utilisée pour séparer les glucides et leurs conjugués. La séparation peut être réalisée en faisant varier la composition et la concentration de la phase mobile, et les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire. Un composé sera élué plus rapidement s'il a une affinité importante pour la phase mobile que pour la phase stationnaire ; en réduisant son affinité relative à la phase mobile, il éluera plus lentement. L'HPLC utilise plusieurs types de mécanismes de séparation caractérisés par le type de phases stationnaires et mobiles employées : chromatographie en phase normale, chromatographie en phase inverse, chromatographie échangeuse d'ions... **(Yan, 2014)**.

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)** : cette analyse permet d'identifier les monosaccharides constitutifs d'un polysaccharide ainsi que

leurs proportions en fonction de leurs coefficients de réponse, elle donne plus d'informations sur les liaisons glycosidiques liant les unités constitutives (**Nadour, 2015**). Cette méthode nécessite la méthylation préalable de toutes les fonctions hydroxyles du polysaccharide par de l'iodure de méthyle suivi de la libération, par hydrolyse acide, des monosaccharides partiellement méthylés. Ensuite une réduction par du NaBD₄ doit être faite afin de pouvoir différencier le C-1 du C-6, puisque seule la fonction réductrice est porteuse d'un deutérium. Les alditols partiellement méthylés sont acétylés afin de pouvoir déterminer par CPG-SM, les fonctions hydroxyles engagées dans une liaison osidique (**Ruiz, 2005**).

3.3.2.3. Méthodes spectrales

- **La spectroscopie infrarouge** : ou FTIR (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) est une méthode qualitative qui permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques d'un polymère et de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule (**Nadour, 2015**), elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés (**Ruiz, 2005**). Les liaisons chimiques absorbent le rayonnement infrarouge (IR) à des longueurs d'ondes spécifiques dépendant de leur nature et de leur conformation (**Benaoun, 2017**).

Le principe de cette technique consiste à sonder la molécule au moyen d'un rayonnement IR situé dans la gamme 4000 cm⁻¹ et 400 cm⁻¹ et à analyser l'absorption du rayonnement émis par la molécule vibrant sous l'action du IR. Ces vibrations sont classées selon deux catégories : Les vibrations dites de déformations (Bending) et les vibrations dites d'élongation (Stretching), 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 (**Chouana, 2017**).

- **La spectroscopie RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire)**: c'est une méthode physicochimique non destructive permettant, à partir de quelques micromoles de polysaccharide, de réaliser le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs, d'en préciser leur enchaînement, leurs points de branchement et leurs anoméries (**Ruiz, 2005**).

Partie II :

Etude expérimentale

Chapitre 1 :

Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

La plante d'*Anacyclus pyrethrum* a été récoltée au mois de Février dans la région de Sellaoua Announa, Guelma, située au nord-est de l'Algérie (altitude : 583 m, longitude : 7, 250702), elle a été identifiée par le Dr. Ali Zitouni (MCB, Département d'Ecologie et d'Ingénierie de l'Environnement, Faculté SNV/STU, Université 8 mai 1945 Guelma, Algérie). Les racines de la plante (**Figure 8.A**) ont été lavées à l'eau et rincées à l'éthanol pour éliminer les éventuelles impuretés, séchées à l'air à l'ombre et à température ambiante. Après une dizaine de jours de séchage, un broyat de 600g a été conservé dans un flacon hermétique (**Figure 8.B**).

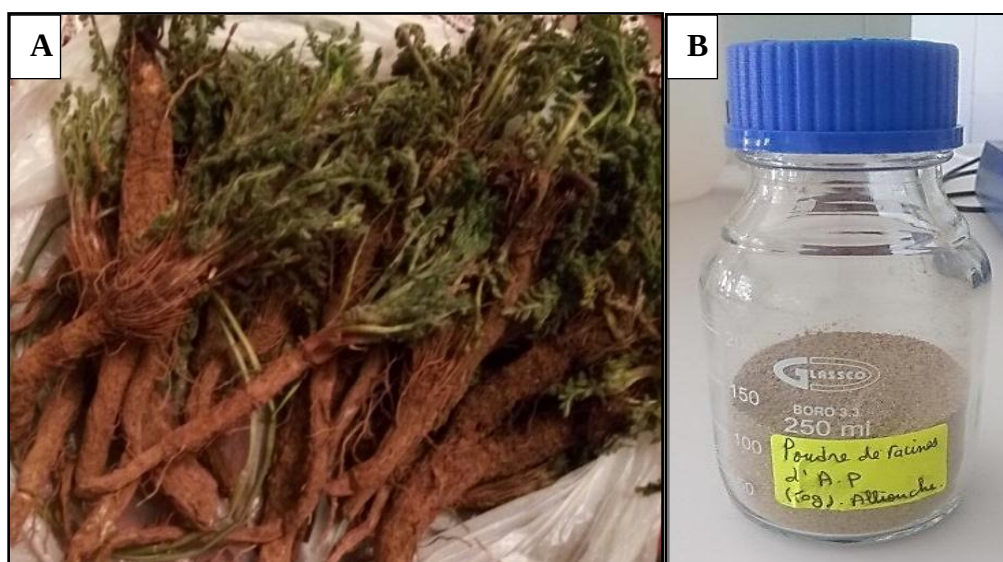


Figure 08 : (A) Les racines d'*Anacyclus pyrethrum*, (B) la poudre des racines d'*Anacyclus pyrethrum* obtenue après séchage et broyage.

1.2. Extraction des polysaccharides

L'extraction des polysaccharides a été réalisée selon la méthode décrite par (**Bendjeddou et al., 2003**) avec quelques modifications :

Dans un premier temps, 600 g de racines broyées sont mis dans l'eau (1g/18 ml); la suspension est agitée et mise au bain-marie à 95°C pendant deux heures et demie. Après refroidissement, elle est placée une nuit au réfrigérateur puis centrifugée 30 min à 6000 tpm. Le surnageant a été récupéré, réduit au minimum (1/5) du volume par évaporation sous pression réduite à 60°C, puis filtré pour éliminer tous les résidus. Les polysaccharides bruts ont été précipités du filtrat en ajoutant quatre volumes d'éthanol (95 %), cette étape permet

l'élimination des impuretés solubles dans l'alcool, telles que les lipides et les pigments (**Yu et al., 2017**), ensuite les matériaux précipités ont été recueillis par séchage.

L'extrait polysaccharidique obtenu a été dissous dans l'eau distillée, et la solution de réactif Sevag (1-butanol/chloroforme ; 1/4) a été ajoutée pour éliminer les protéines (Wang et al., 2015). La solution obtenue a été conservée deux nuits au réfrigérateur et après précipitation, la solution a été divisée en deux phases: solution de polysaccharides après déprotéinisation comme surnageant, protéines dénaturées comme précipité, puis le surnageant a été centrifugé à 3000 tpm pendant 10 minutes.

Une poudre fine a été récupérée après précipitation avec quatre volumes d'éthanol 95 % et séchage. La préparation a été dissoute dans de l'eau distillée (1 g/50 ml), dialysée (MWCO, 14000 Da) contre l'eau distillée pendant 72 h à 4°C afin d'éliminer les petites molécules (**Wang et al., 2019**). Enfin, les polysaccharides totaux ont été précipités en ajoutant quatre volumes d'éthanol pour obtenir après séchage et tamisage une poudre très fine (**Figure 9.A**). Les étapes d'extraction sont présentées dans la (**Figure 10**). Le rendement en pourcentage était calculé comme suit :

$$(\text{Poids sec des polysaccharides totaux} / \text{poids sec des racines}) \times 100$$

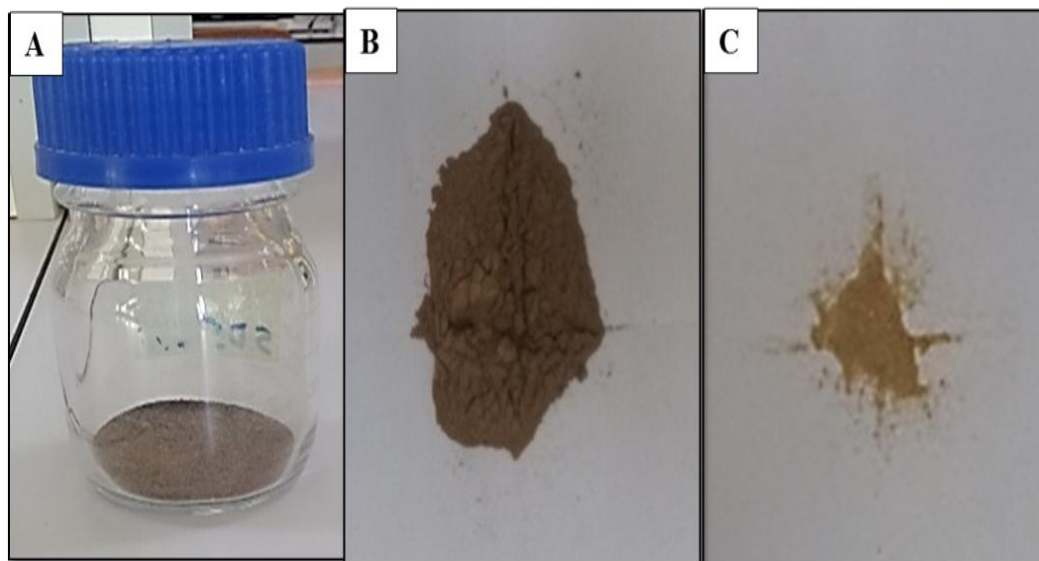


Figure 09: (A) Les polysaccharides totaux d'*Anacyclus pyrethrum*,

(B) Fraction 1, (C) Fraction 2.

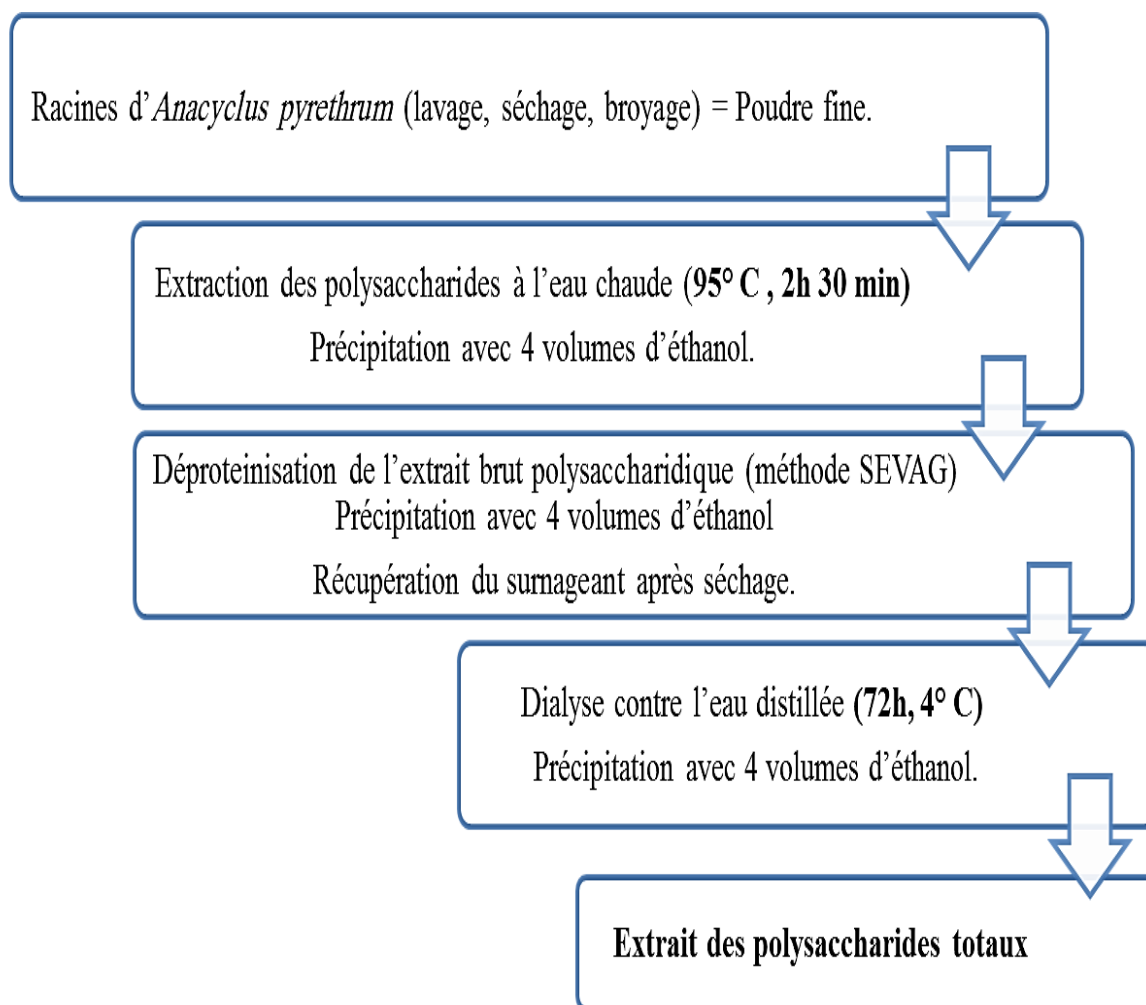


Figure 10 : Les étapes d'extraction des polysaccharides à partir des racines *d'Anacyclus pyrethrum*.

1.3. Fractionnement de l'extrait polysaccharidique par reprécipitation

Les polysaccharides obtenus ont subi des étapes de fractionnement selon la méthode décrite par **Bendjeddou et al. (2010)** avec quelques modifications (**Figure 11**). Une quantité des polysaccharides totaux a été pesée et mise dans un bécher, 150 ml d'eau distillée ont été ajoutés successivement, l'ensemble porté au bain marie à 80° C et agité à l'aide d'une spatule en verre pendant 2 h jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Après quelques minutes de refroidissement, 2 volumes d'éthanol (95%) ont été ajoutés à la solution, le bécher est ensuite recouvert avec du Parafilm et laissé à 4°C pendant 72h.

Après précipitation, la solution est répartie en deux phases: surnageant et culot. Le culot a été récupéré dans des boîtes de Pétri, et le surnageant a été centrifugé à 6000 tpm pendant 30 minutes afin de récupérer le culot, l'ensemble est séché à l'air libre pour obtenir la première fraction : F1 (**Figure 9.B**).

On ajoute au surnageant récupéré précédemment 4 volumes d'éthanol 95%, la solution est laissée à nouveau à 4°C pendant 72h pour avoir un culot et un surnageant. Après ce laps de temps, le surnageant est prélevé pour être centrifugé à 6000 tpm pendant 30 minutes et donner des traces de culot qui ont été récupérées et ajoutées au culot obtenu précédemment. L'ensemble est réservé dans des boîtes de Pétri, laissé quelques jours à l'air libre pour le séchage afin d'obtenir la deuxième fraction polysaccharidique : F2 (**Figure 9.C**). Les fractions obtenues sont ensuite pesées afin de calculer le rendement comme suit :

$$(\text{Poids sec de la fraction} / \text{poids sec des racines}) \times 100.$$

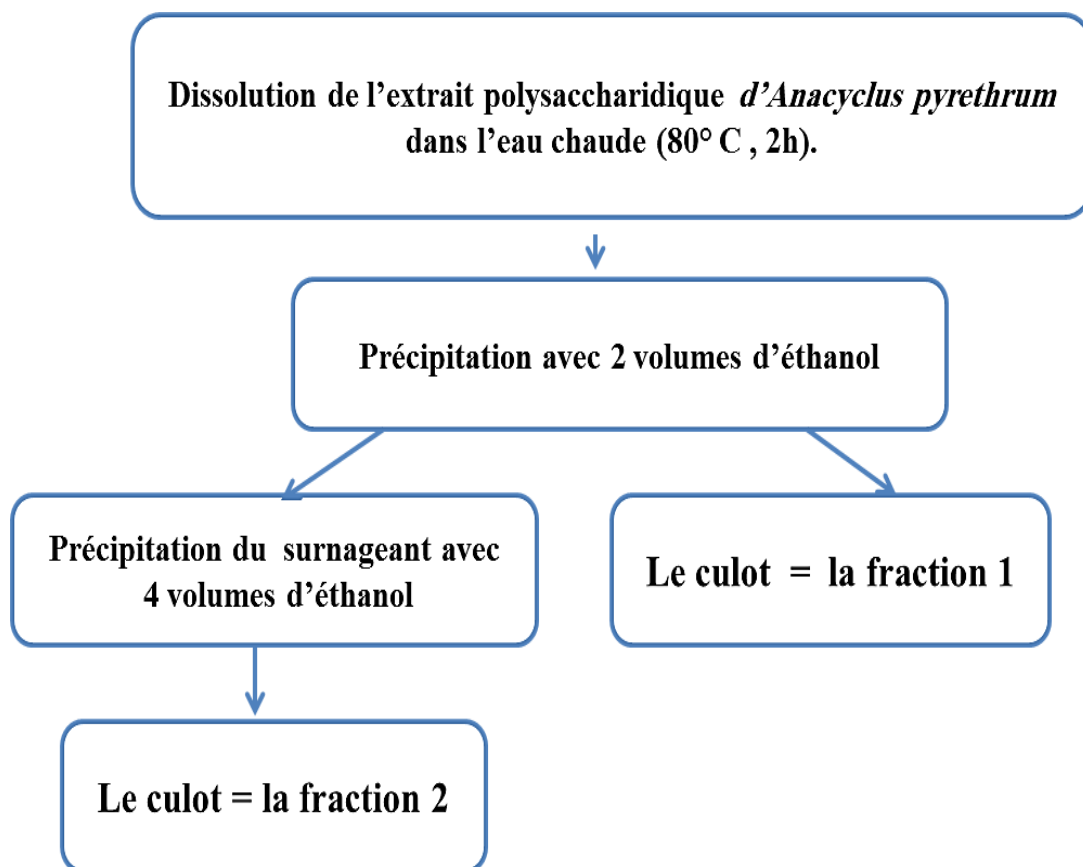


Figure 11 : Les étapes de fractionnement des polysaccharides *d'Anacyclus pyrethrum*.

1.4. Model animal

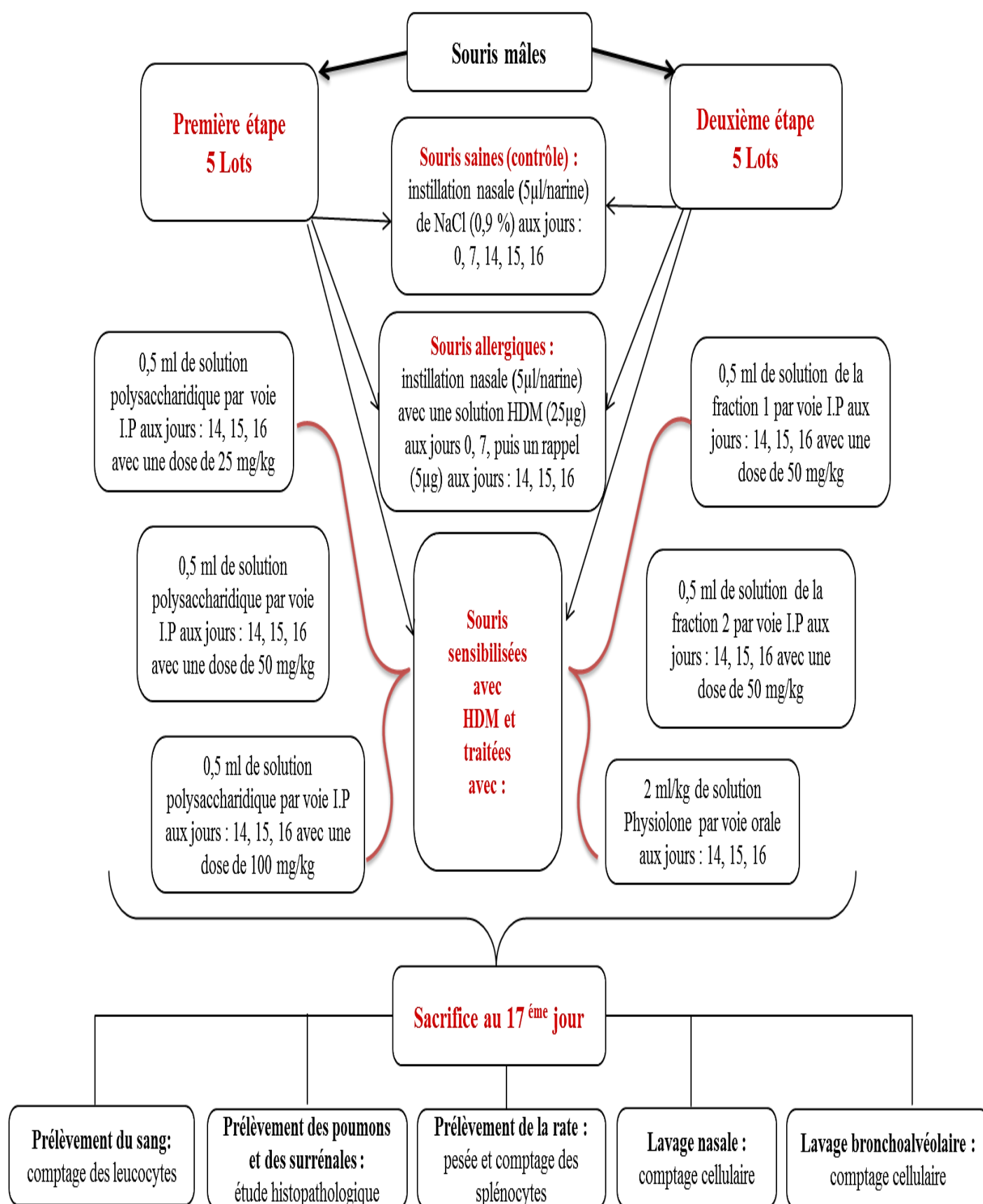
Des souris *Mus Musculus* males blancs (6-8 semaines) avec un poids corporel compris entre 28 et 32 g ont été ramenées de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie). Les souris ont été hébergées dans des cages en polycarbonate (35 x 23 x 16 cm), et l'élevage a été effectué dans l'animalerie de l'université de Guelma, dans des conditions constantes de température ambiante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), une photopériode naturelle et un besoin alimentaire quotidien composé d'aliments riches en graines (blé, maïs), du pain rassis et de l'eau.

Le travail sur les animaux s'est déroulé en deux étapes (**Figure 12**) : la première étape vise à tester l'effet anti-inflammatoire de l'extrait polysaccharidique d'*Anacyclus pyrethrum* à différente dose, la deuxième étape a pour but de tester l'effet des fractions : F1 et F2 à une dose de 50 mg/kg en comparaison avec l'effet d'un corticoïde : Physiolone.

Pour une première étape et après une période d'adaptation de 10 jours, les animaux ont été répartis aléatoirement en cinq lots ($n = 8$) : lot 1 (témoin sain), lot 2 (témoin allergique), lots 3, 4, 5 (traités avec les polysaccharides d'*A.p* aux doses de 25, 50, 100 mg/kg de poids corporel respectivement). Les groupes de la deuxième étape sont les suivants : lot 1 (témoin sain), lot 2 (témoin allergique), lots 3, 4 (traités avec les fractions polysaccharidiques F1 et F2 respectivement à une dose de 50 mg/kg de poids corporel), lot 5 (traité avec un corticoïde : Physiolone).

Le premier lot seulement a reçu du NaCl 0,9 % (**voir Annexe**) par voie intranasale (5 μl /narine) aux jours 0, 7, 14, 15, 16. Pour induire une inflammation allergique des voies respiratoires pour tous les autres groupes, les souris ont été immunisées avec 5 μl /narine d'extrait de HDM (**voir Annexe**): *Dermatophagoides pteronyssinus* (02.01.85, Citeqbiologics, Groningen, Pays-Bas) à une dose de 25 μg aux jours 0 et 7, suivis de trois rappels intranasaux à une dose de 5 μg de HDM aux jours 14, 15, 16 (**Figure 13**) (**Madouri et al., 2016**). Les souris traitées par l'extrait polysaccharidique à différentes doses et ainsi par les fractions polysaccharidiques (F1 et F2) à une dose de 50 mg/kg ont reçu 0,5 ml de solution polysaccharidique par voie intrapéritonéale aux jours : 14, 15, 16, alors que le groupe traité par un corticoïde reçoit par voie orale la Physiolone à une dose de 2 ml/kg.

Vingt-quatre heures après la dernière provocation, les souris ont été sacrifiées par décapitation partielle pour récupérer le sang ou par une exposition au chloroforme afin de réaliser les tests *In vivo*.

**Figure 12 :** Le protocole expérimental des tests *In vivo*.

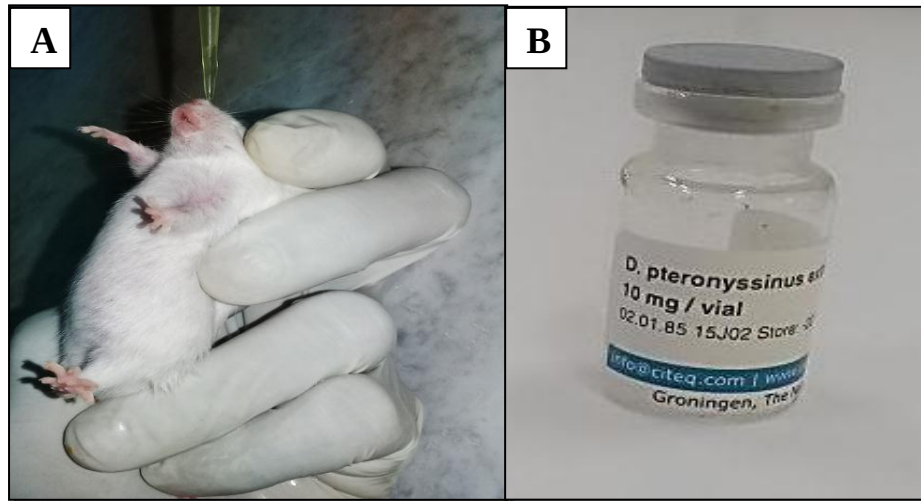


Figure 13 : (A) Instillation nasale des souris avec l'allergène HDM, (B) Ampoule d'HDM ; *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p).

1.5. Tests *In vivo*

1.5.1. Formule leucocytaire sanguine

Les souris ont été sacrifiées par décapitation partielle (**Bouguenoun *et al.*, 2016**). Le sang a été mis dans des tubes EDTA (Ethylène Diamine Tetra-Acétique), un frottis sanguin a été préparé afin de faire un dénombrement des différentes populations de globules blancs (monocytes, neutrophiles, lymphocytes), à l'aide d'un microscope optique (Leica, USA) avec le grossissement 1000 X.

1.5.2. Lavage nasal (LN)

Dans un premier temps, des souris ont subi des instillations nasales avec 1,5 ml de PBS (**voir Annexe**) à 37°C dans chaque narine (**Urbain *et al.*, 1994**). Ensuite, le liquide collecté des deux fosses nasales a été centrifugé (3000 tpm à 4°C pendant 15 minutes). Après cela, chaque culot a été mis en suspension dans 0,9 ml de PBS ; puis 100µl de la suspension cellulaire ont été dilués dans 900µl de solution de bleu Trypan (**voir Annexe**) avant de procéder au comptage cellulaire au microscope optique (Leica, USA), en utilisant une cellule de Malassez avec un grossissement de 400 X. Enfin, les résultats ont été exprimés en cellules par litre du liquide collecté selon l'équation suivante :

$$N = (n / V) \times f$$

N: nombre de cellules par litres

n: nombre de cellules comptées

V: volume de comptage (litres)

f : facteur de dilution.

Le pourcentage de viabilité est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{viabilité \%} = \frac{(\text{Nombre total de cellules} - \text{nombre de cellules mortes}) \times 100}{\text{Nombre total de cellules}}$$

1.5.3. Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Les souris ont été sacrifiées, une incision dans la peau du cou et les muscles autour de la trachée a été pratiquée. Ensuite, un cathéter d'environ 0,5 cm a été introduit dans le tube trachéal et stabilisé à l'aide de fil de coton (**Van Hoecke et al., 2017**).

Une seringue chargée de 0,5 ml de PBS à 4°C a été connectée au cathéter pour effectuer un lavage des poumons (trois fois), la solution a été injectée puis aspirée doucement afin de recueillir le liquide bronchoalvéolaire. Ce dernier a été centrifugé à 1500 tpm pendant 6 min, le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été mis en suspension dans 0,5 ml de PBS. Ensuite, 100 µl de la suspension cellulaire a été dilué dans 900 µl de la solution de bleu Trypan (**Bouguenoun et al., 2016**). Enfin, les cellules ont été comptées comme a été décrit précédemment.

1.5.4. Détermination du poids relatif de la rate et du nombre de cellules spléniques.

La rate a été prélevée après le sacrifice de l'animal et ensuite pesée, puis placée dans une boîte de Pétri contenant 3 ml de solution PBS et ainsi débarrassée de la graisse. Le poids relatif de la rate a été calculé comme suit :

$$(\text{Poids de la rate} / \text{poids de la souris}) \times 100.$$

La capsule a été vidée de son contenu cellulaire, la suspension cellulaire est ensuite placée dans un tube et centrifugée pendant 3 minutes à 100 tpm pour éliminer les débris

cellulaires. Le surnageant est récupéré puis centrifugé 10 min à 1500 tpm. Le culot est remis en suspension dans 0,5 ml de PBS et 4,5 ml de solution de lyse (0,83 % NH_4Cl) (**voir Annexe**) des globules rouges. Après une période d'incubation de 10 min, la suspension est centrifugée 10 min à 1500 tpm (**Daum et al., 1995., Duncan et Lawrence, 1995**).

Cette centrifugation est suivie de l'élimination du surnageant tandis que le culot est remis en suspension dans 3 ml de PBS, centrifugé 10 min à 1500 tpm. La dernière étape est répétée deux fois, à la fin du dernier lavage, le culot cellulaire est repris dans 3 ml de PBS. Les splénocytes viables sont comptés après dilution de 100 μl de la suspension cellulaire dans 900 μl de la solution de bleu Trypan, afin de compter les cellules comme a été décrit précédemment.

1.5.5. Examen histopathologique des poumons et des surrénales

Après la dissection des animaux, les poumons et les glandes surrénales ont été prélevés, pesés, puis conservés dans du formol (10%) (**voir Annexe**) et orientés vers le laboratoire d'anatomie-pathologie de l'hôpital Ibn Zôhr, Guelma (Algérie) pour l'étude histologique. Ensuite, les échantillons ont été déshydratés avec de l'alcool éthylique et du xylène puis inclus dans de la paraffine, coupés en sections de 3 à 5 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (**voir Annexe**), et colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (HE). Enfin, les coupes ont été observées en microscopie optique (Leica, USA) pour évaluer le degré de l'inflammation.

1.6. Activité anti-oxydante des PST et des fractions polysaccharidiques d'A.p

L'activité anti-oxydante des PST et des fractions polysaccharidiques d'A.p a été mesurée par un test direct de pouvoir antioxydant total. C'est le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP). Il est basé essentiellement sur la réaction de réduction par un antioxydant, de fer ferrique (Fe^{3+}) de couleur jaune présent dans le complexe ferreux TPTZ, en fer ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu vert, cette réaction peut être contrôlée en mesurant le changement d'absorption à 593 nm (**Benzie et Strain, 1999**).

Dans un premier temps, une solution tampon acide acétique / acétate de sodium à 300 mM à pH = 3,6, a été préparée (3,1 g d'acétate de sodium trihydraté, plus 16 ml d'acide acétique glacial ; complétés à 1 litre avec de l'eau distillée), puis ajouté à 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) dilué auparavant dans 40 mM d'HCl, et à 20 mM FeCl₃ dans un rapport de 10 : 1 : 1, pour donner le réactif FRAP de travail. Cette solution doit être impérativement conservée dans un bain à 37°C (**Benzie et Strain, 1999**).

Ensuite 950 ml du réactif FRAP ont été ajoutés à 50 ml de solution polysaccharidique à une concentration de 2 mg/ml. Après 4 minutes, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 593 nm par le spectrophotomètre UV-Visible (SPECORD 210 PLUS 623F1138, Allemagne). Une gamme de solutions de sulfate ferreux heptahydraté utilisée comme composé de référence (FeSO₄·7H₂O : 0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mmol/L) a été préparée, afin d'établir une droite d'étalonnage à partir des absorbances lues. Elle est de la forme : $Abs = a \times (Fe^{+2}) + b$ (**Figure 14**).

L'absorbance mesurée pour chaque extrait, permet de déterminer la concentration en mM d'équivalent Fe⁺²/L, en utilisant la formule suivante (**Rezaire, 2012**) :

$$\text{Concentration en mM d'Eq Fe}^{+2} = (Abs - b) / a$$

a : la pente

b : l'absorbance à blanc

Les résultats sont exprimés en en mmol d'équivalent Fe⁺² / mg d'extrait sec et comparés avec cel du BHT (butylhydroxytoluène).

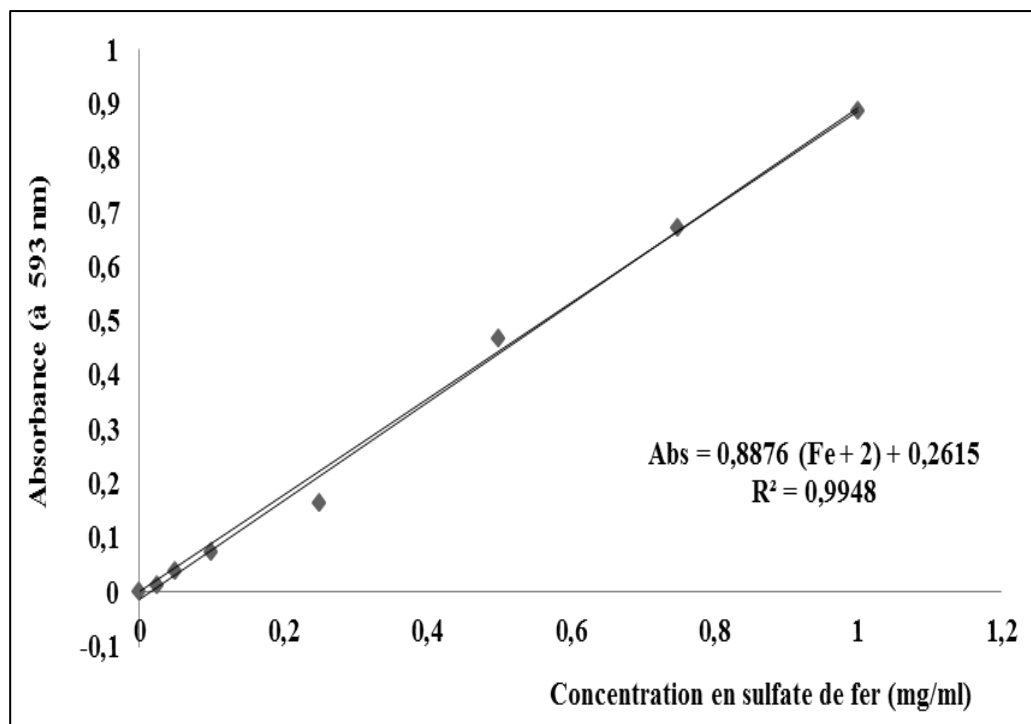


Figure 14 : Droite d'étalonnage du sulfate de fer pour le test FRAP.

1.7. Caractérisation structurale des polysaccharides d'Ap

1.7.1. Par microscopie électronique à balayage (MEB)

Le MEB a été utilisé pour caractériser les microstructures et les morphologies de surface des matériaux polysaccharidiques (Yu et al., 2017). Cette caractérisation a été faite au sein du centre de recherche d'analyse physico-chimique (CRAPC) de Bousmail (Alger, Algérie), où les échantillons (les PST et les deux fractions polysaccharidiques F1 et F2) ont été fixés sur le porte-échantillon avec du ruban adhésif double face, puis pulvérisés avec la poudre d'or. La structure de surface de l'échantillon de polysaccharide a été observée par un MEB à émission de champ (Quanta FEG 250, USA). Enfin, des images ont été collectées avec un grossissement à 1600X et 3000X (Ma et al., 2019).

1.7.2. Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour identifier les groupements fonctionnels présents dans les échantillons en fonction des valeurs de pic dans l'IR. Les mesures de spectroscopie d'absorption infrarouge de l'extrait polysaccharidique ainsi que les deux

fractions F1 et F2 ont été effectuées au sein de CRAPC à l'aide d'un spectromètre Alpha FT-IR (Bruker Optics Inc., MA, Allemagne) sur un nombre d'onde allant de 4000 à 400 cm^{-1} à une résolution 1 cm^{-1} (**Chen et al., 2019**).

1.7.3. Purification de la fraction active

Après avoir montré une activité anti-inflammatoire intéressante et prometteuse, la fraction F1 est soumise à plus d'analyses structurales et qui ont commencé par une purification sur chromatographie de filtration sur gel.

La fraction F1 a été dissoute dans de l'eau distillée à raison de 50 mg/ml, passée sur une colonne Sephadex G-200 (2 cm $\times$ 60 mm) et éluée avec de l'eau distillée à un débit de 0,1 ml/min.; l'éluant a été recueilli à 6 ml/tube. Les fractions (6 ml chacune) formant le même pic ont été collectées, dialysées et lyophilisées pour obtenir un polysaccharide pur dénommé PS. Ap.1. L'homogénéité du polysaccharide pur PS. Ap.1 a été vérifiée en le passant sur une colonne FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) en utilisant du superose 12 et une solution d'acétate de sodium (0,22 M) comme tampon. L'échantillon est préparé à une concentration de 5 % (p/v) dans la solution tampon et injecté dans la colonne à raison de 10 μl à la fois (**Bendjeddou et al., 2010**).

1.7.4. Détermination des monosaccharides constitutifs

L'analyse des monosaccharides constituant le polysaccharide PS.Ap.1 a été réalisée au sein du laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université Lille 1 (France) par une méthanolyse, et les monosaccharides triméthylsilylés sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse.

Le polysaccharide lyophilisé (1mg) a été soumis à une méthanolyse en ajoutant 1ml d'une solution 4 M HCl/MeOH (acide chlorhydrique/méthanol) et 100 μl de mannitol à la concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ comme solution interne. Le mélange a été agité et placé à l'étuve à 80 °C pendant 24h (**Chambers et Clamp, 1971**). Après 24 h de temps de réaction, le mélange a été évaporé à sec sous courant d'azote. Le mélange obtenu est triméthylsilylé en ajoutant 0.05 mL de la solution de dérivation formée de (pyridine – triméthylchlorosilane – hexamethyldisilazane 5 :1 :1 par volume) (**Chambers et Clamp, 1971**).

Le mélange est laissé reposer pendant 30 mn. Après centrifugation pendant 5 min à 6000 tpm, 5 µl du surnageant est injecté dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse (OV101, 25x 0.3mm). La température de la colonne était de 140°C lors de l'injection, puis augmentée par 2°C /mn à 240°C. Basé sur des normes pour tous les monomères présents, les monosaccharides ont été identifiés.

1.7.5. Détermination des liaisons glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La position des liaisons glycosidiques constitutives du polysaccharide PS.Ap.1 a été déterminée par analyse GC/MS des monosaccharides après transformation en acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM). La méthode passe par méthylation des groupements hydroxyles libres du polysaccharide suivie d'une hydrolyse acide des liaisons glycosidiques (**Pena et al., 2012**). Les monosaccharides sont ensuite réduits en alditols puis acétylés au niveau des groupements hydroxyles libres. Les molécules générées portent le nom acétates d'alditols partiellement -O- méthylés et permettent d'accéder à des informations structurales comme la position des groupements O-méthyle ou O- acétyle et donc les groupements hydroxyles engagés ou non dans une liaison glycosidique (**Carpita et Chea, 1989**).

La méthylation du polysaccharide PS.Ap.1 et la transformation des groupes hydroxyle libres (OH) en alcoolates (RO-Na⁺) est réalisé en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) et de t-butoxyde de potassium selon la méthode (**Finne et al., 1980**). Brièvement, 2mg du PS.Ap.1 lyophilisé a été mis en suspension dans 200 µl de diméthylsulfoxyde sec dans des tubes à bouchon à vis revêtus de téflon sous N₂. Un volume égal de méthylsulfinylcarbanion de potassium 2M/tert-butoxyde a été ajouté et le mélange a été conservé pendant 30 min à température ambiante. De l'iodure de méthyle (300 µl) a ensuite été ajouté en refroidissant. Après 30 min, l'excès de réactif a été éliminé sous un courant de N₂ et le produit a été lyophilisé. Les sels ont été éliminés en dissolvant l'échantillon dans 1 ml de chloroforme/méthanol (2/1, v/v), contenant 5 % (v/v) d'eau (**Van den Eijnden et al., 1977**), et en le faisant passer à travers de petites colonnes contenant 1 g de Sephadex G-25 superfine, préalablement équilibrée dans le même mélange de solvants pendant 20 min.

Les colonnes ont été éluées avec du solvant (3 ml), l'éluat a été réduit de volume par évaporation sous courant de N₂ et enfin séché par lyophilisation. Les produits méthylés ont

été soumis à une méthanolyse comme a été précédemment décrit, puis analysés par GC-MS, et les produits ont été déterminés selon (**Fournet *et al.*, 1981**).

1.8. Analyse statistique

Toutes les données obtenues au cours de l'expérimentation ont été analysées à l'aide d'EXCEL STAT 2010. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de variance à un facteur (ANOVA), et des comparaisons multiples ont été effectuées à l'aide des tests post-hoc appropriés. Toutes les données expérimentales ont été exprimées en moyenne $\pm$ SD, et les différences ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

Chapitre 2 :

Résultats et discussion

2.1. Le rendement de l'extraction des polysaccharides

La poudre des racines d'*Anacyclus pyrethrum* (600 g) a subi une extraction à l'eau chaude pour donner 69.98g d'extract brut avec un rendement égal à 11,66% (**Figure 15**). **Yu et al. (2017)** signalent un rendement de 14.97% à partir des racines du Ginseng américain: *Panax quinquefolius* L., et **Niu et al. (2011)** ont obtenu un rendement de 8.81% à partir des racines d'*Astragalus membranaceus*.

Après déprotéinisation par la méthode de Sevag, dialyse contre l'eau distillée et précipitation avec 4 volumes d'éthanol 95%, on a pu obtenir un extrait de polysaccharides totaux (27,65g = 4,60%). Cet extrait a été fractionné par deux précipitations successives : la première avec 2 volumes d'éthanol pour obtenir la fraction F1 avec un rendement de 3.76% et la deuxième précipitation avec 4 volumes d'éthanol pour donner la fraction F2 avec un rendement de 0.036% à partir de 600g de la poudre des racines d'*Anacyclus pyrethrum* (**Figure 15**).

2.2. Effets du traitement avec les polysaccharides totaux (PST) des racines d'*Anacyclus pyrethrum*

2.2.1. Effet sur la formule leucocytaire sanguine

Les résultats du comptage des leucocytes sanguins pour chaque groupe sont présentés dans (**Figure 16**). Le nombre de leucocytes pour les souris saines est $5,13 \pm 0,42 \times 10^3$ C/ μ l, la sensibilisation à l'HDM a fait augmenter ce nombre à $7,68 \pm 0,71 \times 10^3$ C/ μ l. Le traitement avec les PST à toutes les doses (25, 50, 100 mg/kg) cause une diminution du nombre de globules blancs à $1,16 \pm 0,29 \times 10^3$ C/ μ l, $5,85 \pm 0,30 \times 10^3$ C/ μ l, $3,36 \pm 0,35 \times 10^3$ C/ μ l respectivement, par rapport au groupe HDM, mais ce n'est qu'à la dose de 25 mg/kg que cette diminution est significative ($p < 0,05$).

Le nombre de différentes populations leucocytaires (monocytes, neutrophiles, lymphocytes) est présenté dans (**Figure 17**). La sensibilisation à l'HDM seulement ou associée à un traitement de PST à la dose de 50 mg/kg, a induit une augmentation significative du nombre de lymphocytes : $5,74 \pm 0,67 \times 10^3$ C/ μ l, $5,27 \pm 0,53 \times 10^3$ C/ μ l respectivement, en comparaison avec le groupe sain ($3,33 \pm 0,16 \times 10^3$ C/ μ l), alors que le traitement avec les doses 25 et 100 mg/kg a montré une diminution significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe HDM: $0,9 \pm 0,32 \times 10^3$ C/ μ l et $2,36 \pm 0,36 \times 10^3$ C/ μ l respectivement.

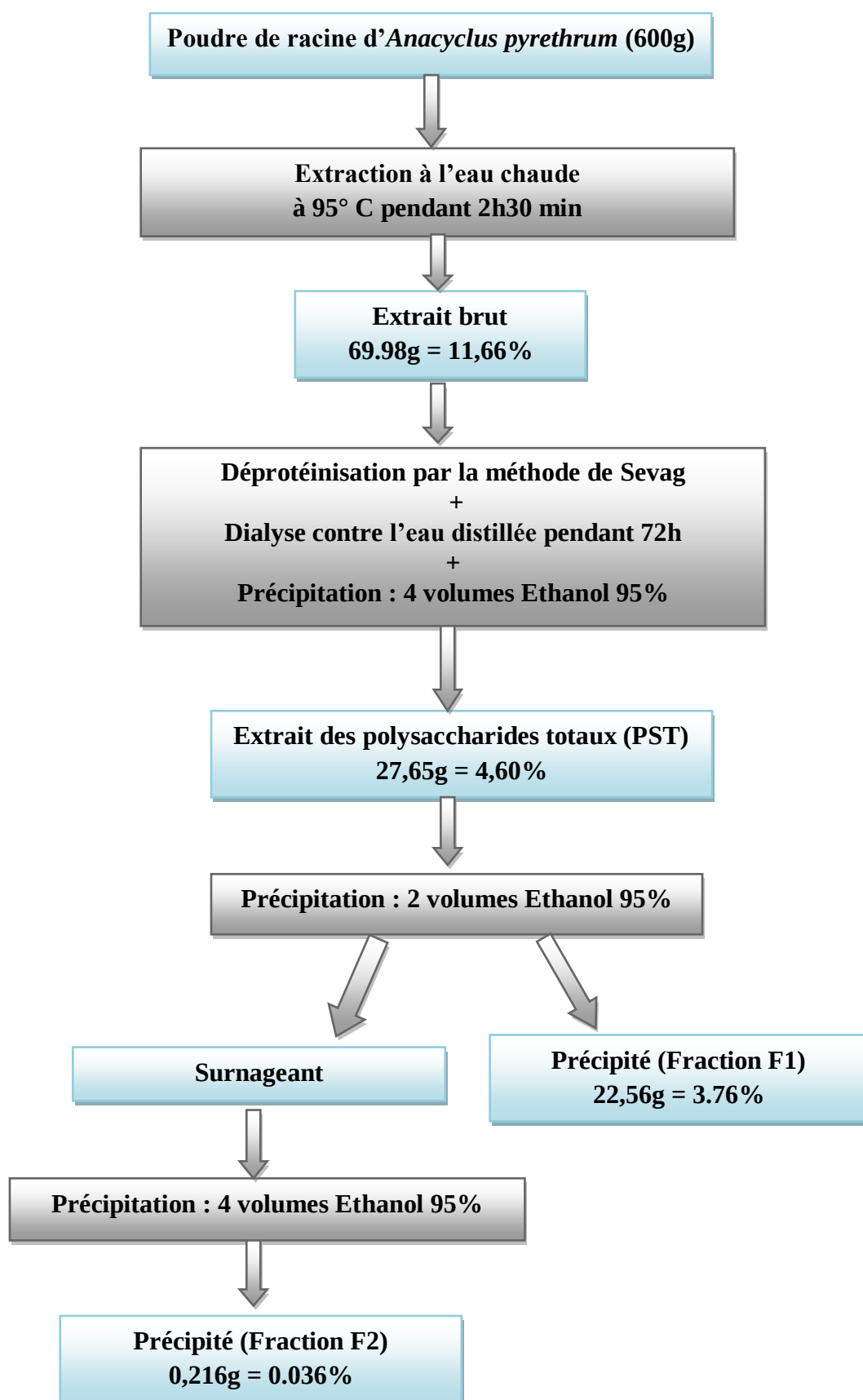


Figure 15 : Le rendement de l'extraction des polysaccharides des racines d'*Anacyclus pyrethrum*.

D'autre part, tous les traitements avec les PST (25, 50, 100 mg/kg) diminuaient significativement ($p < 0,05$) le nombre de neutrophiles sanguins à $0,13 \pm 0,03 \times 10^3$ C/ μ l, $0,35 \pm 0,04 \times 10^3$ C/ μ l, $0,39 \pm 0,03 \times 10^3$ C/ μ l respectivement, et également les monocytes sanguins: $0,09 \pm 0,019 \times 10^3$ C/ μ l, $0,22 \pm 0,019 \times 10^3$ C/ μ l, $0,55 \pm 0,05 \times 10^3$ C/ μ l respectivement de manière dose-dépendante, cette diminution était également plus remarquée chez le groupe traité avec 25 mg/kg de PST en comparaison avec le groupe sain : $0,94 \pm 0,038 \times 10^3$ C/ μ l et $0,68 \pm 0,071 \times 10^3$ C/ μ l et le groupe HDM : $0,76 \pm 0,12 \times 10^3$ C/ μ l et $0,77 \pm 0,052 \times 10^3$ C/ μ l (**Figure 17**).

Dans l'asthme bronchique et l'allergie nasale, l'HDM est considéré comme l'un des antigènes les plus importants (**Maeda et al., 1992**). Certains allergènes, comme Der p 1, un des allergènes majeurs de *Dermatophagoides pteronyssinus*, peuvent modifier les fonctions de la barrière épithéliale de la muqueuse respiratoire et activer les cellules de l'épithélium, les cellules de l'immunité innée et celles de l'immunité adaptative (**Michaud, 2013**). Les résultats obtenus ont montré que cet allergène a provoqué une installation d'une réponse inflammatoire pulmonaire, et cela est confirmé par les travaux de (**Madouri, 2016**). Cette inflammation est faite suite à la stimulation des cellules polynucléaires (PNs) provoquant ainsi des lésions tissulaires (**Bouguenoun et al., 2016**).

Les résultats du comptage des leucocytes sanguins ont montré que la sensibilisation à l'HDM induit une augmentation de leur nombre par rapport au groupe sain, cela peut être dû essentiellement à une forte production de lymphocytes. Alors que le traitement polysaccharidique a provoqué une diminution des leucocytes sanguins, (**Roesler et al., 1991**) ont constaté le même résultat à environ 30-60 min après l'injection intraveineuse de 5 mg de polysaccharides.

Lorsque la première ligne de défense est dépassée par les pathogènes, les PNs sont massivement recrutés. Les neutrophiles sont des PNs phagocytes, et lors d'une infection sont les premiers types cellulaires recrutés aux sites inflammatoires. Ils émigrent de la circulation sanguine et rejoignent le site infecté ou enflammé selon un processus rapide, nécessitant plusieurs étapes, qui répond à différents stimuli pro-inflammatoires (**Tanga, 2012**), cela peut expliquer la diminution du nombre des neutrophiles sanguins chez les souris sensibilisées à l'HDM. Le traitement polysaccharidique à différentes doses a activé cette migration, et cela est traduit par le nombre de neutrophiles sanguins plus faibles trouvés chez les souris traitées par rapport au témoin malade.

On a même constaté une diminution du nombre de monocytes sanguins après traitement avec les PST à différentes doses, et cela peut être due à leur migration vers les tissus pour se transformer en macrophages afin d'atteindre les sites infectieux et phagocyter l'agent étranger (**Burmester et Puzzutto, 2000**).

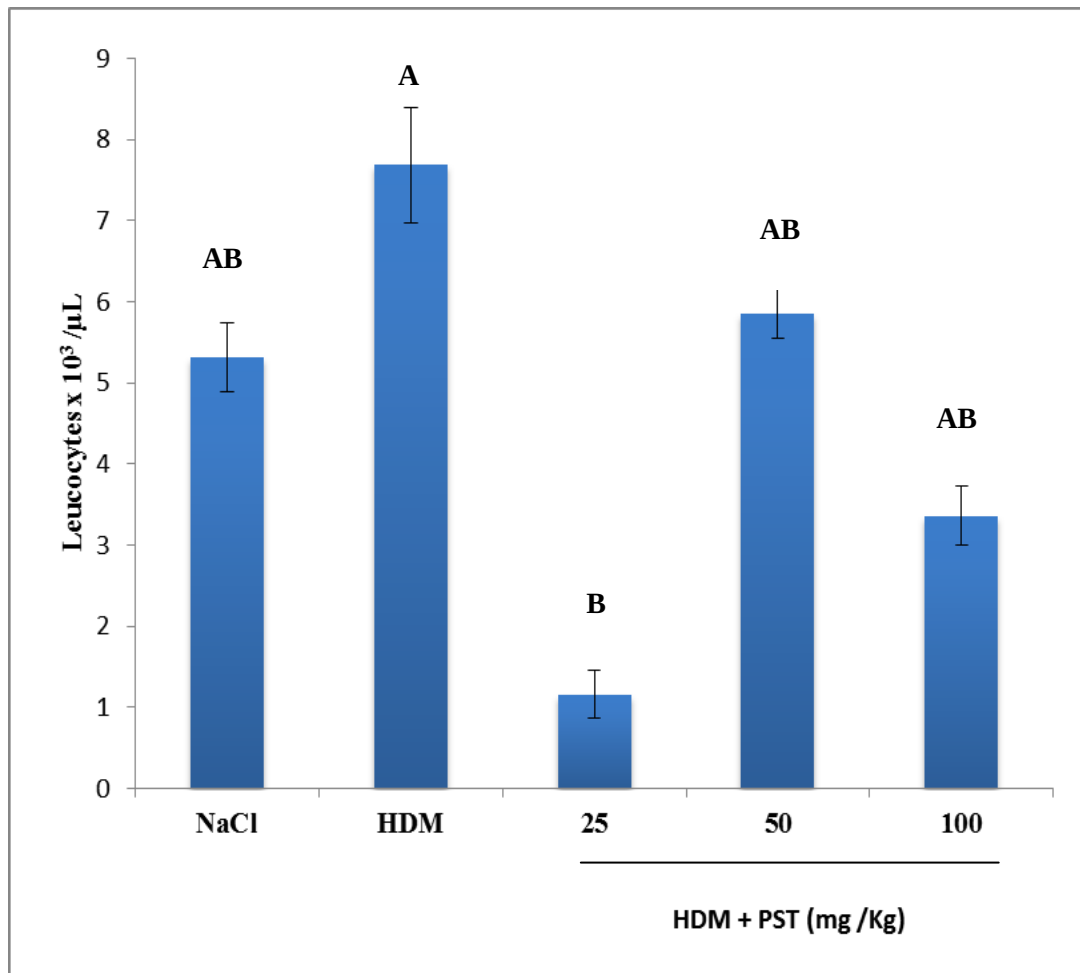


Figure 16 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de leucocytes.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

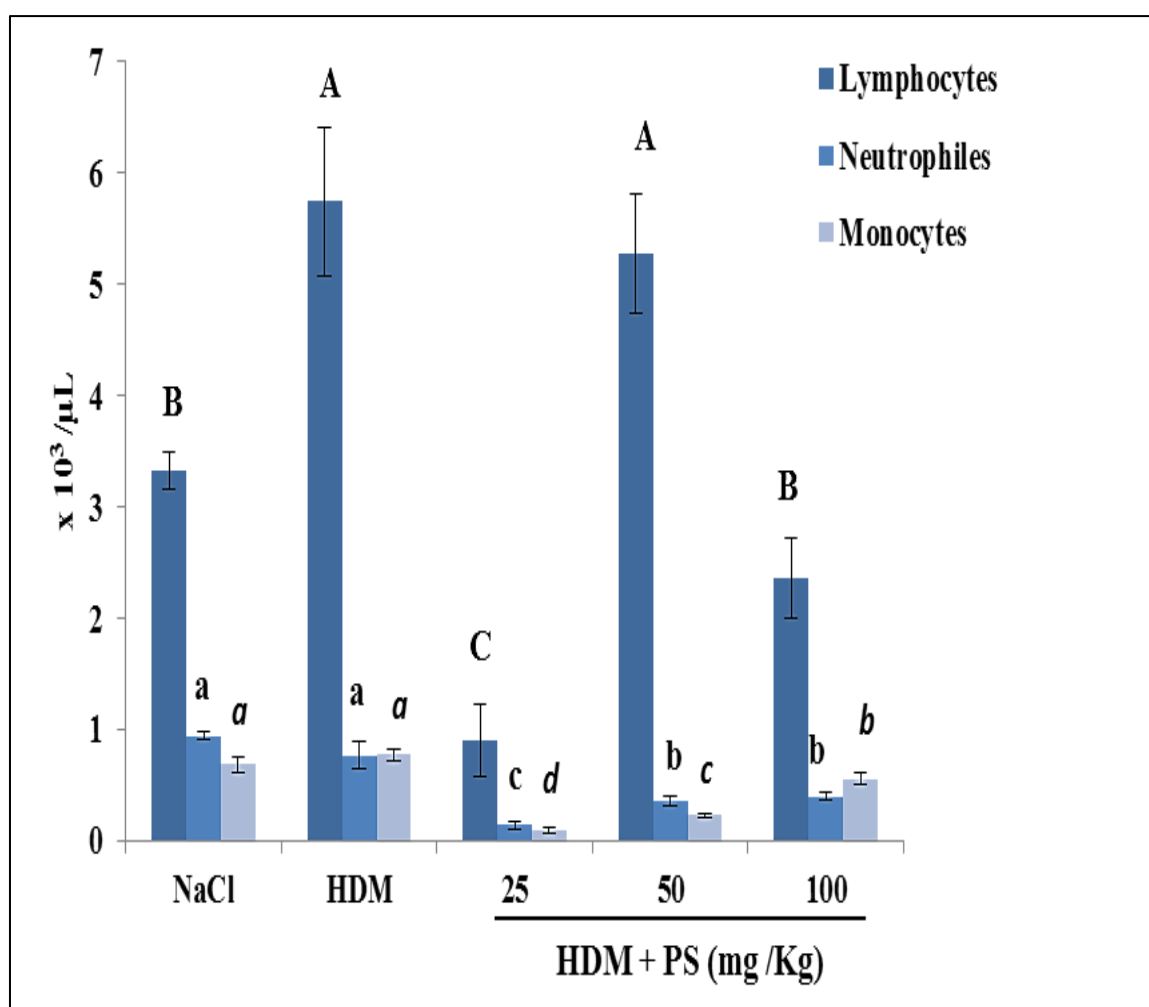


Figure 17 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre des sous populations leucocytaires (monocytes, neutrophiles, lymphocytes).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

2.2.2. Effet sur le nombre de cellules du LN et du LBA

Le nombre de cellules comptées dans le LN et LBA sont représentés dans **(Figure 18)** et **(Figure 19)** respectivement. La viabilité des cellules testées par exclusion au bleu de Trypan était toujours supérieure à 95 %. Brièvement, la sensibilisation à l'HDM a causé une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de cellules du LN ($4,29 \pm 0,30 \times 10^9$ cellules/L) et du LBA ($5,41 \pm 0,52 \times 10^9$ cellules/L) par rapport au groupe sain : $1,55 \pm 0,56 \times 10^9$ cellules/L et $1,26 \pm 0,42 \times 10^9$ cellules/L.

En revanche, l'exposition à l'HDM avec un traitement au PST aux doses 25 et 50 mg/kg, prolonge significativement ($P < 0,05$) cette augmentation de manière dose-dépendante:

$6,8 \pm 0,83 \times 10^9$ cellules /L et $7,02 \pm 0,66 \times 10^9$ cellules/L en LN respectivement, $8,76 \pm 1,05 \times 10^9$ cellules/L et $30,92 \pm 1,46 \times 10^9$ cellules/L dans LBA respectivement, tandis que le traitement avec 100 mg/kg de PST a présenté une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de cellules du LN : $2,5 \pm 0,58 \times 10^9$ cellules/L et du LBA : $2,31 \pm 0,43 \times 10^9$ cellules /L par rapport au groupe HDM.

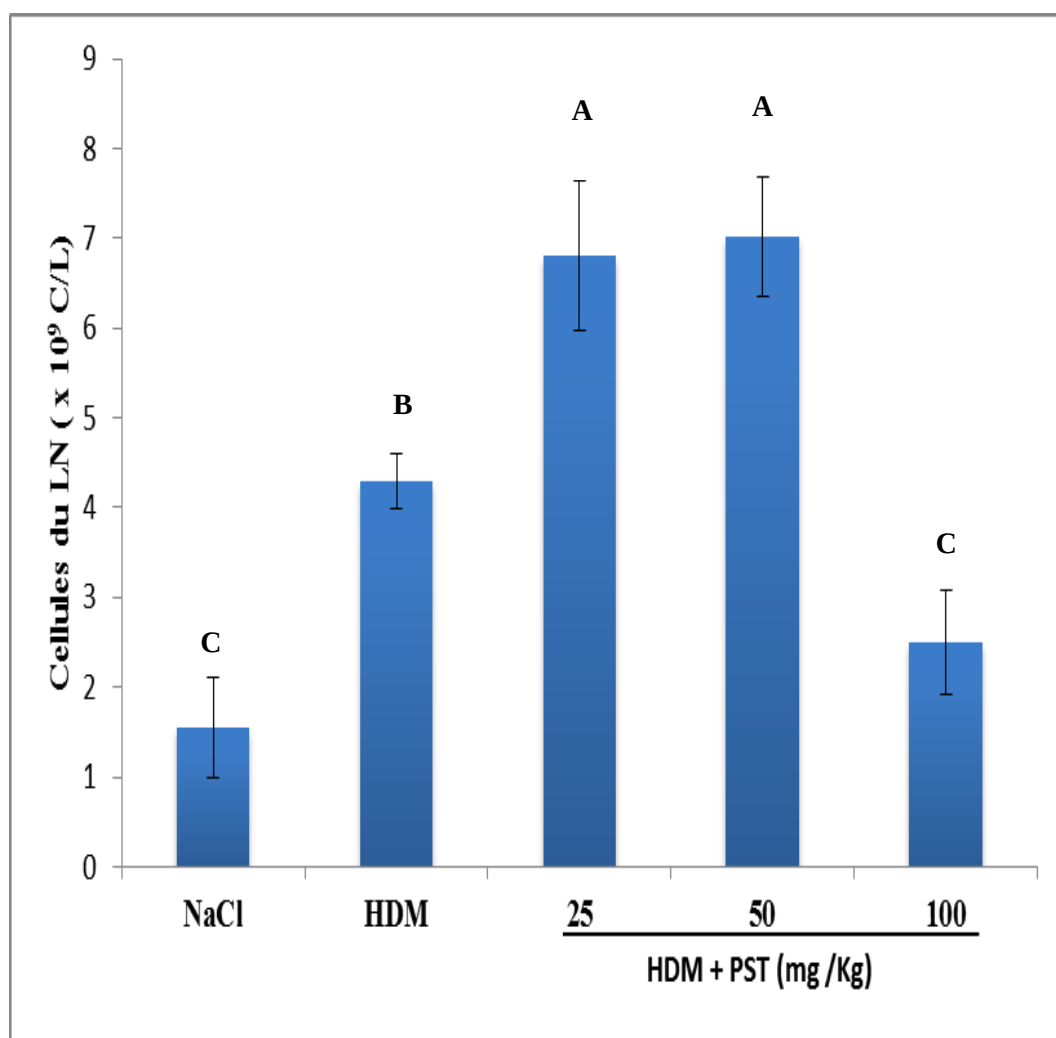


Figure 18 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de cellules du LN (Liquide nasal).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

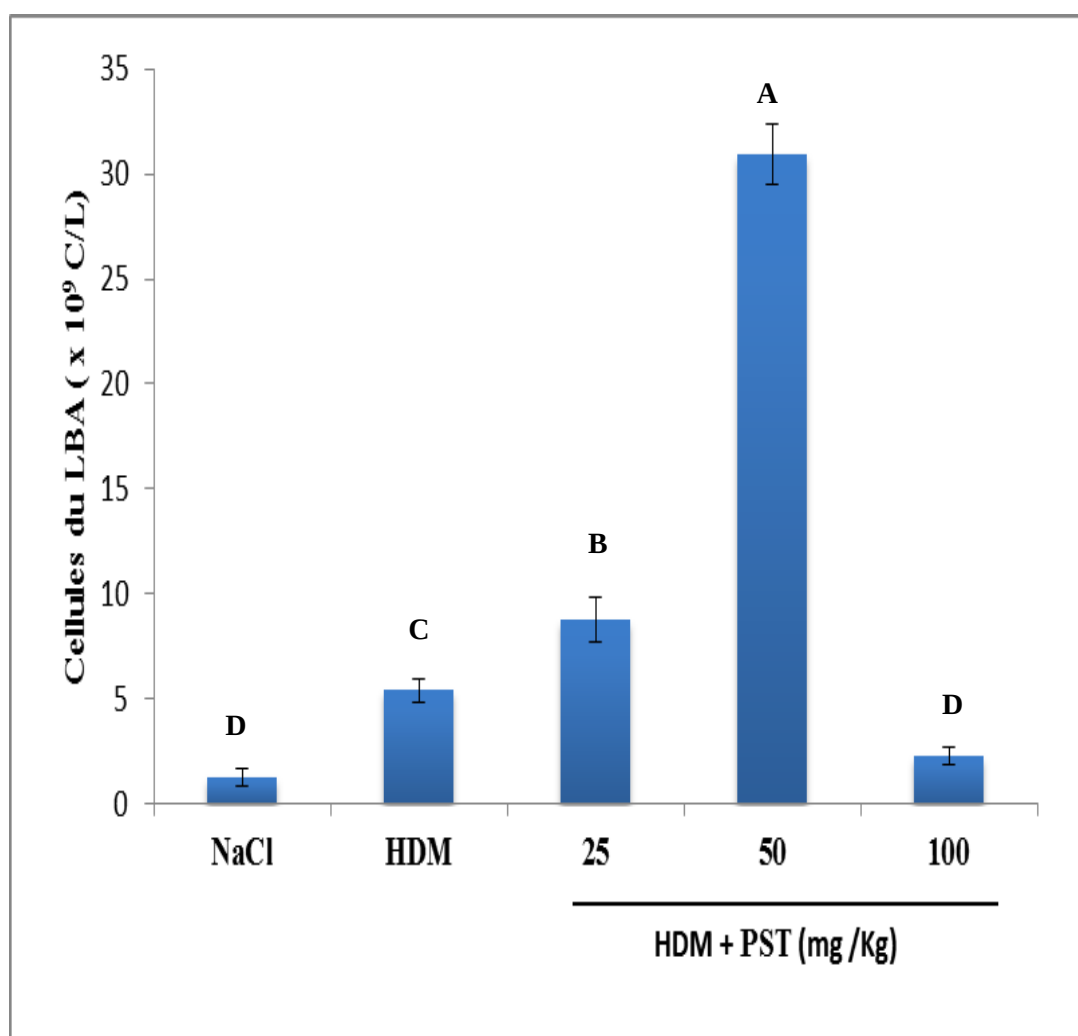


Figure 19 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de cellules du LBA (Liquide bronchoalvéolaire).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

L'augmentation du nombre de cellules comptées dans le LN et le LBA des souris sensibilisées à l'allergène, est la conséquence de la réaction inflammatoire qui l'a induit, et qui se manifeste par un recrutement des cellules inflammatoires vers les sites d'infection. Ce recrutement est facilité par cet allergène (*Der p*), qui provoque une augmentation de la perméabilité de l'épithélium par le clivage de molécules à jonction serrée (occludine, claudine) (**Hammad et Lambrecht, 2008; Pham van, 2010**) ont rapporté que chez les patients atteints d'asthme, le nombre des monocytes et des macrophages dans les poumons est augmenté, et que certains asthmatiques possèdent des neutrophiles dans leurs expectorations. Le nombre de ces derniers augmente dans le LBA et même, dans les biopsies bronchiques des

asthmatiques (**Yahia-sendid, 2015**). Il y a aussi une infiltration de lymphocytes T et d'éosinophiles dans la muqueuse bronchique et présence de mastocytes (**Torres *et al.*, 2005**). (**Kearley *et al.*, 2009**) ont trouvé que les leucocytes totaux et les éosinophiles, ont également augmenté dans le tissu pulmonaire, et même le taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), et ceci après 24 heures de la sensibilisation des souris avec l'ovalbumine.

L'augmentation du nombre de cellules comptées dans le LN et le LBA, chez les souris traitées avec les PST et essentiellement avec les doses (25 et 50 mg/kg), confirme la probabilité d'activation du processus de recrutement des cellules du sang vers les sites inflammatoires par les polysaccharides. **Wasser, (2002)** a constaté que l'infiltration des éosinophiles, des neutrophiles et des granulocytes vers les tissus infectés est également accélérée par le Lentinane, qui active la production de cytokines des macrophages péritonéaux.

Il est clair que ces polysaccharides peuvent agir comme de puissants immunostimulateurs et cet effet peut être contrôlé par la production de chimokines. **Sun *et al.* (2013)** ont rapporté que la chimokine peut être produite au site d'infection ou de blessure, lors d'une réponse immunitaire pour mobiliser des cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes, fibroblastes et kératinocytes), tandis que d'autres ont des rôles homéostatiques tels que la régulation de la migration cellulaire. Dans le même rapport, les auteurs ont découvert que les polysaccharides hydrosolubles du mûrier (JS-MP-1), stimulent la production des macrophages murins (RAW264) de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) de manière dose-dépendante. Les polysaccharides peuvent aussi activer la migration cellulaire par l'activation des cellules endothéliales qui aboutit à l'expression de molécules d'adhérence, qui sont capables d'interagir avec leurs ligands à la surface des leucocytes, et participent à la capture et à l'adhérence des leucocytes sanguins (**Cavaillon et Adib Conquy, 2009**).

2.2.3. Effet sur le poids relatif de la rate et sur le nombre des splénocytes

Les (**Figure 20**) et (**Figure 21**) représentent les résultats du poids relatif de la rate (PRR) des souris, et du nombre de splénocytes comptés respectivement, la viabilité des cellules testée par exclusion au bleu Trypan était supérieure à 95 %.

La sensibilisation des animaux à l'HDM seulement ou combinée avec un traitement au PST à une dose de 50 mg/kg provoque une augmentation significative ($p < 0,05$) du PRR

($0,46 \pm 0,03$ %, $0,54 \pm 0,06$ %) par rapport au groupe sain ($0,28 \pm 0,03$ %). De plus, le challenge à l'HDM a induit une augmentation remarquable du nombre de splénocytes ($13,16 \pm 0,59 \times 10^9$ cellules/L), par rapport au groupe sain ($9,28 \pm 0,3 \times 10^9$ cellules/L). Lorsqu'il y a un traitement de PST à une dose de 50 mg/kg, le nombre de splénocytes a enregistré une augmentation considérable et significative ($P < 0,05$), par rapport au groupe sain d'une part et au groupe HDM d'autre part ($15,41 \pm 0,52 \times 10^9$). Contrairement à cela, le traitement avec les doses 25 et 100 mg/Kg a provoqué une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de splénocytes lorsqu'il a été comparé au groupe HDM : $10,37 \pm 0,33 \times 10^9$ cellules/L et $9,83 \pm 0,4 \times 10^9$ cellules/L respectivement, alors qu'aucune différence n'a été enregistrée en comparaison avec le groupe sain, et même pour le PRR.

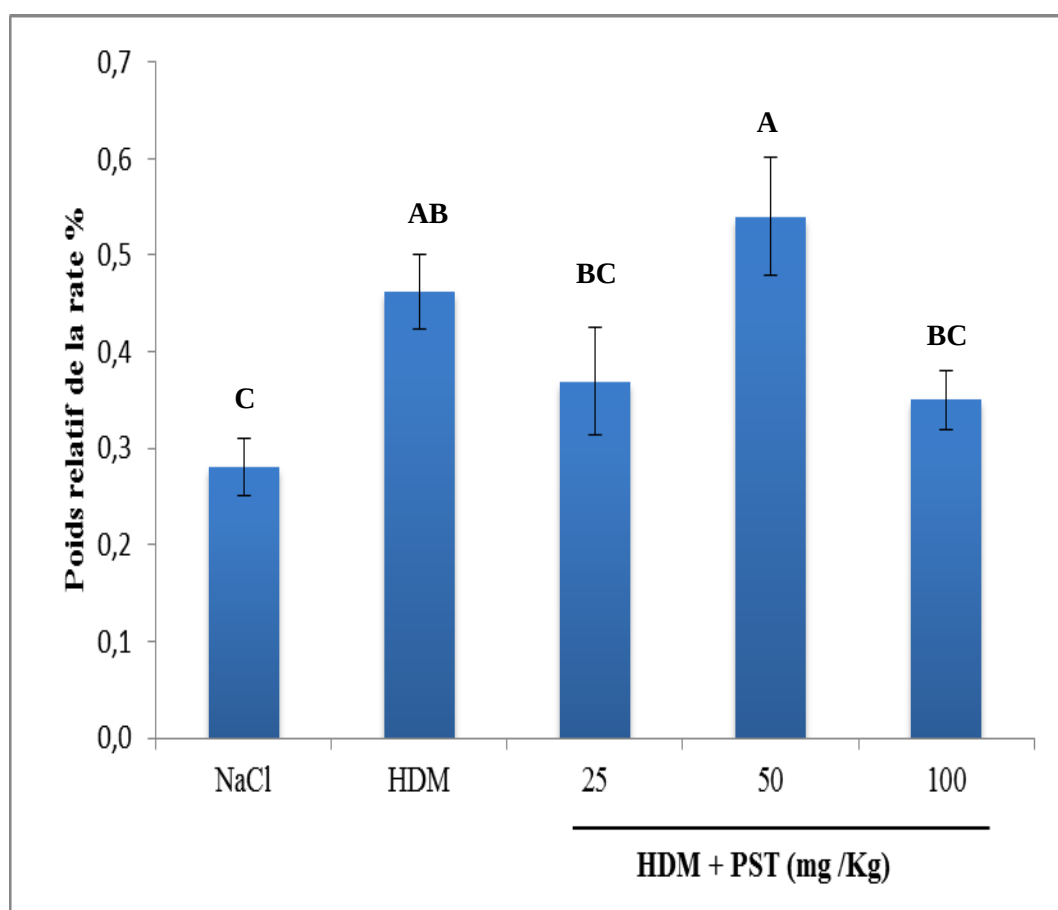


Figure 20 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le poids relatif de la rate.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

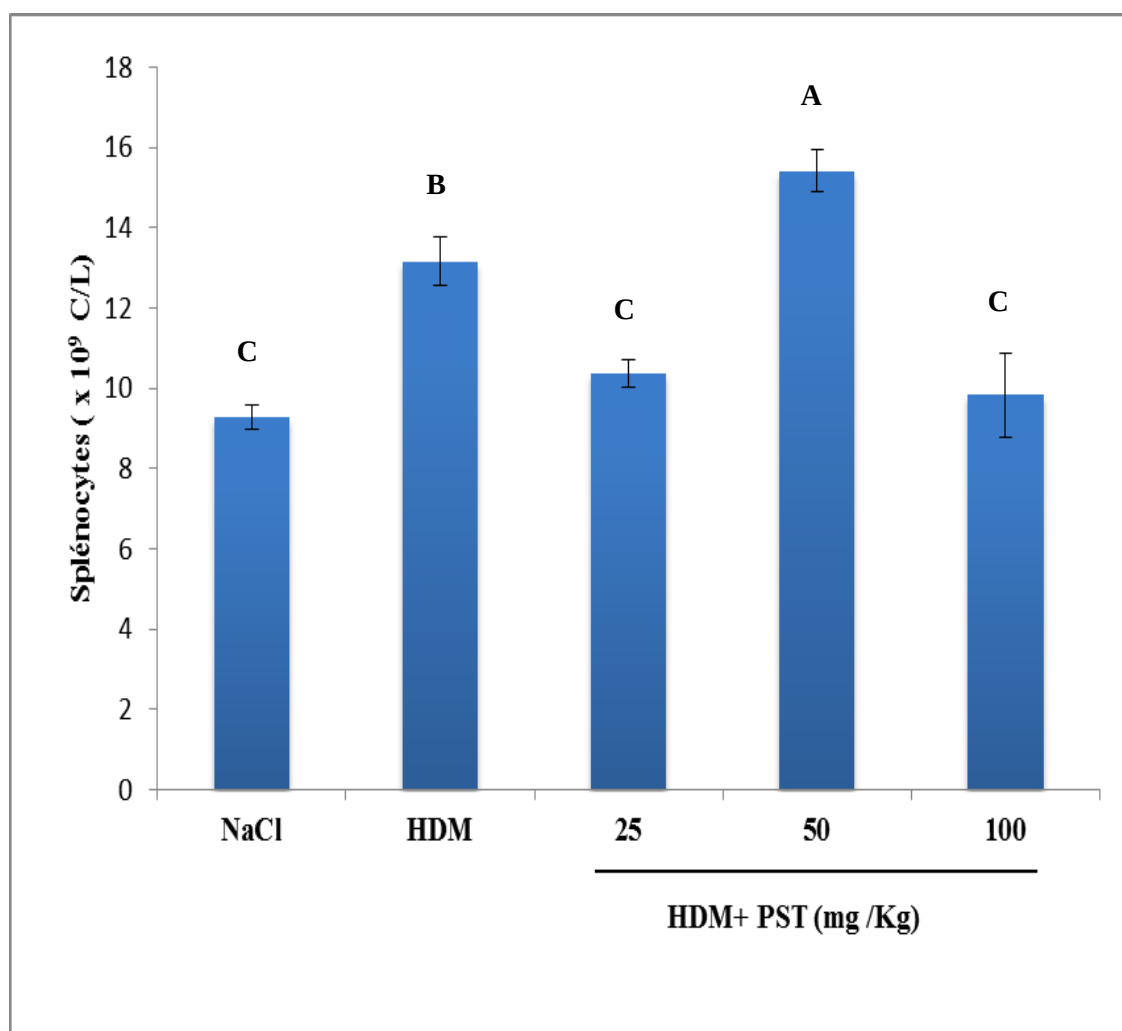


Figure 21 : Effet des PST d'A.p à différentes doses sur le nombre de splénocytes.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

La rate est l'organe lymphoïde le plus grand, elle est composée de deux types de tissus la pulpe blanche et la pulpe rouge ; la pulpe blanche est composé essentiellement de lymphocytes (**Burmester et Puzzutto, 2000**).

L'exposition des souris à l'HDM a entraîné une augmentation significative du nombre de splénocytes, ce qui explique l'augmentation du poids relatif de la rate, et cela est corrélé avec l'augmentation du nombre de lymphocytes sanguins. Les mêmes résultats ont été trouvés par (**Bouguenoun et al., 2016**), ou ils ont noté une augmentation du taux des splénocytes chez les souris immunisées par l'extrait pollinique brut du *C. sempervirens* ainsi que par les différentes fractions, et surtout les fractions (Fr1 et Fr2).

Dans le cas des allergies, cela a été expliqué par la migration des cellules vers des organes lymphoïdes secondaires, pour présenter l'antigène aux lymphocytes TCD4 qui s'activent, conduisant à la mise en place d'une réponse Th2 menant ainsi à l'activation et la différenciation des lymphocytes B spécifiques à l'allergène (**Espinosa et Chillet, 2010**).

Suite à l'administration de PST et plus particulièrement avec la dose 50 mg/kg, une augmentation significative du poids relatif de la rate des souris a été observée, ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Nie et Xie (2011)** et **Zheng et al. (2005)** qui ont remarqué une augmentation de l'indice de la rate et de celui du thymus après administration de polysaccharides, ce qui peut s'expliquer par la stimulation de la prolifération des cellules immunitaires dans la rate. Ces résultats sont confirmés par les tests in vitro de **Bendjeddou et al. (2003)** dans lesquelles des extraits polysaccharidiques à l'eau chaude d'*Anacyclus pyrethrum* et d'*Alpinia galanga* ont amélioré la prolifération des splénocytes murins. De plus, **Meng et al. (2016)** ont rapporté que sous l'effet du Lentinane, une augmentation de la production de lymphocytes T cytotoxiques activés dans la rate a été observée. En revanche, les doses (25 et 100 mg/kg) ont entraîné une diminution du poids relatif de la rate et du nombre de splénocytes par rapport au groupe HDM, pour cette raison, on peut considérer que la dose de 50 mg/kg est la plus immunostimulante.

2.2.4. Effet sur l'aspect macroscopique et microscopique des poumons

La (**Figure 22**) et la (**Figure 23**) démontrent l'effet des PST d'*A.p* à différentes doses (25, 50 et 100 mg/kg) sur l'aspect macroscopique des poumons ainsi que sur l'histopathologie pulmonaire des souris respectivement.

Comme on le voit sur la (**Figure 22.A**), l'aspect pulmonaire des souris saines ne présente aucun symptôme inflammatoire et présente un tissu rose avec quelques taches de sang post-mortem. Des lésions pulmonaires induites par HDM peuvent être remarquées directement dans (**Figure 22.B**) par rapport aux souris saines. Les poumons semblent visiblement enflammés et ils sont couverts de taches rouges vif avec des zones plus sombres. Des signes d'amélioration sont observés chez les poumons de souris traitées avec la dose 25 mg/kg de PST (**Figure 22.C**) et 100 mg/kg (**Figure 22.E**). Le parenchyme pulmonaire des souris traitées avec la dose 50 mg/kg (**Figure 22.D**) a conservé l'aspect rose, et presque sans aucun signe inflammatoire.

La **(Figure 23.A)** représente la section pulmonaire d'une souris saine; il montrait un parenchyme pulmonaire alvéolaire de morphologie et de structure normale caractérisé par une simple congestion vasculaire. Les lumières alvéolaires sont tapissées de cellules pneumocytaires régulières. Les parois bronchiques sont identifiées, bordées par un épithélium pseudostratifié de type respiratoire. Cependant, une hémorragie post-mortem a été notée sur les coupes. La section pulmonaire des souris sensibilisées à l'HDM **(Figure 23.B)** a montré une légère hyperplasie pneumocytaire et des alvéoles distendues entraînant une diminution du diamètre alvéolaire.

L'exposition à cet allergène a entraîné une congestion vasculaire importante constituée de vaisseaux à paroi épaisse englobés par la lumière dans le tissu interstitiel. En effet, une hémorragie interstitielle à certains endroits a été observée favorisant ainsi un infiltrat lymphoplasmocytaire discret.

Chez les poumons des souris traitées avec 25 mg/kg de PST **(Figure 23.C)**, les altérations du parenchyme pulmonaire persistent mais elles sont minimales. Les phénomènes congestifs et hémorragiques sont moins étendus et les dommages alvéolaires sont moins importants. Alors que l'aspect histologique des poumons de souris traitées avec 50 mg/kg **(Figure 23.D)** et 100 mg/kg **(Figure 23.E)** de PST; est presque similaire, le parenchyme est presque à la limite de la normale et ne montre que de discrètes lésions interstitielles alvéolaires avec un discret infiltrat lymphocytaire.

Les dommages tissulaires observés chez les poumons des souris sensibilisées avec l'HDM sont associés à la réponse inflammatoire induite par ce dernier, et qu'elle est caractérisée essentiellement par une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ils sont la conséquence de l'action destructive des protéases sécrétées par certaines cellules immunitaires (neutrophiles essentiellement) qui ont migré vers les poumons afin d'éliminer l'agent pathogène **(Guillon, 2016)**.

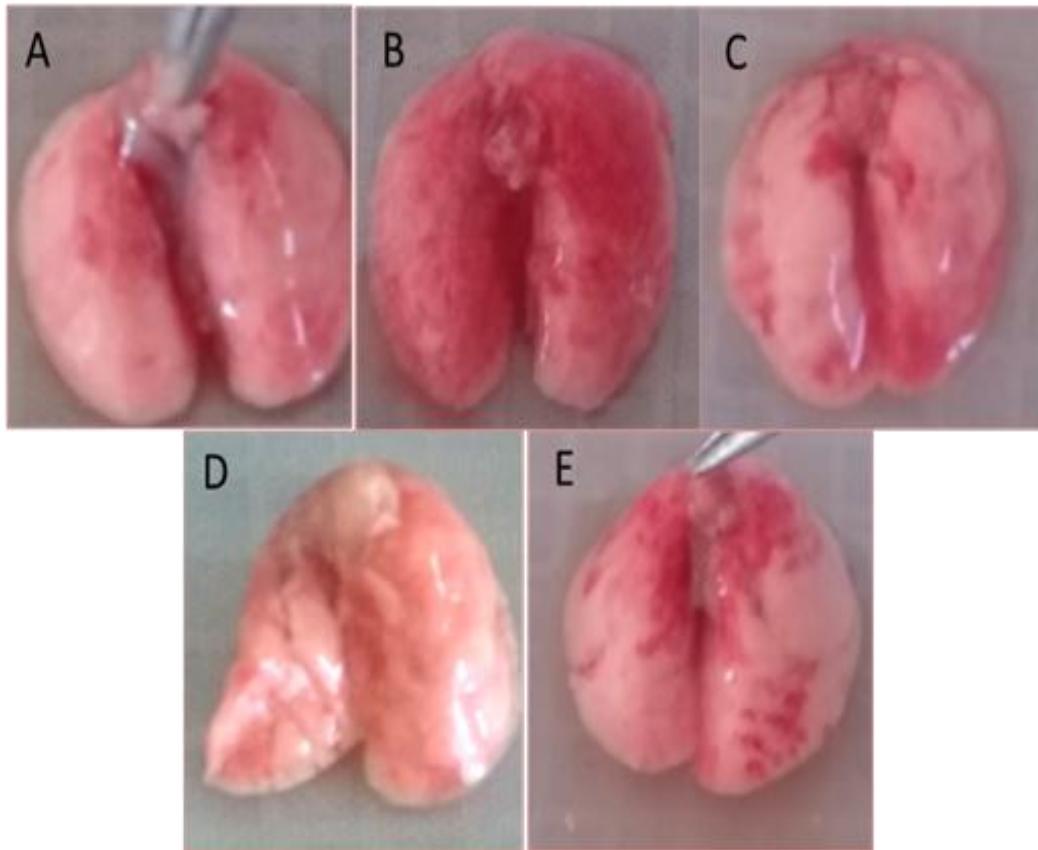


Figure 22 : Effet des PST d'A.p sur l'aspect macroscopique des poumons.

A: traité avec une solution saline (sain), B: sensibilisé avec HDM, C, D, E : sensibilisés avec HDM et traités avec trois doses différentes de PST d'A.p (25, 50 et 100 mg / kg respectivement).

Le traitement avec les polysaccharides d'A.p, et principalement avec une dose de 50 mg/kg, a montré une protection claire du tissu pulmonaire endommagé par l'HDM. Ces observations confirment que ces polysaccharides peuvent avoir un effet régulateur de la réaction inflammatoire induite par cet allergène. Cette activité anti-inflammatoire est probablement due à l'activation des cellules T régulatrices (Treg) qui sont des acteurs clés de la régulation immunitaire. Plusieurs études ont suggéré que l'apparition de l'asthme chez l'homme pourrait être liée à un développement insuffisant des cellules T régulatrices ou/et à l'inhibition de leur fonction (**Yahia-sendid, 2015**).

Ces cellules migrent vers des sites périphériques pour réguler l'inflammation des tissus lésés, et pour maintenir la tolérance périphérique au niveau des muqueuses (**Cottrez et Grou, 2004**). Les LTreg agissent de 2 manières : par leur effet cytotoxique (production de perforine et de granzyme) ou par la production de cytokines inhibitrices (IL-10 et TNF).

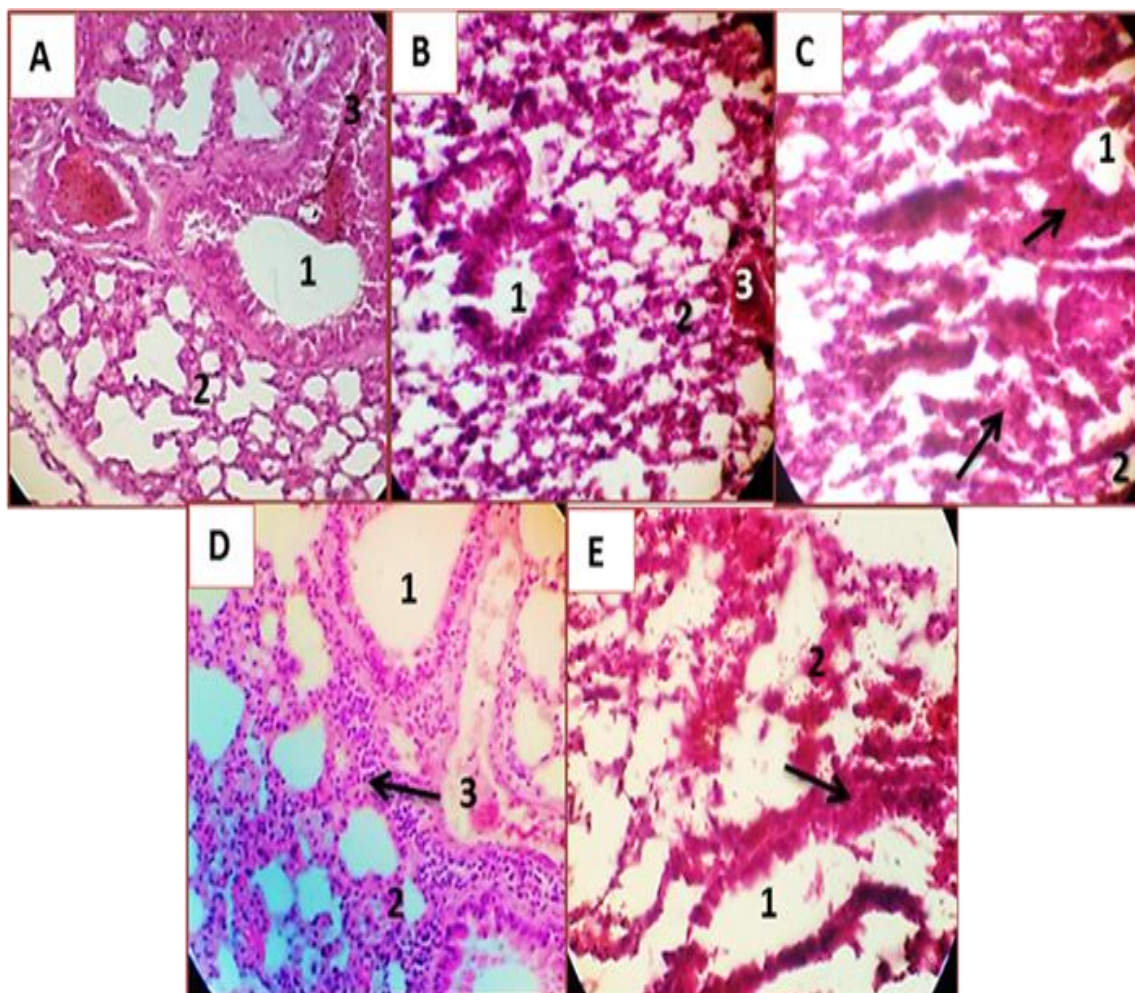


Figure 23 : Effet des PST d'A.p sur l'aspect microscopique des poumons.

A: traité avec une solution saline (sain), B: sensibilisé avec HDM, C, D, E : sensibilisés avec HDM et traités avec trois doses différentes de PST d'A.p (25, 50 et 100 mg / kg respectivement). 1- Bronchiole, 2-Alvéole, 3- vaisseaux sanguins, → - Infiltration cellulaire.

2.3. Effet du traitement avec les fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2)

2.3.1. Effet sur la formule leucocytaire

La sensibilisation à l'HDM a provoqué une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre des leucocytes sanguins: $7,68 \pm 0,71 \times 10^3$ C/ μ l, en comparaison avec le groupe sain : $5,31 \pm 0,42 \times 10^3$ C/ μ l, alors que les différents traitements, avec les deux fractions polysaccharidiques (F1 et F2 : 50mg/kg) ou avec le corticoïde (Physiolone : 2 ml/kg) ont causé une diminution de leur nombre, par rapport au groupe HDM : $5,85 \pm 0,23 \times 10^3$ C/ μ l,

$7,53 \pm 0,11 \times 10^3$ C/ μ l, $7,16 \pm 0,23 \times 10^3$ C/ μ l respectivement, mais seulement avec la F1 que cette diminution est significative ($p < 0,05$) (**Figure 24**).

Le nombre des neutrophiles et lymphocytes sanguins pour chaque lot est représenté dans la (**Figure 25**). La sensibilisation à l'HDM a induit une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de lymphocytes ($5,74 \pm 0,67 \times 10^3$ C/ μ l), en comparaison avec le groupe sain ($3,33 \pm 0,16 \times 10^3$ C/ μ l), tandis que les différents traitements (avec F1, F2 et le corticoïde) ont causé une diminution significative ($p < 0,05$), par rapport au groupe HDM : $3,79 \pm 0,29 \times 10^3$ C/ μ l, $3,77 \pm 0,20 \times 10^3$ C/ μ l, $3,57 \pm 0,10 \times 10^3$ C/ μ l respectivement.

En ce qui concerne les neutrophiles, on n'a pas enregistré une différence significative entre le groupe sain et le groupe HDM : $0,94 \pm 0,04 \times 10^3$ C/ μ l, $0,77 \pm 0,12 \times 10^3$ C/ μ l, alors que les différents traitements (avec F1, F2 et le corticoïde) associés à une sensibilisation à l'HDM, ont provoqué une augmentation significative ($p < 0,05$), dans un ordre croissant : $1,83 \pm 0,15 \times 10^3$ C/ μ l, $3,29 \pm 0,11 \times 10^3$ C/ μ l, $3,64 \pm 0,16 \times 10^3$ C/ μ l.

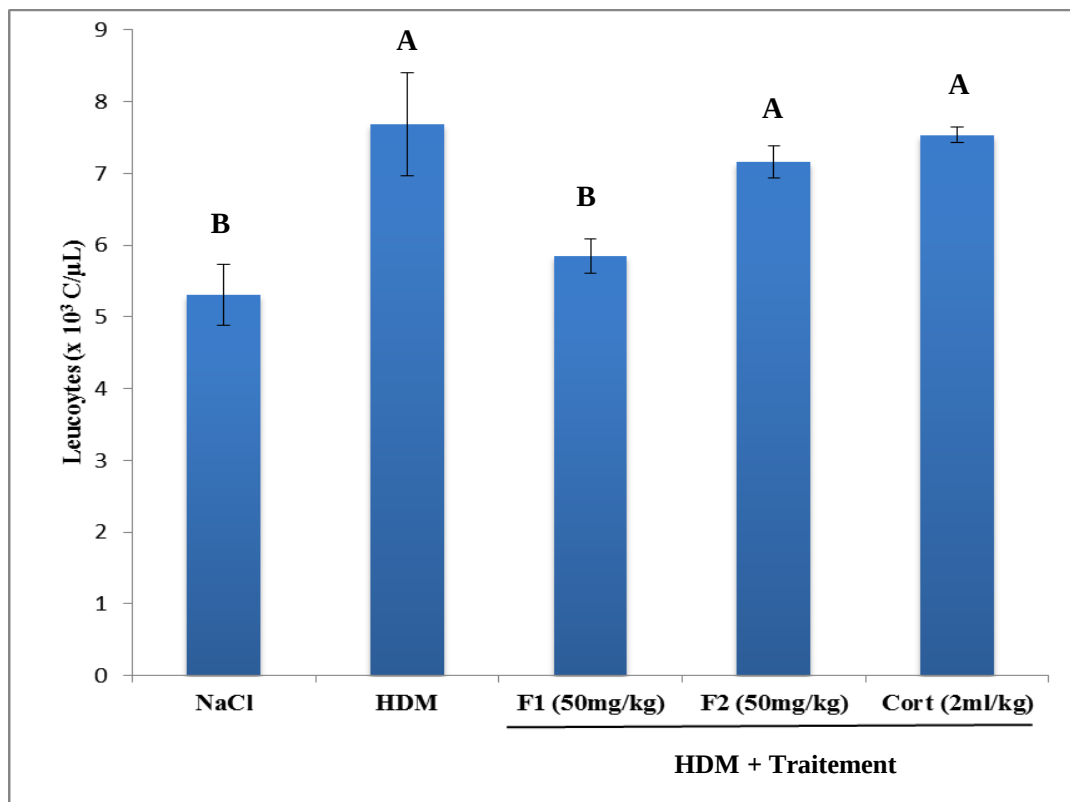


Figure 24 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de leucocytes sanguines.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

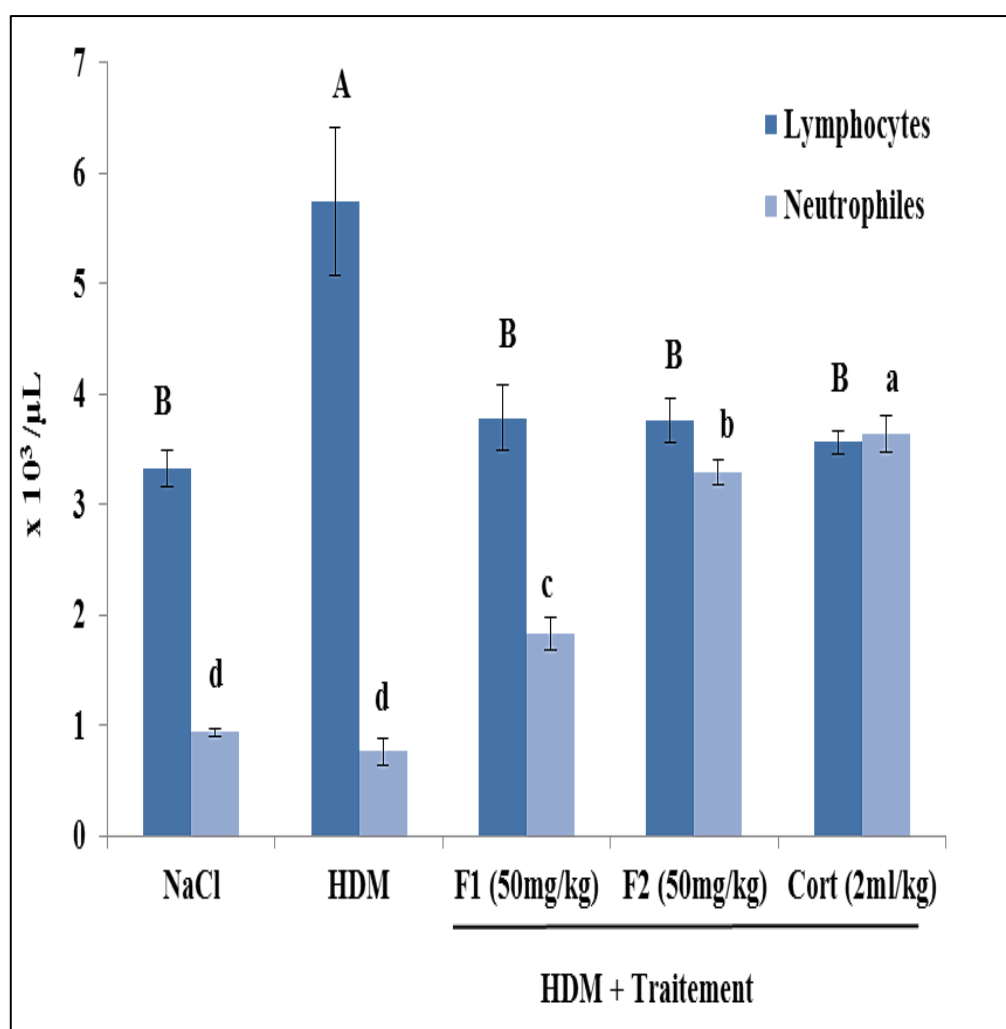


Figure 25 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre des neutrophiles et des lymphocytes sanguins.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

L'augmentation du nombre de leucocytes sanguins et même des lymphocytes est le résultat d'une réaction immunitaire inflammatoire causée par l'exposition des souris à un allergène, alors que les différents traitements à base de fractions polysaccharidiques ou de corticoïde (Physiolone) ont causé la diminution de leurs nombres. Les glucocorticoïdes sont connus par leurs effet lymphopéniant par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. **(Guilpain et Le Jeunne, 2012; Bloemena et al., 1990)** ont constaté le même effet chez les lapins traités avec Prednisolone, cette lymphopénie est produite suite au piégeage des lymphocytes circulants dans les organes lymphoïdes.

(**Cohen et Duck, 1984**) ont rapporté que l'utilisation des corticoïdes à forte concentration entraîne une activation des endonucléases qui causent une fragmentation de l'ADN, ce qui provoque une lymphopénie.

Pour les neutrophiles sanguins, on a constaté une augmentation de leur nombre après traitement avec les deux fractions polysaccharidiques, alors que cette augmentation est plus importante avec Physiolone, en comparaison avec les souris non traitées et sensibilisées avec l'HDM. Les glucocorticoïdes causent une augmentation des polynucléaires sanguins circulants en accélérant leur sortie du pool de stockage médullaire et en diminuant leur sortie de la circulation sanguine (**Thomasson, 2011**). Ils diminuent l'adhésion des polynucléaires neutrophiles (PNN) en réduisant l'expression de la L-sélectine sur les PNN et de la P-sélectine sur les cellules endothéliales ce qui diminue leurs diapédèse (**Guilpain et Le Jeune, 2012**). On suggère que ces fractions polysaccharidiques exercent le même effet d'une façon plus contrôlée.

2.3.2. Effet sur le nombre de cellules du LN et LBA

Le nombre de cellules comptées dans le LN et le LBA sont représentés dans les (**Figure 26**) et (**Figure 27**) respectivement. La viabilité des cellules testées par exclusion au bleu de Trypan était toujours supérieure à 95%. Brièvement, la sensibilisation à l'HDM a causé une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de cellules du LN ($4,29 \pm 0,30 \times 10^9$ cellules/L) et du LBA ($5,41 \pm 0,52 \times 10^9$ cellules/L) par rapport au groupe de souris saines : $1,55 \pm 0,56 \times 10^9$ cellules/L et $1,26 \pm 0,42 \times 10^9$ cellules/L.

En revanche, l'exposition à l'HDM avec un traitement à base de fractions F1 et F2, a causé une diminution singnificative ($p < 0,05$) du nombre de cellules comptées dans le LN ($1,93 \pm 0,38 \times 10^9$ cellules/L, $2,32 \pm 0,24 \times 10^9$ cellules/L), et même dans le LBA ($1,88 \pm 0,21 \times 10^9$ cellules/L, $2,29 \pm 0,13 \times 10^9$ cellules/L) respectivement, en comparaison avec le groupe HDM, tandis que le nombre de cellules comptées chez le groupe traité avec le corticoïde a enregistré des valeurs plus élevées par rapport aux groupes traités avec les fractions F1 et F2 dans le LN d'une part : $3,21 \pm 0,25 \times 10^9$ cellules/L, et même dans le LBA d'autre part : $3,43 \pm 0,28 \times 10^9$ cellules/L.

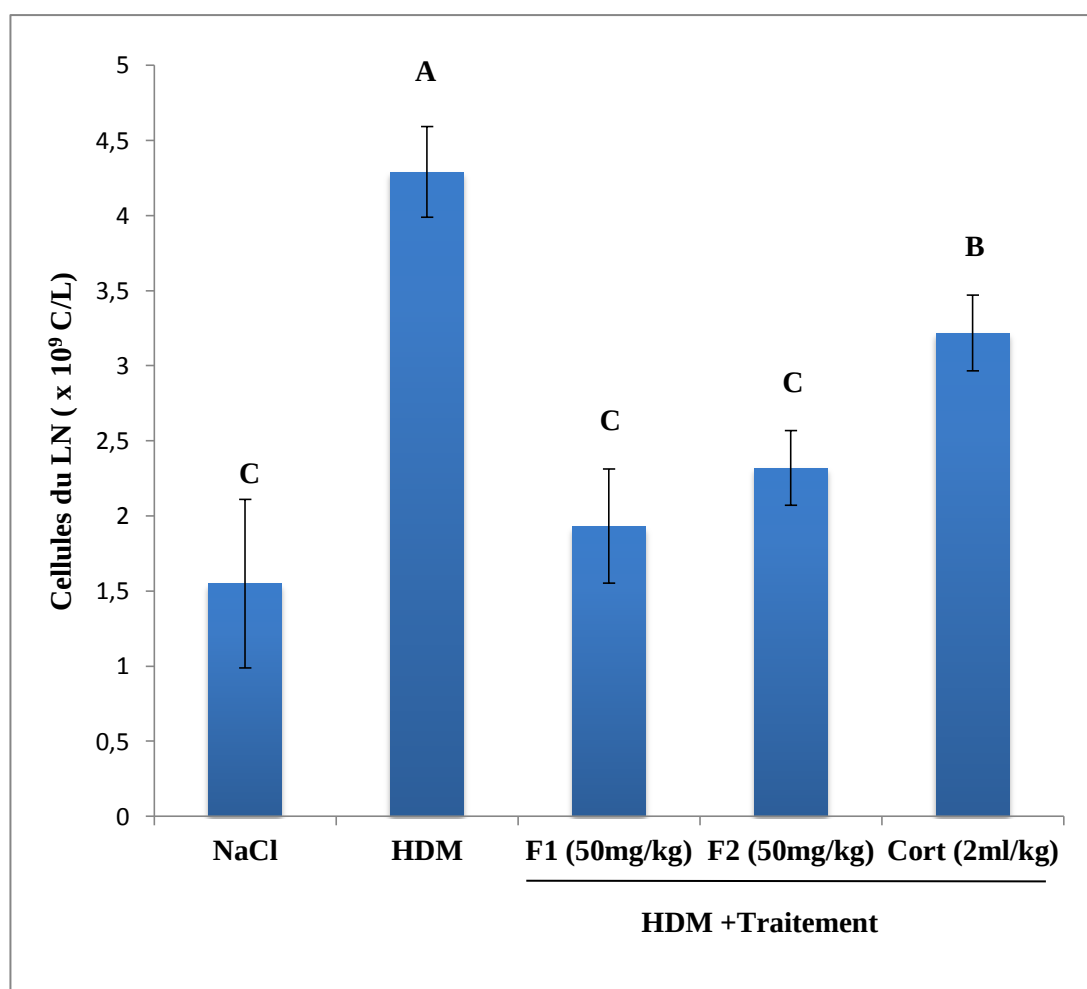


Figure 26 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'*A.p* (F1 et F2) sur le nombre de cellules du liquide nasal (LN).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

L'augmentation du nombre de cellules au niveau des sites d'infection respiratoire est observée suite à une provocation allergénique induite par *Der p*, les cellules recrutées sur le foyer inflammatoire sont localement actives et participent à l'entretien du processus inflammatoire.

La diminution du nombre de cellules comptées au sein du LN et LBA des souris traitées avec les deux fractions polysaccharidiques F1 et F2 et avec le corticoïde, est probablement due à l'inhibition de leur migration. **Mohammed et al., (2021)** ont rapporté que les polysaccharides sulfatés dérivés d'algues présentent leur effet anti-inflammatoire en interférant avec la migration des leucocytes vers les sites d'inflammation.

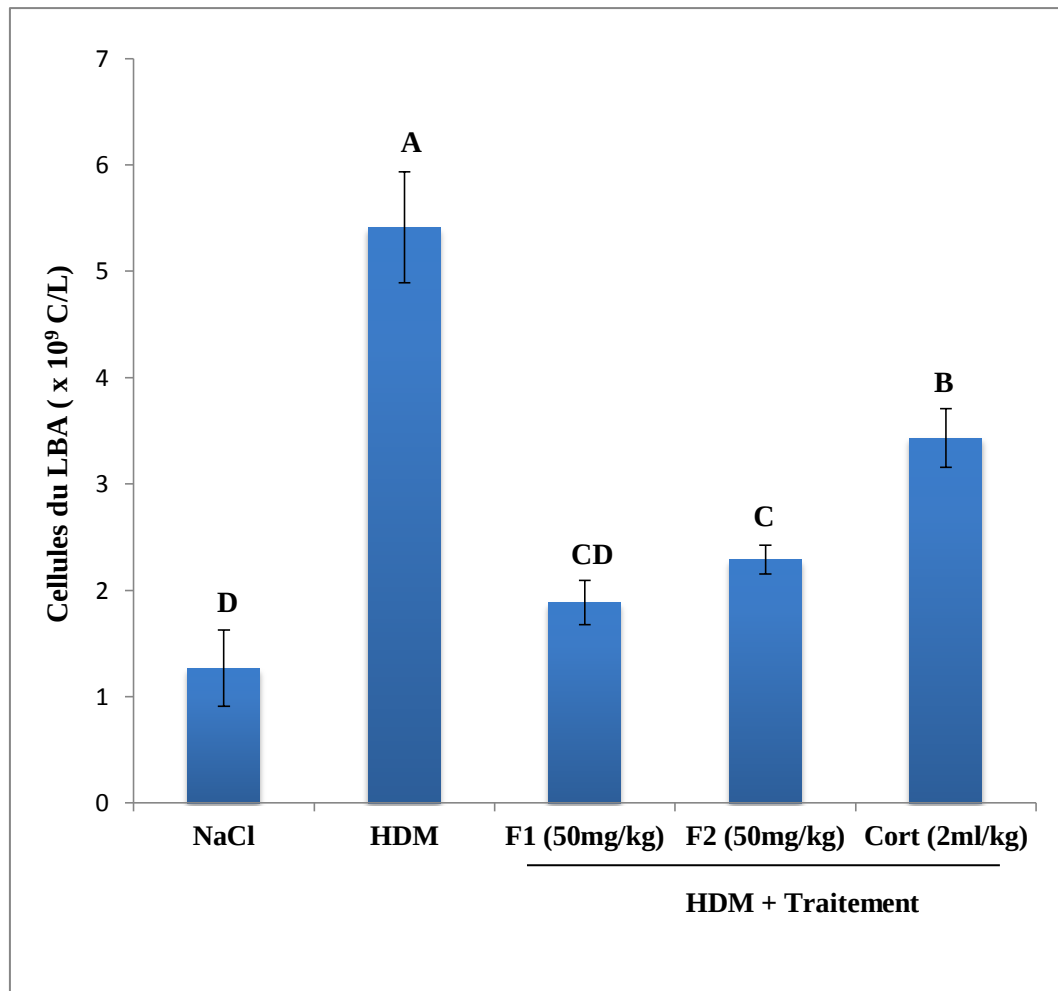


Figure 27 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de cellules du liquide bronchoalvéolaire (LBA).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Autre polysaccharides diminuent l'infiltration des cellules inflammatoires par l'inhibition de certains médiateurs inflammatoires comme IL-1b, IL-6, TNF α (**Ullah et al., 2019**) et même par l'inhibition de l'expression de certains facteurs d'adhérence et de chimotactisme, et l'activité de certaines enzymes impliquées dans le processus inflammatoire (**Chen et al., 2016**). L'inhibition de l'adhérence des leucocytes qui est l'une des premières étapes dans l'initiation de la réponse inflammatoire, empêche l'accumulation des cellules immunitaires actives au niveau des sites inflammatoires (**Wu et al., 2007**).

Cela est corrélé avec le nombre élevé de neutrophiles sanguins, ce qui confirme que ces fractions polysaccharidiques inhibent leur migration vers les muqueuses dans un contexte anti-inflammatoire. Cet effet inhibiteur est plus remarqué chez les animaux traités avec le corticoïde (Physiolone), ces médicaments diminuent la vasodilatation et la perméabilité vasculaire et réduisent le chimiotactisme des leucocytes (**Guilpain et le Jeunne, 2012**), ce qui entraînent une diminution de la mobilité des cellules impliquées dans l'inflammation (**Coumba, 2008**).

2.3.3. Effet sur le poids relatif de la rate et sur le nombre de splénocytes

D'après les résultats du poids relatif de la rate (PRR) et des splénocytes, présentés dans les (**Figure 28**) et (**Figure 29**) respectivement, on constate que chez les animaux sensibilisés avec HDM, une augmentation significative du PRR ($0,46 \pm 0,03$ %), et des splénocytes comptés ($13,16 \pm 0,59 \times 10^9$ cellules/L), en comparaison avec le groupe sain ($0,28 \pm 0,03$ % et $9,28 \pm 0,3 \times 10^9$ cellules/L).

Le traitement avec la F1 à une dose de 50 mg/kg, provoque une augmentation significative ($p < 0,05$) du PRR ($0,77 \pm 0,02$ %) et même des splénocytes ($15,55 \pm 1,16 \times 10^9$ cellules/L) par rapport au groupe HDM, alors que chez les groupes traités avec la deuxième fraction ou avec le corticoïde, on n'a pas enregistré une différence significative ($p < 0,05$) pour le nombre de splénocytes ($13,94 \pm 0,78 \times 10^9$ cellules/L, $11,27 \pm 0,25 \times 10^9$ cellules/L respectivement), et même pour le PRR chez le groupe traité avec la F2 ($0,53 \pm 0,04$ %), alors que le traitement avec le corticoïde a diminué significativement ($p < 0,05$) le PRR par rapport au groupe HDM ($0,30 \pm 0,02$ %). La viabilité des cellules testées par exclusion au bleu Trypan était toujours supérieure à 95 %.

L'augmentation du nombre de splénocytes et par conséquent le poids relatif de la rate, est probablement due à la sensibilisation des souris à l'allergène (*Der p*) et l'installation d'une réponse immunitaire, cette augmentation est plus remarquée chez les souris traitées avec la F1, et elle renseigne sur une activité de prolifération de toutes les cellules lymphocytaires dans la rate y compris les LTreg (**Bendjeddou et al., 2003**).

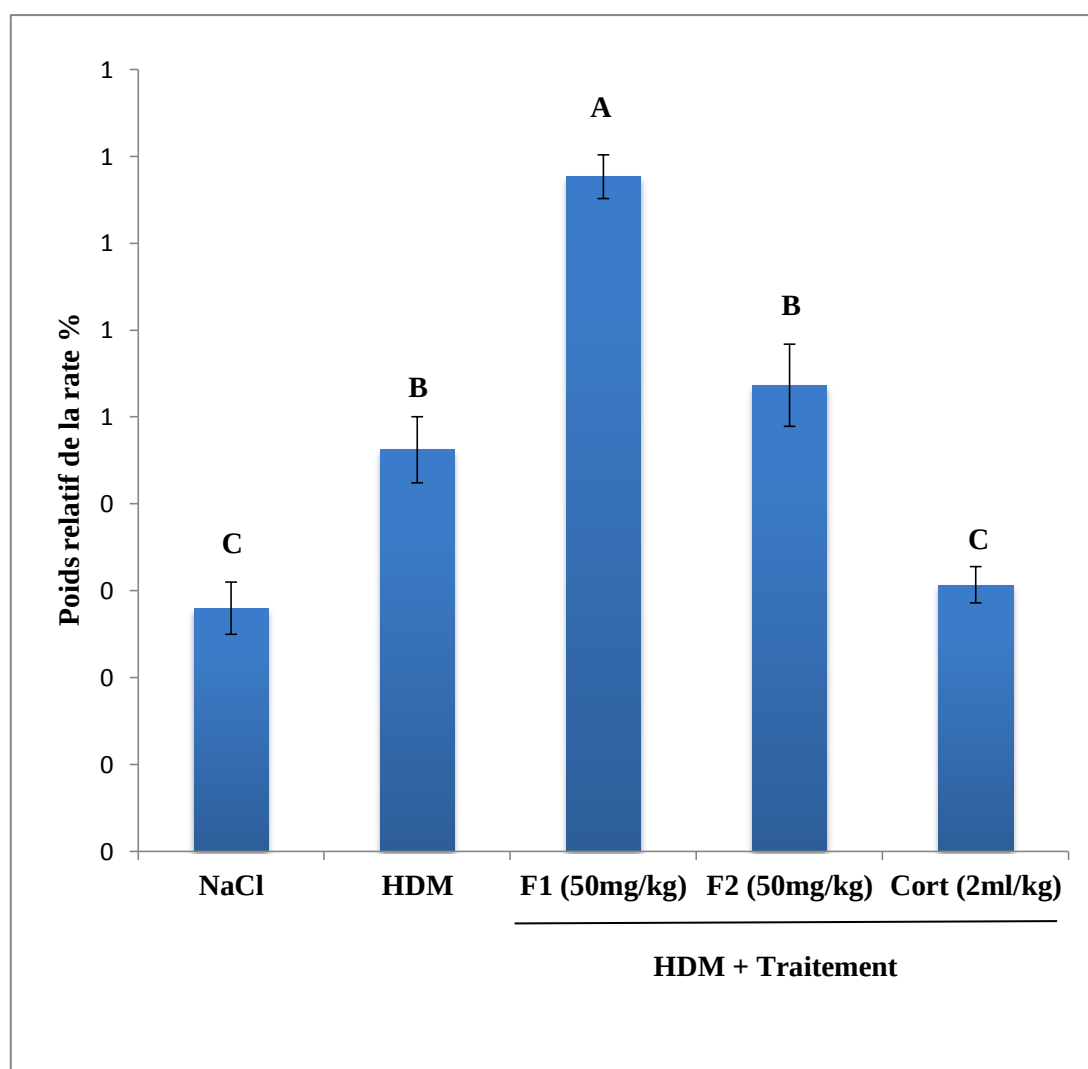


Figure 28 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'*A.p* (F1 et F2) sur le poids relatif de la rate (PRR).

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

On peut considérer donc cette fraction polysaccharidique comme un agent à potentiel anti-inflammatoire et immunostimulant à la fois. **Chi et al., (2015)** ont rapporté que les polysaccharides peuvent stimuler les cellules immunitaires via certaines voies de signalisation, qui ne sont pas encore bien déterminées. Ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunitaires comme les lymphocytes, car ils ne peuvent pas pénétrer dans les cellules, grâce à la structure moléculaire complexe qu'ils possèdent (**Sanchez, 2006**). La diminution du PRR et du nombre de cellules spléniques chez les souris sensibilisées avec l'HDM et traitées avec Physiolone confirme son effet lymphopéniant.

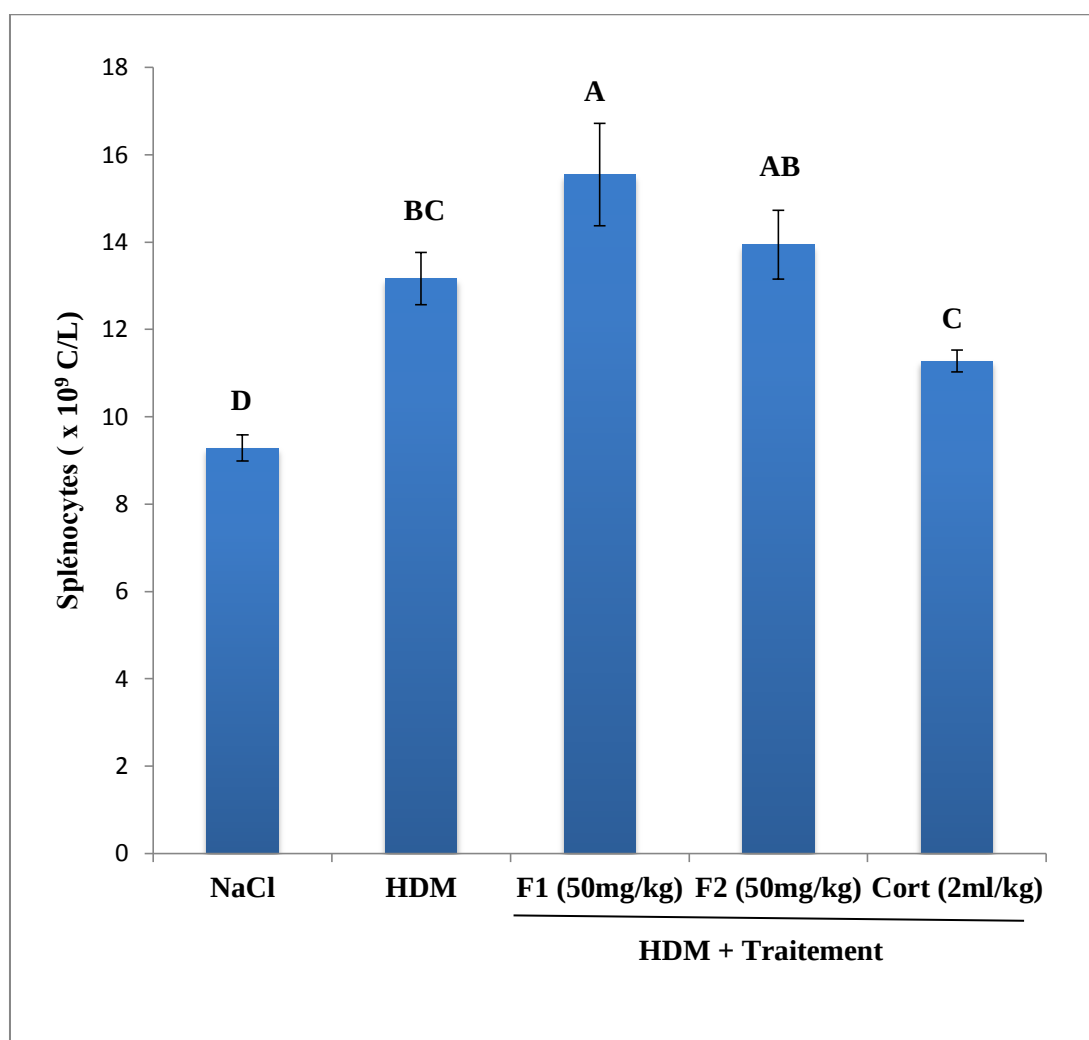


Figure 29 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur le nombre de splénocytes.

Les données sont présentées en moyennes $\pm$ SD. Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

2.3.4. Effet sur l'aspect macroscopique et microscopique des poumons

La (Figure 30) et la (Figure 31) démontrent l'effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p à une dose de 50 mg/kg sur l'aspect macroscopique des poumons, et ainsi sur l'histopathologie pulmonaire des souris respectivement.

L'aspect pulmonaire des souris saines ne présente aucun symptôme inflammatoire et présente un tissu rose avec quelques taches de sang post-mortem (Figure 30.A). Des lésions

pulmonaires induites par HDM peuvent être remarquées directement dans **(Figure 30.B)** par rapport aux souris saines. Les poumons semblent visiblement enflammés et ils sont couverts de taches rouges vif avec des zones plus sombres.

Des signes d'amélioration sont observés sur les poumons des souris traitées par la F2 **(Figure 30.D)** et avec Physiolone **(Figure 30.E)** ; Les poumons ont un aspect rose-brunâtre avec quelques taches parsemées. L'aspect des poumons des souris traitées par la fraction F1 est similaire à l'apparence des poumons des témoins sains ; le parenchyme pulmonaire est mou et a gardé l'aspect rose sans aucun signe inflammatoire **(Figure 30.C)**.

La **(Figure 31)** représente les coupes histologiques des poumons des différents lots de souris étudiés, les poumons des souris saines ont révélé un parenchyme pulmonaire alvéolaire de morphologie et de structure normale, caractérisé par une simple congestion vasculaire, la structure semble normale avec absence d'infiltrat cellulaire. Néanmoins, une hémorragie post-mortem a été constatée sur les coupes **(Figure 31.A)**. La sensibilisation à l'allergène a causé une congestion vasculaire, une diminution du diamètre alvéolaire et une hémorragie interstitielle favorisant ainsi un discret infiltrat lymphocytaire **(Figure 31.B)**.

L'aspect histologique des animaux traités par la fraction F1 est presque identique à celui observé au niveau des structures pulmonaires des témoins sains. Ainsi cet aspect est celui d'un parenchyme pulmonaire alvéolaire de morphologie et de structure quasi-normale avec des parois bronchiques de diamètre normales. Toutefois, des lésions moins importantes ont été notées avec une ectasie **(Figure 31.C)**.

Chez les souris traitées par la fraction F2, l'analyse histologique a signalé la présence d'un infiltrat inflammatoire se trouvant essentiellement au niveau des bronchioles et des vaisseaux. Une diminution du diamètre alvéolaire a été observée et présence des macrophages à ce niveau, une congestion vasculaire a été également constatée **(Figure 31.D)**.

Chez les souris traitées par le corticoïde, des phénomènes congestifs et hémorragiques moins étendus avec un dommage alvéolaire moins important ont été remarqué. Un discret infiltrat inflammatoire à prédominance lymphocytaire péribronchiolaire a été observé après l'analyse microscopique **(Figure 31.E)**.

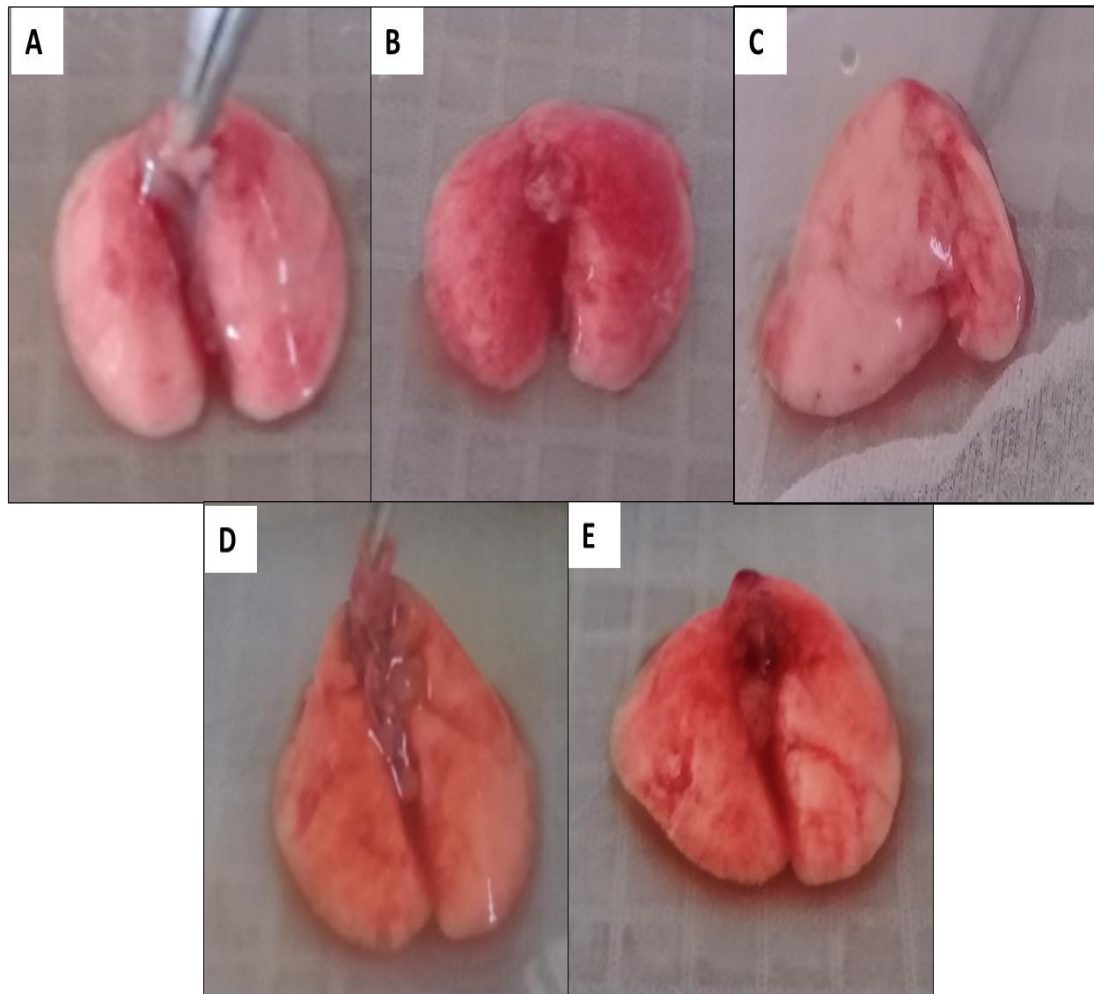


Figure 30 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect macroscopique des poumons.

A: traité avec une solution saline (sain), B: sensibilisé avec HDM, C, D: sensibilisés avec HDM et traités avec les fractions polysaccharidiques F1 et F2 à la dose 50 mg / kg, E : sensibilisé avec HDM et traités avec un corticoïde à une dose de 2 ml / kg.

Tous les changements tissulaires observés au niveau des poumons, de toutes les souris exposées à l'allergène avec traitement ou sans traitement, seraient associés au recrutement et à l'activation des cellules inflammatoires conduisant à une inflammation respiratoire (Borish et Culp, 2008).

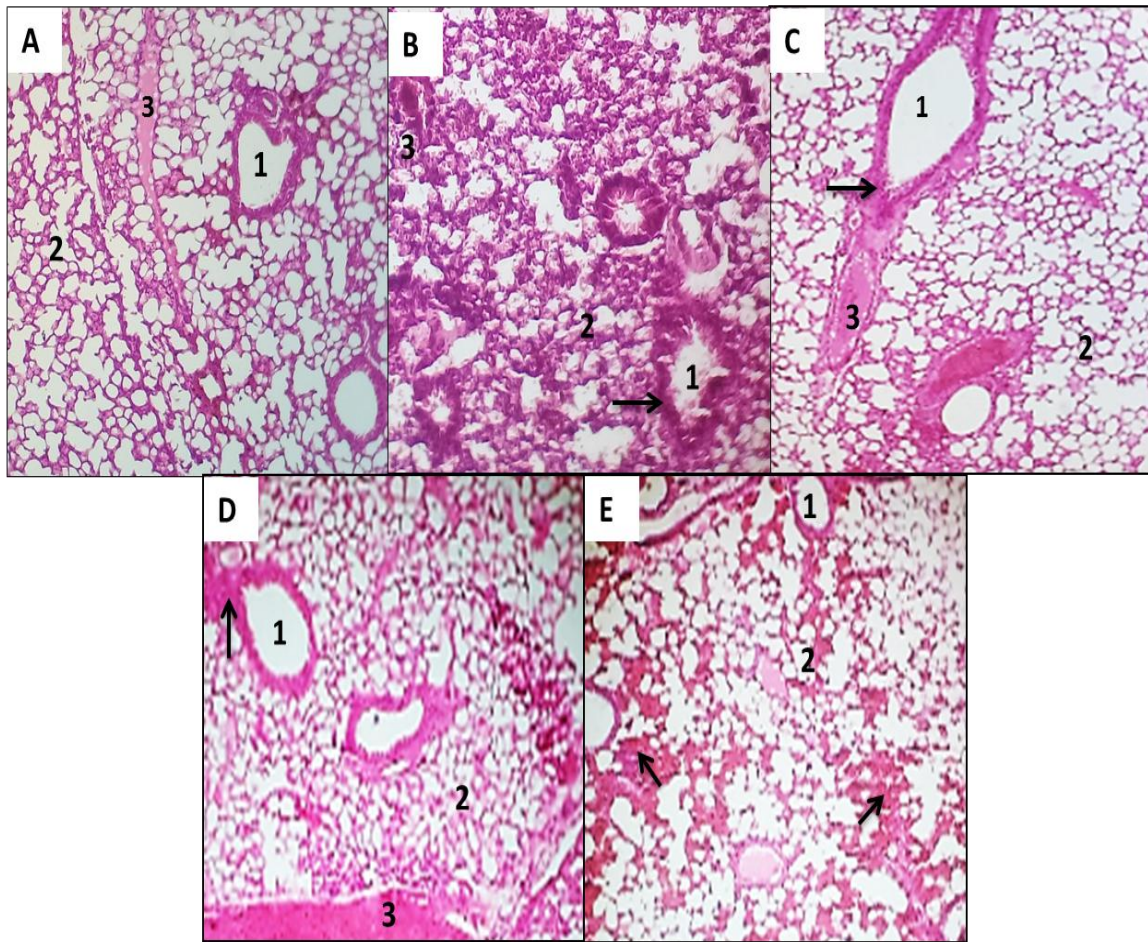


Figure 31: Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect microscopique des poumons x 100.

A: traité avec une solution saline (sain), B: sensibilisé avec HDM, C, D: sensibilisés avec HDM et traités avec les fractions polysaccharidiques F1 et F2 à la dose 50 mg / kg, E : sensibilisé avec HDM et traités avec un corticoïde à une dose de 2 ml / kg.
1- Bronchiole, 2-Alvéole, 3- vaisseaux sanguin, → - Infiltration cellulaire.

L'aspect macroscopique et microscopique des poumons des animaux traités avec les deux fractions polysaccharidiques F1 et F2, montrent qu'il y avait une installation d'une réponse anti-inflammatoire, et elle est plus adéquate avec la F1, qui présente un aspect très proche au celui du témoin sain, ceci peut être due à l'inhibition du recrutement des neutrophiles, **Lamblin et al. (1998)** constatent que le nombre de neutrophiles augmente dans les biopsies bronchiques des patients asthmatiques et pensent qu'il existe une association entre la migration des neutrophiles et les crises d'asthme.

(Létuvé and Taillé, 2013) ont rapporté que dans l'asthme allergique, il existe un déficit du nombre et/ou de l'activité des LTreg, et suggèrent un rôle modulateur des LTreg de l'intensité des symptômes et la survenue d'exacerbations. Cela nous permis à mettre une hypothèse sur l'effet protecteur de cette fraction polysaccharidique qui est probablement exécuté via l'activation des LTreg, qui produisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ce qui conduirait à une atténuation de l'inflammation allergique **(Pham van, 2010)** et/ou par l'inhibition de certains acteurs de l'inflammation, et c'est le cas des polysaccharides de *Radix isatidis* qui inhibent de manière significative la production de l'oxyde nitrique (NO), la prostaglandine E2 (PGE2), le TNF- α et l'IL-6 à partir des macrophages alvéolaires de rats Wistar stimulés par des lipopolysaccharides **(Du et al., 2013)**.

En comparaison avec les poumons enflammés des souris sensibilisées avec l'HDM seulement, celles des souris traitées avec le corticoïde (Physiolone) montrent des signes d'amélioration. Cette amélioration peut être expliquée par l'effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur des corticoïdes, ils inhibent directement la synthèse de multiples enzymes de l'inflammation, comme la No synthétase inductible (iNOS), les phospholipases A2 et C, mais également la cyclo oxygénase 2 et de nombreuses enzymes intervenant dans les phénomènes de destruction cellulaire comme les protéases et les collagénases. Ils sont aussi capables d'induire la synthèse de cytokines anti inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF β , et de réduire la synthèse de certaines cytokines pro-inflammatoires via des mécanismes trans-répressionnelles **(Sibilia, 2003)**.

2.3.5. Effet sur l'aspect microscopique des glandes surrénales

Dans le but de constater l'effet des différents traitements sur l'activité surrénalienne, des coupes histologiques ont été réalisées avec cet organe. Les résultats sont représentés dans **(Figure 32)**.

L'observation histologique des témoins sains a montré une structure corticale et médullaire surrénalienne normale **(Figure 32.A)**. La corticosurrénale est formée de la zone glomérulaire (partie externe) qui sécrète les minéralo-corticoïdes, la zone fasciculée responsable de la sécrétion des glucocorticoïdes et la zone réticulée qui sécrète les androgènes. La médullosurrénale la plus interne sécrète l'adrénaline et noradrénaline **(Thomasson, 2011)**.

L'aspect microscopique des témoins malades a montré une dispersion de la zone glomérulaire (glomérule) accompagnée de la présence d'un infiltrat lymphocytaire au niveau des différentes couches. A noter que le glomérule a une structure très réduite (**Figure 32. B**).

Chez les souris traitées avec la fraction F1, la structure histologique est presque identique à celle observée au niveau des glandes surrénales des témoins sains. En effet, on a noté des glandes de structure normale composées du cortex et de la médulla avec néanmoins la présence d'un petit infiltrat lymphocytaire (**Figure 32.C**).

Après traitement avec la fraction F2, on a remarqué que l'épaisseur de la partie corticale a diminué. Cette diminution a particulièrement touché la zone fasciculée. Par contre, un développement important de la partie médullaire a été noté, et ainsi un infiltrat lymphocytaire (**Figure 32.D**). Le traitement avec le corticoïde a causé une réduction de taille de la zone glomérulaire, un discret infiltrat a été noté, avec un élargissement de la médullosurrénale (**Figure 32.E**).

Les glucocorticoïdes comme le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rongeur, sont naturellement synthétisés par les glandes surrénales, est plus particulièrement par la zone corticale à partir du cholestérol (**Thomasson, 2011**), l'involution de cette zone chez les animaux traités par Physiolone peut être due à l'action de ce dernier, car l'administration de corticoïdes synthétiques cible des sites impliqués dans le rétro-contrôle négatif, qui induit le freinage de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) (**Lupien et al., 2009**) et par conséquent, inhibe la production de l'ACTH (hormone hypophysaire corticotrope) produite par l'hypophyse (**Le Jeune, 2012**). Il est à noter que toute thérapie prolongée par les glucocorticoïdes de synthèse comporte un risque d'installation d'une insuffisance surrénalienne (**Thomasson, 2011**).

En revanche, les effets des glucocorticoïdes sur la médullosurrénale semblent être en général bénéfiques. Cela s'explique par l'augmentation de la production des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) après une injection de Dexaméthasone (**Moftaqir-Handaj, 1999**). L'aspect histologique des surrénales des animaux traités par la F1, ressemble à celui observé chez les témoins sains, donc on suggère que les polysaccharides d'A.p n'ont pas d'effet délétère sur la fonction surrénalienne impliquée dans le processus anti-inflammatoire.

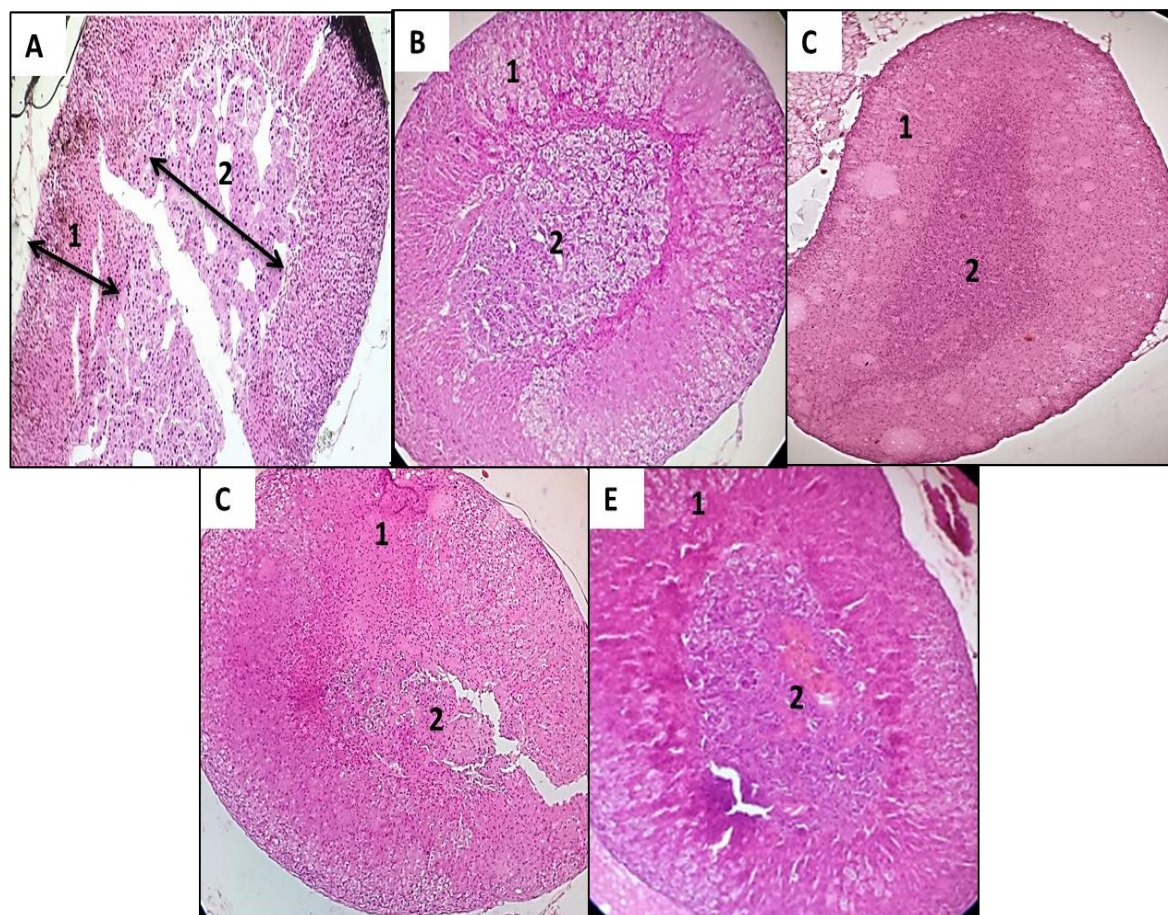


Figure 32 : Effet des deux fractions polysaccharidiques d'A.p (F1 et F2) sur l'aspect microscopique des glandes surrénales x 100.

A: traité avec une solution saline (sain), B: sensibilisé avec HDM, C, D: sensibilisés avec HDM et traités avec les fractions polysaccharidiques F1 et F2 à la dose 50 mg / kg, E : sensibilisé avec HDM et traités avec un corticoïde à une dose de 2 ml / kg.

1- Corticosurrénale, 2- Médullosurrénale.

2.4. Activité antioxydante des PST et des fractions polysaccharidiques F1 et F2 d'Ap : pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir antioxydant total des PST et des fractions d'A.p a été évalué par le test FRAP ; qui est un test direct utilisant une courbe standard de FeSO_4 et comparé au BHT, les résultats sont présentés dans **(Figure 33)**.

Les résultats ont montré que les polysaccharides extraits d'*Ancylus pyrethrum* possédaient un pouvoir réducteur, la valeur FRAP des PST est $0,109283 \pm 0,004$ mmol/mg, et elle est presque six fois plus inférieure à celle du BHT $0,646473 \pm 0,0003$ mmol/mg. La valeur FRAP de la F1 ($0,053233 \pm 0,003$ mmol/mg) est légèrement plus importante que celle de la F2 ($0,048445 \pm 0,002$ mmol/mg).

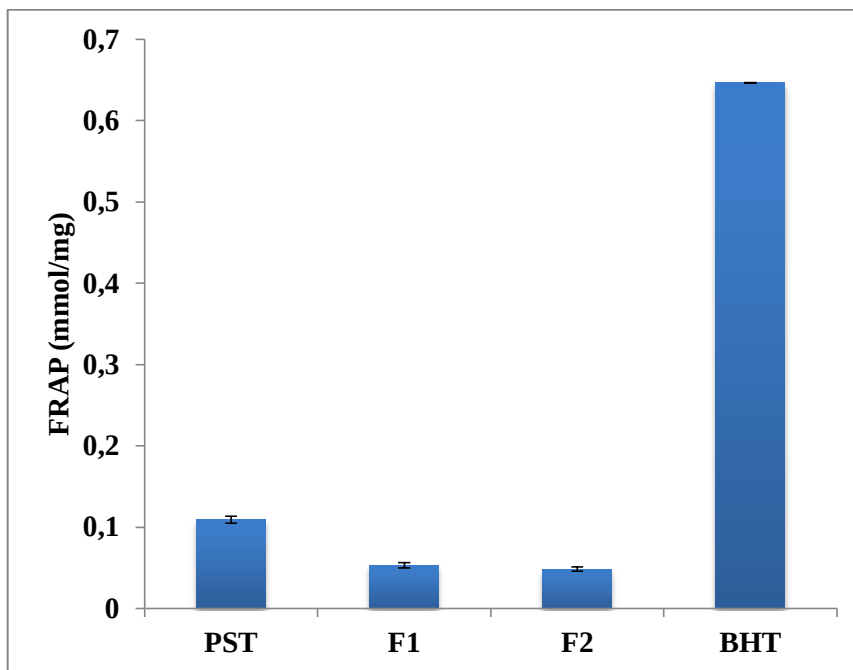


Figure 33 : Pouvoir antioxydant réducteur du fer des PST et des fractions polysaccharidiques F1 et F2 d'A.p en comparaison avec le BHT.

On remarque que les valeurs FRAP de chaque fraction seule sont plus faibles par rapport à celle des PST, cette dernière est presque égale à leur somme, donc on pense à un effet synergique entre ces deux fractions.

Des études récentes ont démontré que certains polysaccharides (pectine, hémicellulose ...) présentent également des propriétés anti-oxydantes (**Edwige et al., 2014**), ils peuvent sévèrement piéger le radical hydroxyle et le radical peroxyde d'hydrogène, et peut également et efficacement lier le fer ferreux *in vitro* (**Niu et al., 2011**). Cela indique que les polysaccharides exercent ce pouvoir antioxydant par leurs réactions avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour les transformer en produits stables si on les considère comme des donneurs d'électrons efficaces (**Su et Li, 2020**), et/ou par l'activation de certains enzymes anti-oxydantes.

(**Yan et al., 2010**) ont rapporté que l'administration des polysaccharides d'*Astragalus mongholicus* peuvent augmenter de manière significative les activités des enzymes antioxydantes sériques et hépatiques chez la souris. D'autres travaux rapportent qu'un traitement avec les polysaccharides de *Poria cocos* pendant 40 jours a montré une forte activité inhibitrice contre les dommages oxydants des rats porteurs de tumeurs cervicales, par l'augmentation de l'activité enzymatique anti-oxydante et le taux de glutathion réduit (**Boual, 2009**).

Donc cette réaction de réduction de fer confirmée par ces polysaccharides, peut-être dû à l'existence de nombreux groupes hydroxyles, qui pourrait être le donneur d'électrons à Fe^{3+} (**Li et al., 2015**), et la variabilité de cette puissance entre les PST et les fractions F1 et F2, est probablement dû aux propriétés structurales de chaque molécule, (**Zeng et al., 2015**) ont rapporté que de nombreux facteurs influent l'activité anti-oxydante des polysaccharides, y compris la composition monosaccharidique, le poids moléculaire, le type de liaison glycosidique et la conformation de la chaîne.

2.5. Caractérisation structurale des polysaccharides d'*Anacyclus pyrethrum*

2.5.1. Par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microstructure de la poudre des PST et des fractions d'A.p a été observée à l'aide du MEB, les images obtenues sont présentées dans la (**Figure 34**). Les résultats ont montré que les polysaccharides extraits d'*Anacyclus pyrethrum* à l'eau chaude, avaient une surface rugueuse avec de fines rides caractéristiques observées chez les PST, pour les fractions 1 et 2 la surface rugueuse est caractérisée par la présence de tout petites cavités. Ces résultats étaient presque similaires à ceux de (**Jia et al., 2013**) dans lesquels il a été rapporté que les polysaccharides du thé extraits à l'eau chaude avaient une surface rugueuse avec de grandes rides.

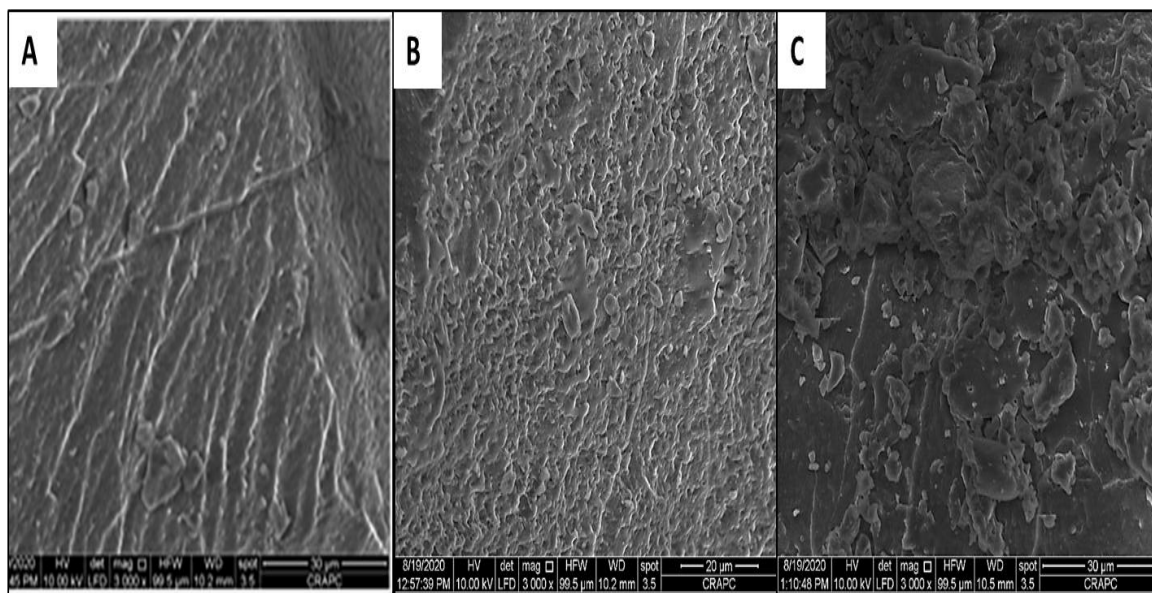


Figure 34: Morphologie des polysaccharides d'*Ap* observées au MEB x 3000:
(A) PST, (B) F1 et (C) F2.

2.5.2. Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La (**Figure 35**) illustre le spectre FT-IR allant de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} de PST et des fractions F1 et F2 d'*Ap*. La large bande d'absorption à environ 3238 cm^{-1} pourrait être attribuée aux vibrations d'étirement des liaisons des groupes -OH; indiquant l'existence de liaisons hydrogène intermoléculaires ou intramoléculaires dans le polysaccharide. La petite bande d'absorption apparaît à 2930 cm^{-1} attribuée aux vibrations de -CH. La bande à 1635 cm^{-1} était due à la vibration d'étirement C=O. Les bandes à $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ suggèrent que les PST d'*A.p* contiennent dans leur structure des monomères pyranne (**Wu et al., 2012**) et contiennent également des liaisons C-O-C et C-O-H (**Jia et al., 2013**).

Une absorbance à près de 933 cm^{-1} et 872 cm^{-1} peut provenir de liaisons β -glycosidiques et de liaisons α -glycosidiques respectivement entre les sucres dans la structure moléculaire (**Wu et al., 2012 ; Jing et al., 2014**). Aucun des spectres IR des fractions polysaccharidiques ou de PST n'a montré d'absorption à 1620 cm^{-1} , ce qui est une caractéristique d'un groupe aminé, indiquant l'absence de protéine, ce qui a démontré que la procédure de déproteinisation était efficace (**Yu et al., 2017**).

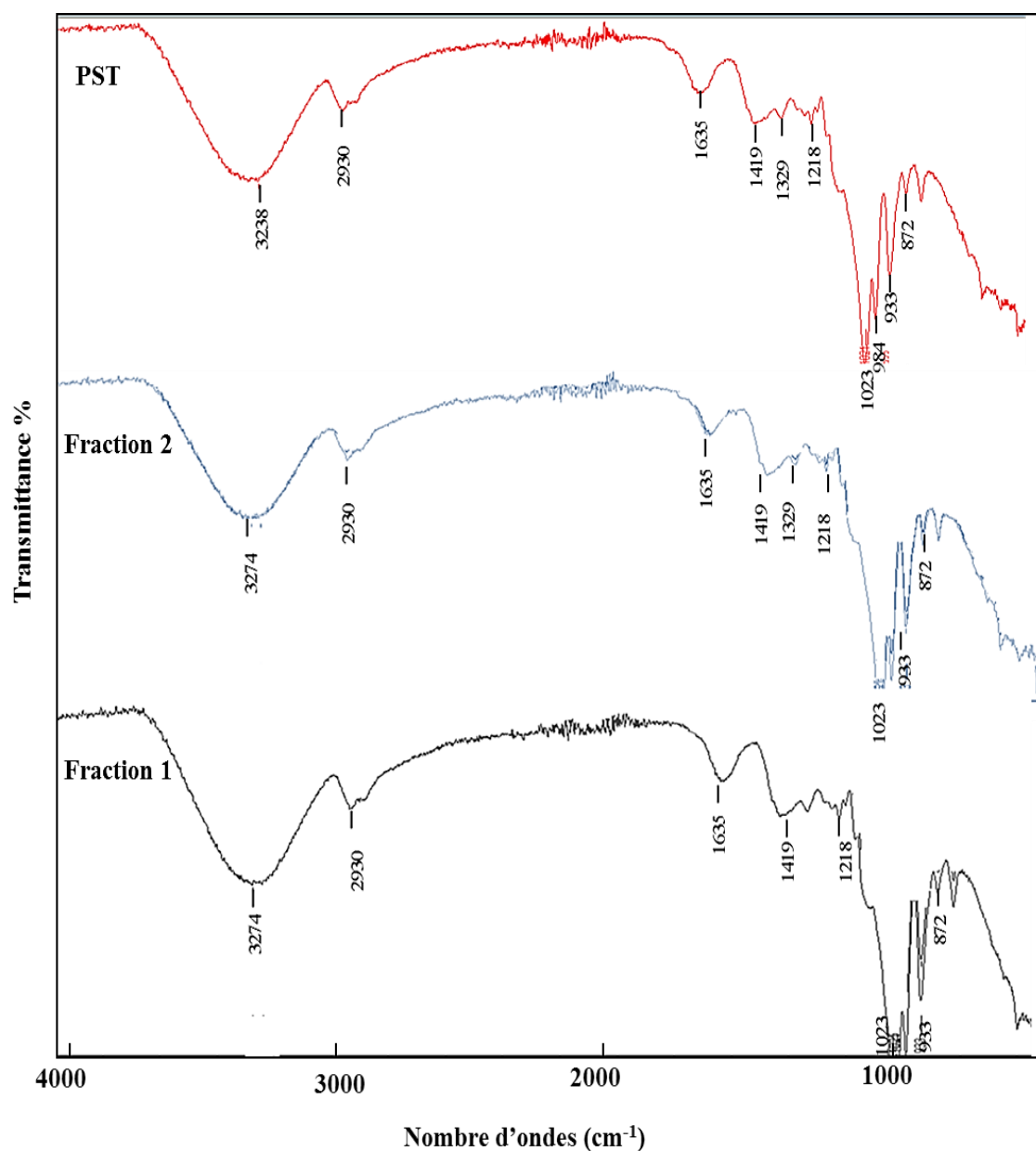


Figure 35 : Le spectre infrarouge des PST et des fractions F1 et F2 d'A.p.

2.5.3. Purification de la fraction active

La fraction F1 qui a montré une activité anti-inflammatoire est anti-oxydante la plus significative, a été soumise à une filtration sur gel à travers une colonne de Sephadex G200. L'opération a donné un pic majeur entre (18-90 ml) (**Figure 36**). Les fractions (6 mL chacune) formant le même pic ont été collectées, dialysées et lyophilisées pour obtenir un polysaccharide pur désigné PS. Ap avec un rendement de 1.86%.

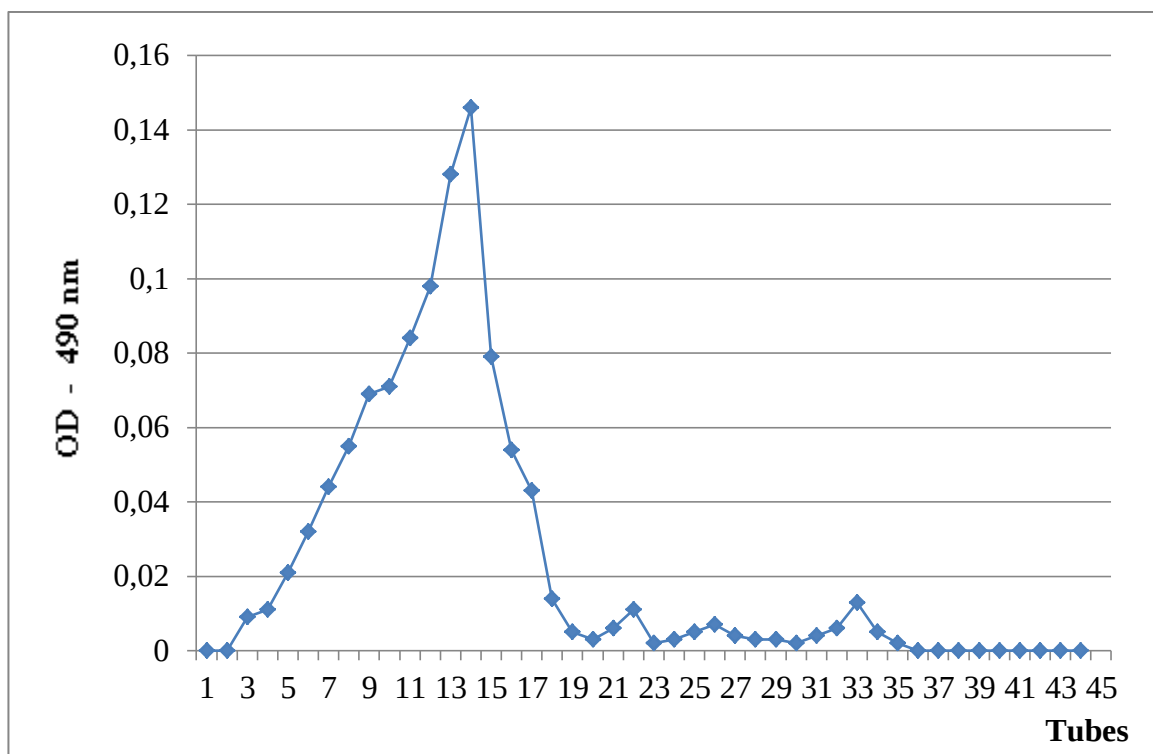


Figure 36 : Purification de la fraction F1 d'*Anacyclus pyrethrum* sur chromatographie de filtration sur gel.

La fraction F1 d'*Anacyclus pyrethrum* a été passée sur une colonne (60 x 2cm) de Sephadex G200. La colonne a été éluée avec de l'eau distillée, l'éluat a été recueilli par portions de 6ml.

2.5.4. Détermination des monosaccharides constitutifs

L'analyse des monosaccharides constituant le polysaccharide PS.Ap.1 a été réalisée par une méthanolyse et les monosaccharides triméthylsilylés sont identifiés par chromatographie en phase gaz. Les monosaccharides présents ont été identifiés en se basant sur des normes du laboratoire, des standards sont réalisés en parallèle avec des monosaccharides commerciaux (L-Rha, LFuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GalA, D-GlcA) préparés à partir de solutions à 20 mM lyophilisées. Les résultats obtenus (**Tableau2**) ont montré que le PS.Ap est un glucane (polysaccharide homogène constitué seulement de glucose).

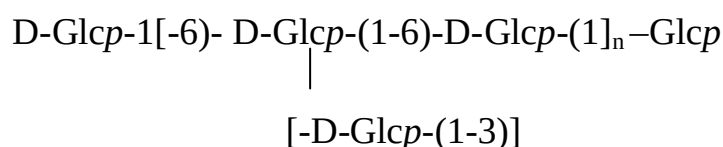
Tableau 2 : Détermination de monosaccharides constitutifs du PS. *Ap* par CPG après méthanolyse.

	L-Rha	L-Fuc,	L-Ara,	D-Xyl,	D-Man,	D-Gal,	D-Glc,	D-GlcA
PS. <i>Ap</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

2.5.5. Détermination des liaisons glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La méthylation de PS.*Ap* et l'analyse des résultats par chromatographie en phase gazeuse, ont mis en évidence la présence de dérivés perméthylés et partiellement acétylés. Une majorité de dérivés de type 2.3.4 tri-O-méthylglucosides. Ce résultat indique clairement que nous sommes en présence d'un glycane de type $[\rightarrow 6)\text{-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow]$. Les dérivés de 2.3.4.6 tétra-O-méthylglucosides ont été attribués à des ramifications terminales non réductrices de la chaîne principale de type $[\text{Glc}_p\text{-(1}\rightarrow]$. Et enfin, les dérivés de type 2.4 di- O-méthylglucosides confirment que le résidu glucose terminal non réducteur est principalement ramifié en position 6 du squelette $\text{-(1}\rightarrow\text{3)-D-glycane}$. (**Figure 37**). Ces résultats de chromatographie en phase gazeuse sont en accord avec ceux obtenus par spectrométrie de masse (**Figure 38**).

Enfin et d'après les résultats cités ci-dessus, on pense que le polysaccharide PS.*Ap* pourra avoir la structure probable suivante :



Mais il reste à confirmer cette suggestion et chercher plus de détails tels que les types de liaison ...ect, en analysant cette molécule par RMN (Spectre proton ^1H) à une dimension, Expérience COSY⁵ homonucléaire $^1\text{H}/^1\text{H}$, Expérience hétéronucléaire (HMQC : Heteronuclear Multiquantum Coherence, HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation),

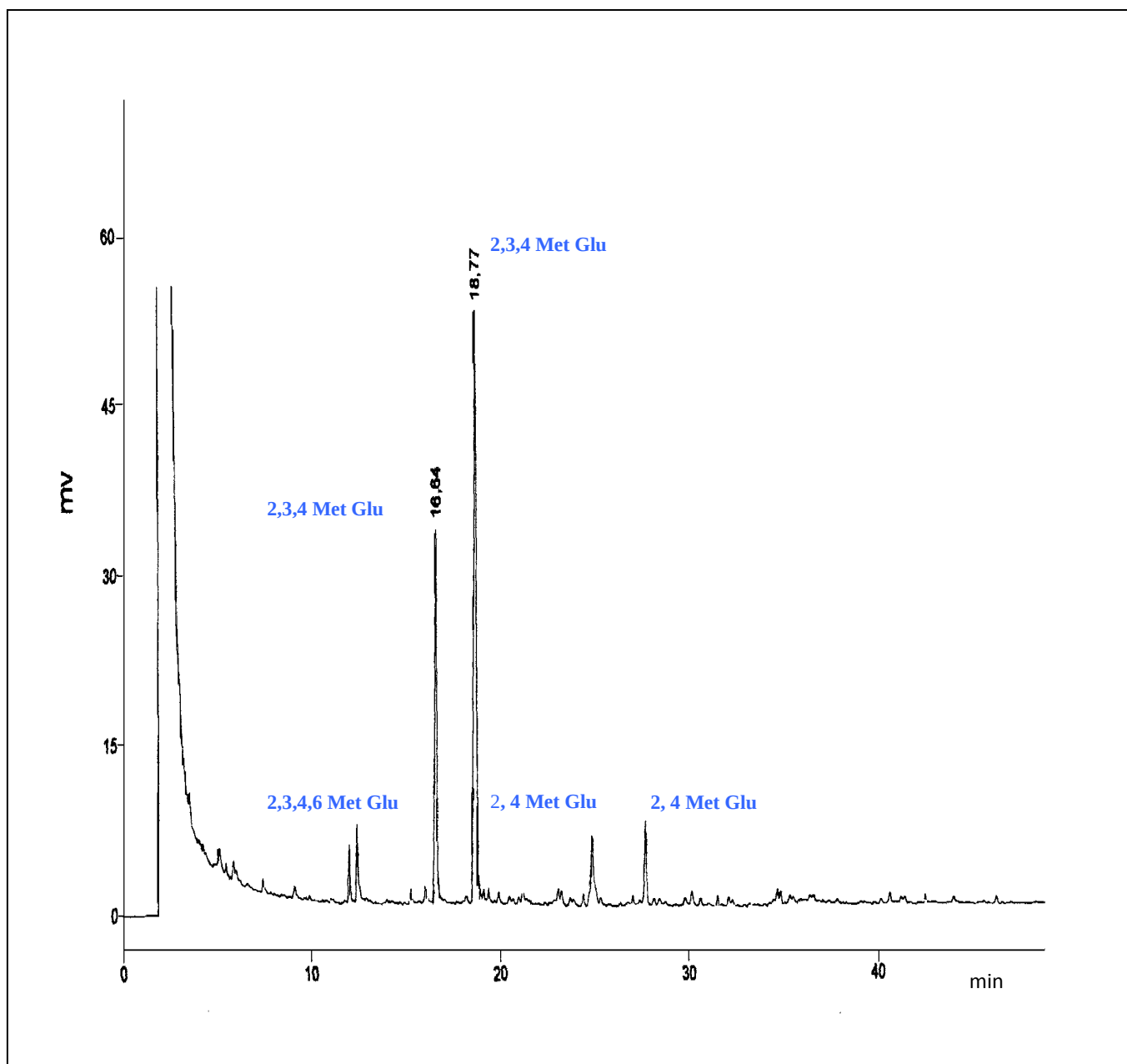


Figure 37 : Analyse par GC après méthylation du polysaccharide pur PS.Ap.1.

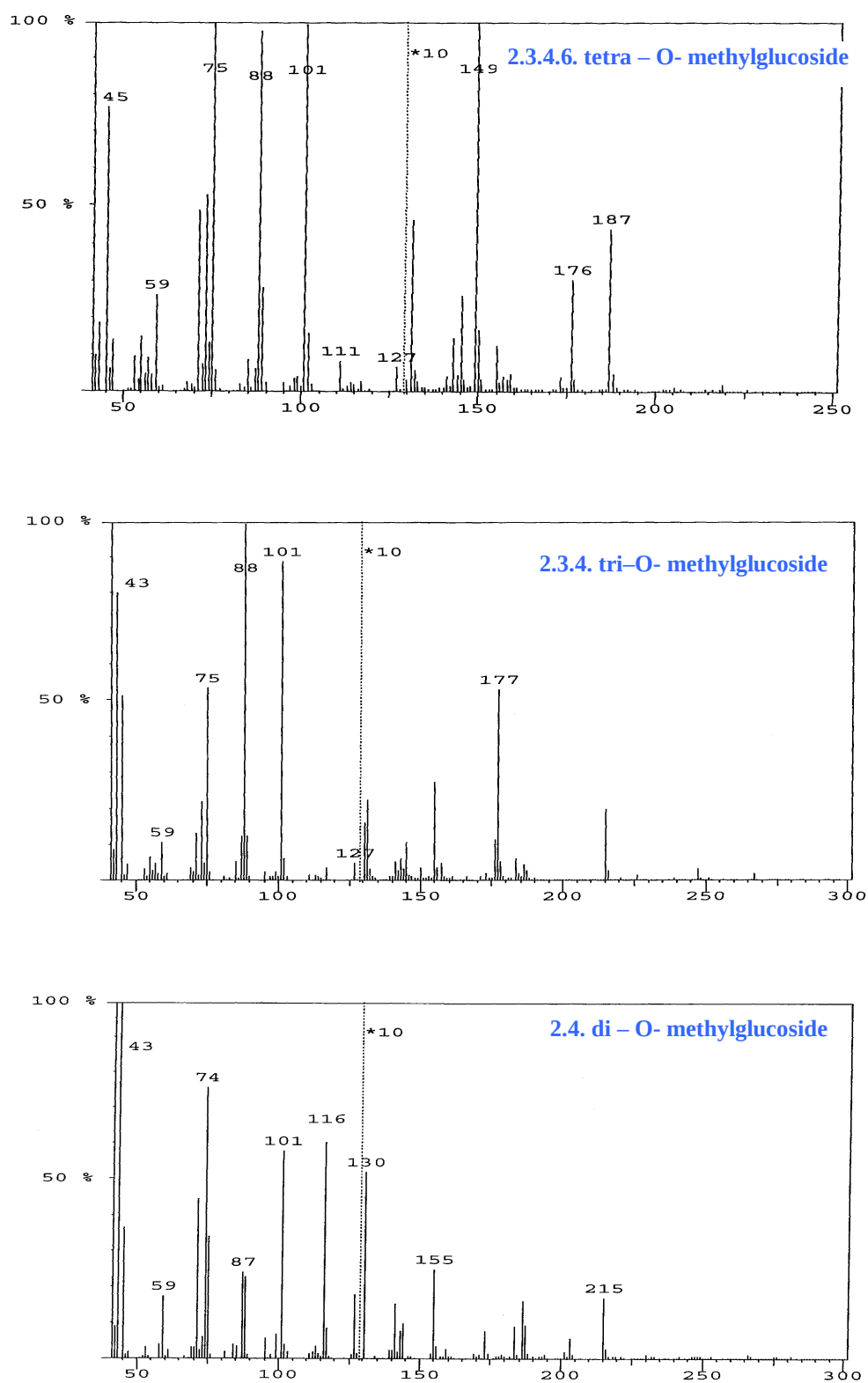


Figure 38 : Analyse par MS après méthylation du polysaccharide pur PS.Ap.1.

Conclusion et perspectives

La pharmacopée traditionnelle algérienne utilise de nombreuses plantes en médecine populaire, parmi lesquelles le pyrèthre d'Afrique (*Anacyclus pyrethrum*) qui est l'une des exemples de plantes les plus riches en espèces à valeur médicinale. L'étude des biopolymères naturels a révélé ces dernières décennies le potentiel des polysaccharides comme additifs alimentaires, mais aussi leurs potentiels thérapeutiques contre beaucoup de maladies. C'est dans ce contexte, qu'on s'est intéressé à l'étude de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits polysaccharidiques provenant des racines d'*Anacyclus perythrum*.

Les PST d'Ap ainsi que les deux fractions polysaccharidiques F1 et F2, extraits à l'eau chaude et précipités avec l'éthanol 95%, sont douées d'activité anti-inflammatoire confirmée par une analyse cellulaire d'une part et par une analyse histo-pathologique des poumons d'autre part. D'après les résultats obtenus, cette activité est exécutée de deux manières différentes ; les PST activent la multiplication et la migration des cellules immunitaires vers les sites d'infection afin d'installer une réponse inflammatoire régulée et avec moins de dégâts tissulaires, et c'est probablement par l'activation des LTreg, qui sont des acteurs clés de la régulation immunitaire. Cela a été observé essentiellement avec la dose 50 mg/kg. Les deux fractions polysaccharidiques ont un effet anti-inflammatoire presque similaire à celle du corticoïde utilisé, ils inhibent la migration cellulaire vers les sites d'infection ce qui ramène à une élimination du pathogène avec moins de facteurs inflammatoires, et cela réduit les conséquences délétères de la réaction inflammatoire, en évitant les effets secondaires des corticoïdes synthétiques. L'activité anti-oxydante des PS d'Ap prouvée par le test FRAP, aidera à piéger les ROS produites au cours du processus inflammatoire, par les cellules du parenchyme pulmonaire et les macrophages pulmonaires, et à éliminer leurs effets nocifs, on peut donc dire aussi que les polysaccharides d'A.p peuvent exercer leur activité anti-inflammatoire via leur action anti-oxydante.

Une caractérisation structurale des PST et des fractions a été réalisée par MEB et FTIR puis une purification de la fraction polysaccharidique la plus active (F1) a été réalisée par différentes méthodes chromatographiques (CPG, FPLC ...). Les résultats MEB indiquent que les PS d'A.p ont une structure homogène, d'autre part la spectroscopie IR permet une mesure quantitative des groupes fonctionnels organiques, en particulier O-H, C=O...présents dans nos extraits. L'analyse chromatographique de la fraction F1 montre que cette molécule est

pure et forme un homo-polysaccharide constitué essentiellement de glucose (D-glucane). Ce polysaccharide est formé d'une chaîne principale $-(1-6)\text{-D-Glcp}$ ramifiée en $(1-3)\text{-D-Glcp}$.

Les résultats de cette fraction polysaccharidique (PS.Ap) à une dose de 50 mg/kg, apparemment très encourageants et prometteurs ouvrent plusieurs possibilités qui pourraient moduler une réponse inflammatoire exacerbée, et peuvent même être exploitées en thérapeutique. Des études plus approfondies pourront être lancées pour des éventuelles perspectives de recherche afin de :

- Optimiser les conditions d'extraction (température, temps d'extraction, type et pourcentage d'alcool-eau) de chaque fraction polysaccharidique.
- Déterminer les molécules sur lesquelles les polysaccharides agissent en se basant sur les interleukines anti- inflammatoires et pro inflammatoires (étude in vitro).
- Déterminer les sous populations cellulaires ciblées par ces molécules bioactives afin de comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans la stimulation et la régulation de l'inflammation.
- Suivre l'analyse structurale par spectrométrie de masse et par la résonance magnétique afin de déterminer la relation structure fonction, et préciser les mécanismes d'inhibition des radicaux libres (pouvoir antioxydant).
- Elargir l'étude aux autres parties de la plante (tige, feuilles et fleurs).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aafi, A. (2013) : Centre de Recherche Forestière : Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification. Projet PAM, Rabat, Maroc, 4p.

Ababsa, M., Aouissi, H.A. (2020). Current state of the coronavirus (Covid-19) in Algeria. J. Community Medicine & Health; 5 (1), 1036.

Abdelmalek, B. E., Sila, A., Krichen, F., Karoud, W., Martinez-Alvarez, O., Ellouz-chaabouni, S., Ayadi, M. A. and Bougatef, A., (2015): Sulfated polysaccharides from *Loligo vulgaris* skin: Potential biological activities and partial purification. International Journal of Biological Macromolecules; 72, 1143-1151.

Aguilar-Briseño, J, A., Cruz-Suarez , E., Sassi J, F., Ricque-Marie D., Zapata-Benavides P., Mendoza-Gamboa, E., Rodríguez-Padilla, C. and Trejo-Avila L, M., (2015): Sulphated Polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV Infection. Marine Drugs; 13, 697-712.

Alonso, J. M. (2008): Immunité et physiopathologie des infections de l'arbre respiratoire. *Medecine et Maladies Infectieuses*; 38 (8), 433–437.

Angone, S. A., Nguema-Ona, E., Driouich, A. (2010): La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale. *Phytotherapie*; 8(4), 223–230.

Attakpa, E. S. (2010): Rôle du Récepteur nucléaire d'Activation et de Prolifération des Peroxysomes (PPAR- α) dans la modulation de l'inflammation et l'activation des cellules T . Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Benin.161p.

Bellakhdar, J. (1998) : La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires- Saint –Etienne, Ed. Ibis Press, France, 764p.

Beloued, A. (1998) : Étymologie Des noms de plantes du Bassin Méditerranéen. Ed. Office de Publication Universitaire, Alger, Algérie. 91p.

Benaoun, F., (2017) : Caractérisation Structurale et Potentiel Biologique des Polysaccharides issus de *Plantago notata Lagasca* (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora Batt.* et Trab. (Liliaceae). Thèse de Doctorat en Biologie et Santé. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 231p.

Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D. (2003): Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. J. Ethnopharmacology; 88, 155–160.

Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D. (2010): Immunologically active polysaccharides isolated from *Anacyclus pyrethrum*. Libyan Agric Res Cen J Intl; 1(3), 128–133.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999): Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology ; 299(1995), 15–27.

Berthélémy, S. (2011): Les principales allergies et leurs allergènes. Actualités Pharmaceutiques; 50(507), 12–18.

Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V. K. (2007): Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Current Opinion in Immunology; 19(6), 652–657.

Bhargava, S. (2012): Rasayana properties of Ayurvedic herbs: are polysaccharides a major contributor. Carbohydrate Polymers; 87, 3–15.

Bloemena, E., Weinreich, S., Schellekens, P. T. A. (1990): The influence of prednisolone on the recirculation of peripheral blood lymphocytes in vivo. Clinical and Experimental Immunology; 80(3), 460–466.

Borry, A. (2018): L'allergie aux acariens : mécanisme immunologique , stratégies thérapeutiques et conseils à l'officine. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Lille 2, France. 93p

Borish, L., Culp, J. A. (2008): Asthma: A syndrome composed of heterogeneous diseases. Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 101(1); 1–9.

Boual, Z., (2009) Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérien) .Thèse de Magister en Biologie. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 106p.

Bouguenoun, I., De Pauw-Gillet, M. C., Bensakhri, Z., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Bendjeddou, D. (2016): Effet inflammatoire des extraits de *Cupressus sempervirens* planté dans l'Est de l'Algérie: Du modèle murin à la stimulation des cellules BEAS-2B par l'allergène majeur Cup s 1. *Revue Française d'Allergologie*; 56(1), 10–19.

Bouhlal, R., Haslin, C., Chermann J, C., Collic-Jouault, S., Sinquin, C., Simon G., Cerantola, S., Riadi, H., Bourgougnon, N. (2011) : Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Marine Drugs* ; 9, 1187-1209.

Boulet, L. (2013): Physiopathologie respiratoire appliquée, Ed. Les presse.382p.

Boulos, L. (1983): Medicinal plants of North Africa. Reference Publications Inc, Michigan, USA. 286p.

Brown, E.R. (1982): Pediatric respiratory disease. The Journal of the American Medical Association; 807.

Burmester, G., Pezzutto, A. (2000): Atlas de poche d'immunologie , Ed. Flammarion. Paris, 290p.

Carpita, NC., Shea, EM. (1989): Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. *In*: CJ Biermann, GS McGinnis, eds, *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Boca Raton, FL, p157–216.

Cavaillon, JM. (1995) : L'inflammation : un équilibre précaire entre cytokines pro-et anti-inflammatoire. *Rev. Fra. Lab*; 276, 27-35.

Cavaillon, JM., Adib-Conquy, M. (2009) : Réponses cellulaire et immunologique à l'agression *In* : Zéni F. et Charbonneau P. editors, Vol II. Réanimation médicale, Elsevier Masson SAS.

Chambers, RE., Clamp, JR. (1971) : Une évaluation de la méthanolyse et d'autres facteurs utilisés dans l'analyse des matériaux contenant des glucides. *Biochem J*; 125 (4),1009–1018.

Chen, G., Yuan, B., Wang, H., Qi, G., Cheng, S. (2019): Characterization and antioxidant activity of polysaccharides obtained from ginger pomace using two different extraction processes. *International Journal of Biological Macromolecules*; 139, 801-809.

Chen, Y., Yao, F., Ming, K., Wang, D., Hu, Y., Liu, J. (2016): Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. *Molecules*; 21(12), 1705.

Chi, A., Kang, C., Zhang, Y., Tang, L., Guo, H., Li, H. (2015): Immunomodulating and antioxidant effects of polysaccharide conjugates from the fruits of *Ziziphus Jujube* on Chronic Fatigue Syndrome rats. *Carbohydr. Polym*; 122, 189–196.

Chouana, T. (2017) : Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*. Thèse de Doctorat en nutrition et sciences des aliments. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 206p.

Cohen, JJ., Duke, RC. (1984): Glucocorticoids activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol*; 132, 38.

Cottrez, F., Grou, H. (2004): Specialization in tolerance: innate cd4/cd 25- versus acquired Tr1 and Th3 regulatory T cells, *Transplantation*; 77(1), 12–15.

Cordeiro, LMC., Reinhardt, VF., Baggio, C., Werner, MF., Burci LM., Sasaki GL., Iacomini M. (2011): Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity. *Elsevier* ; 130 (4), 937–944.

Coumba, D. (2008): utilisation des corticoides chez les patients consultes en ambulatoire dans le service de chirurgie orthopedique et traumatologique du CHU Gabriel toure de janvier 2008 à Juin 2008. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de bamako, Mali.78p.

Daoudi, A., Nassiri, L., Ibijbjen , J., Boukil, A. (2014) : Etude ethnobotanique du Pyrèthre d'Afrique " *Anacyclus pyrethrum*" dans le cercle Meknès, El Hajeb, Khénifra Azrou et Ifrane – Morocco. *La science en liberté*; 6, 26-51

Daum, J. R., Shepherd, D. M., Randolph, J. N. (1995): Physical interactions and early signaling between helper T lymphocytes and B lymphocytes. *Methods in Immunotoxicology*; New York, Chichester, Toronto, Singapore: Wiley Liss Inc, 469–81.

Delattre, C., (2005) : Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de Doctorat. Université de Picardie jules verne, Valois Santerre.

Denis, F., Hantz, S., & Alain, S. (2007): Immunité et vaccinations antivirales: Exemple de la muqueuse respiratoire. *Antibiotiques*; 9(2), 130–138.

Denny, F.W., (1995): The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 152.

Deslee, G., Hammad, H., Rataczak, C., Just, N., Lebargy, F., Pestel, J., Tonnel, A. (2004): Implication des cellules dendritiques en pathologie respiratoire allergique. *Rev Mal Respir*; 21, 549–555.

Djaboun, S. (1995) : Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive assistée par micro-ondes. Thèse de Magister. Université Mouloud Mammeri-Tizi-Ouzou.

Duncan, D. D., Lawrence, D. A. (1995): T cells and cloned and transformed T-cell lines to assess immune function. *Methods in Immunotoxicology*; 1, 483–505.

Du, Z., Liu, H., Zhang, Z., Li P., (2013): Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Radix Isatidis* polysaccharide in murine alveolar macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*; 58, 329– 335.

Edwige, L., Voxeur, A., Paul, J., Lerouge, P. (2014): Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*; 3(2), 77–88.

Espinosa, E., Chillet, P. (2010): Immunologie. Ed. Ellipses. Paris. 511p.

Falcone, S., Palmeri, D., Berg, R. (2006): Biomedical Applications of Hyaluronic Acid. *In* :Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. Ed. American Chemical Society. Washington, DC. 354p

Finne, J., Krusius, T., Rauvala, H. (1980): Use of potassium *tert*-butoxyde in the methylation of carbohydrates. *Carbohydr.Res*; 80, 336 – 339.

Fourment,. Roques. (1942) : Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, 159p.

Fournet, B. , Strecker, G. , Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981): Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem*; 116, 489 – 502.

Fridja-Masson, J. (2015): Néogénèse lymphoïde induite par l'infection bactérienne bronchopulmonaire chronique. Thèse de doctorat en Physiopathologie, Université Paris Descartes-Sorbonne, France. 189p.

Galmès, J. (2013) : Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV) : implication potentielle dans la pathogenèse de la pneumonie. Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de Lyon, France. 180p.

Greger, H. (1978): Comparative Phytochemistry and Systematics of *Anacyclus*. *Biochemical Systematics and Ecology*; 6, 11–17.

Guillon, A., Jouan, Y., Si-Tahar, M. (2016): Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. *Méd. Intensive Réa*; 10.

Guilpain, P., Le Jeune, C. (2012): Effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes. *Presse Medicale*; 41(4), 378–383.

Hamimed, S. (2009): Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Thèse de Magister en Chimie organique, Université Mentouri-Constantine. 166p.

Hammad, H., Lambrecht, B. N. (2008): Dendritic cells and epithelial cells : linking innate and adaptive immunity in asthma. *Focus on allergy and asthma*; 8, 193–204.

Hart, B.L. (2005): The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. *Anim. Behav*; 70, 975–989.

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.P., Ybert, E., De Laage de Meux, A.; Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., Vican, P., Deelesalle –Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J., et Botrel, A. (2001) : Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed. Larousse-Bordas, Paris, France, 275p.

Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., Eloff, J. N. (2007): Inflammation: The foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*; 6(25), 2868–2885.

Jawhari, F.Z., El Moussaoui, A., Bourhia, M., Imtara, H., Mechchate, H., Es-Safi, I., Ullah, R., Ezzeldin, E., Mostafa, G.A., Grafov, A., Ibenmoussa, S., Boustia, D., Bari, A., (2020): *Anacyclus pyrethrum* (L): Chemical composition, analgesic, anti-inflammatory, and wound healing properties. *Molecules*; 25(22),1-14.

Jean-Pierre W. (2006): Larousse Médical. Ed. Larousse. Paris. 1113p.

Jeddou, K., Chaari, F., Makhtouf, S., Nouri-Ellouz, O., Helbert, C.B., Ghorbel, R.E. (2016): Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. *Food Chemistry*; 205, 97–105.

Jia, X., Dong, L., Yang, Y., Yuan, S., Zhang, Z., Yuan, M. (2013): Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from Hawk tea (*Litsea coreana* var . *lanuginosa*). *Carbohydrate Polymers*; 95(1), 195–199.

Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C., Shang, P. (2012): Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: a review. *Carbohydr. Polym*; 89, 713–722.

Jing, P., Zhao, S., Lu, M., Cai, Z., Pang, J., Song, L. (2014): Multiple fingerprint analysis for investigating quality control of *Flammulina velutipes* fruiting body polysaccharides. *Journal of agriculture and food Chemistry*; 62(50), 12128-12133.

Kearley, J., Buckland, K. F., Mathie, S. A., Lloyd, C. M. (2009): Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1 / ST2 – IL-33 Pathway. *Am J Respir Crit Care Med*; 179, 772–781.

Krausz, P., Sol, V., Granet, R. (2013) : Chimie organique les glucides structures réactions oligo et polysaccharides cours et exercices corrigés niveau B. Ellipses Marketing, Paris. 240p.

Lamblin, C., Gosset, P., Tillie-leblond, I., Saulnier, F., (1998): Bronchial Neutrophilia in Patients with Noninfectious Status Asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 157, 394–402.

Le jeune C. (2012) : Pharmacologie des glucocorticoïdes. *La Presse Médicale*; 41: 370-377

Létuvé, S., Taillé, C. (2013): Physiopathologie de la réponse inflammatoire dans l’asthme de l’adulte. *EMC - Pneumologie*; 10(2), 1–8.

Liang, L., Ao, L., Ma, T., Ni, Y., Liao, X., Hu, X., Song, Y., (2018): Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, *Lady Godiva*) polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol*; 106, 447–455.

Ligacheva, A.A., Sherstoboev, E.Y., Danilets, M.G., Trofimova, E.S., Krivoshchekov, S. V, Gur, A.M., Bulgakov, T. V, Kudashkina, N. V, Miroshnichenko, A.G., Belousov, M. V, Eksperimental, B. (2020): Study of immunotropic properties of water-soluble polysaccharides isolated from *Conium maculatum* Grass. *Bultein of Experimental Biology And Medicine*; 170(2), 203–206.

Li, JE., Nie, SP., Xie, MY., Li, C. (2013) : Isolation and partial characterization of a neutral polysaccharide from *Moslachinensis Maxim. cv. Jiangxiangru* and its antioxidant and immunomodulatory activities. *Journal of Functional Foods*; 9.

Li, S., Gao, A., Dong, S., Chen, Y., Sun, S., Lei, Z., Zhang, Z. (2017): Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta*. *Int. J. Biol. Macromol*; 96, 26–34.

Li, Y. J., Lin D, D., Jiao, B., Xu C, T., Qin J, K., Ye G, J., Su G, F. (2015): Purification, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharide from *Cissus pteroclada Hayata*. *International Journal of Biological Macromolecule*; 77, 307-313.

Liu, J., Willfo, S., et Xu, C. (2015): A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*; 5, 31 – 61.

Lone, S. A., Ahmad, A. (2020): COVID-19 pandemic—an African perspective. *Emerging Microbes and Infections*; 9(1), 1300–1308.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., Heim, C. (2009): Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*; 10(6), 434–445.

Madouri, F. (2016) : Asthme allergique induit par un allergène d’acarien, House Dust Mite (HDM) : rôles de la caspase-1 et de la protéine kinase C thêta (PKC- θ). Thèse de doctorat en Immunologie. Université d’Orléans. 247p.

Madouri, F., Guillou, N., Fauconnier, L., Marchiol, T., Rouxel, N., Chenuet, P., Chamailard, M. (2015): Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation. *Journal of Molecular Cell Biology*; 7(4), 351–365.

Maeda, K., Yamamoto, K., Tanaka, Y., Yoshida, H. (1992): House Dust Mite (HDM) antigen in naturally occurring lesions of atopic dermatitis (AD): the relationship between HDM antigen in the skin and HDM Antigen-specific IgE Antibody. *Journal of dermatological science*; 3(2), 73-77.

Ma, J. S., Liu, H., Han, C. R., Zeng, S. J., Xu, X. J., Lu, D. J., & He, H. J. (2020): Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed. *Carbohydrate polymers*; 229, 115409.

Manouze, H., Bouchatta, O., Bennis, M., Sokar, Z., Ba-Mhamed, S. (2019): Anticonvulsive and neuroprotective effects of aqueous and methanolic extracts of *Anacyclus pyrethrum* root in kainic acid-induced-status epilepticus in mice. *Epilepsy Research*; 158

Manouze, H., Bouchatta, O., Gadhi, A. C., Bennis, M., Sokar, Z., Ba-m, S., & Russell, V. A. (2017): Anti-inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Activities of Methanol and Aqueous Extracts of *Anacyclus pyrethrum* Roots. *Frontiers in Pharmacology* ; 8, 1–14.

Marouf, A., Gérard T, R. (2009) : Abrégé de biochimie appliqué .Ed. EDP science. 483p.

Mehellou, Z. (2016) : Caractérisation partielle et activités biologiques des polysaccharides hydrosolubles issus de deux plantes spontanées récoltées au Sahara septentrional Est algérien. Thèse de Magister en Biologie. Université Kasdi Merbah-Ouargla.170p.

Mei, X., Yang, W., Huang, G., Huang, H., (2019): The antioxidant activities of Balsam pear polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol*; 142, 232-236.

Mengome, L.E., Voxeur, A., Akue, J. P., Lerouge, P. (2014): Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*; 3, 77-88.

Meng, X., Liang, H., Luo, L. (2016): Antitumor polysaccharides from mushrooms : A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr. Res*; 424, 30–41.

Michaud, B. (2013): Etude de la réponse lymphocytaire T dans l'allergie de l'enfant, au diagnostic et au cours de la désensibilisation . Thèse de doctorat en Immunologie, Université Paris Descartes.France. 229p.

Mirzaie, S., (2020): Effects of extracted polysaccharides from a *Chlorella vulgaris* biomass on expression of interferon- γ and interleukin-2 in chicken peripheral blood mononuclear cells. Journal of Applied Phycology, 33(1), 409-418.

Mkedder, I., (2013): Modification et dégradation enzymatique de polysaccharides : investigation par imagerie et diffusion de rayonnement. Thèse de Doctorat en chimie des polymères. Université de Grenoble, 143p.

Moftaquir-handaj, A. (1997) : Effet de l'exposition anténatale aux médicaments sur l'activité sympatho-adrénergique au cours du développement. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré Nancy.1. 210p.

Mogensen, T. H. (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clinical microbiology reviews; 22(2), 240–273.

Mohammadi, A., Mansoori, B., Baradaran, B. (2016a): Cytotoxic effects of *Anacyclus pyrethrum* plant extract in oral cancer cell (kb cell line). Urmia medical journal; 27(4): 257-65.

Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran PC, Baradaran SC, Baradaran B. (2016b): *Anacyclus pyrethrum* Extract Exerts Anticancer Activities on the Human Colorectal Cancer Cell Line (HCT) by Targeting Apoptosis, Metastasis and Cell Cycle Arrest. Journal of Gastrointestinal Cancer; 29:1-8.

Mohammed, A. S. A., Naveed, M., Jost, N. (2021): Polysaccharides ; Classification , Chemical Properties , and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). Journal of Polymers and the Environment; 29(8), 2359–2371.

Mukhopadhyay S, K., Chatterjee, S., Gauri S, S., Das S, S., Mishra, A., Patra, M.,Ghosha A, K., Dasa A, K., Singh S, M., Dey, S., (2014): Isolation and characterization of extracellular polysaccharide Thelebolan produced by a newly isolated psychrophilic antarctic fungus *Thelebolus*. Carbohydrate Polymers; 104, 204-212.

Müller, K., Gürster, D., Piwek, S., Wiegerebe, W. (1993): Antipsoriatic anthrones with modulated redox properties. 1. Novel 10-substituted 1, 8-dihydroxy-9 (10H) - anthracenones as inhibitors of 5-lipoxygenase. J. Med. Chem; 36, 4099–4107.

Mulloy, B., Mourao P, A.S., Graye. (2000): Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. Journal of Biotechnology; 77, 123-135.

Nadour, M., (2015): Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. Mouloud Mammeri- Tizi-Ouzou. 175p.

Nie, S., Xie, M. (2011): A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. Food Hydrocolloids; 25, 144–149.

Niu, Y., Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W., 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, 620-626.

Nzuki, B.F. (2016) : Recherches ethnobotaniques sur les plantes médicinales dans la Région de Mbanza-Ngungu, RDC. Thèse de Doctorat. Université de Gand, Belgique. 349 p.

Ouarghidi, A., Powell, B., Martin, G., Abbad, A. (2017): Traditional sustainable harvesting knowledge and distribution of a vulnerable wild medicinal root (*A . pyrethrum* var . *pyrethrum*) in Ait M’hamed Valley, Morocco. Economic Botany; 1–13.

Pal, A., Das, D., Kumar Sarkar, A., Ghorai, S., Das, R., Pal, S. (2015): Synthesis of glycogen and poly (acrylic acid)-based graft copolymers via ATRP and its application for selective removal of Pb^{2+} ions from aqueous solution. European Polymer Journal; 66, 33-46.

Pham van, L. (2010): Modulation de la réponse immunitaire par des agonistes de la voie de signalisation TLR/IL-1R dans le modèle d’asthme. Thésese Doctorat en Immunologie, Université Paris Descartes, France. 261p.

Pena, MJ., Darvill, AG., Eberhard, S., York, WS., O’Neill, MA. (2008): Moss and liverwortxyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. Glycobiology ; 18:891–904.

Piao, C.H., Song, C.H., Lee, E.J., Chai, O.H. (2019): Saikosaponin A ameliorates nasal inflammation by suppressing IL-6/ROR- γ t/STAT3/IL-17/NF- κ B pathway in OVA-induced allergic rhinitis. Chem. Biol. Interact.

Quan, J., Li, T., Zhao, W., Xu, H., Qiu, D., Yin, X. (2013): Hepatoprotective effect of polysaccharides from *Boschniakia rossica* on carbon tetrachloride induced toxicity in mice. J. Clin. Biochem. Nutr; 52, 244-252.

Rezaire, A. (2012): Activité anti-oxydante , et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de Doctorat en Phytochimie. Université des Antilles et de la Guyane Guyane. 215p.

Riaz, M. (2017) : Exploration of medicinal plants potential for reproductive system and hormone status. Thèse de doctorat en Biochimie, Université d'agriculture-Faisalabad-Pakistan. 221p.

Roesler, J., Emmendorffer, A., Steinmijller, C., Luettig, B. (1991): Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant echinacea purpurea to test subjects mediates activation of the phagocyte system; 13(7), 931–941.

Roger, O. (2002) : Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de Doctorat. Université de Paris, France, 197p.

Rousselet, M., Vignaud, J.M., Hofman, P., Chatelet, F.P. (2005): Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3).

Ruff, Y. (2008) : Biopolymères dynamiques : Oligo- et polysaccharides .Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur de Strasbourg, France, 308p.

Ruiz, G., (2005) : Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse de Doctorat en chimie appliquée. Université de Limoges. 256p.

Sanchez, M P. (2006) : Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec. Thèse de doctorat, Université Laval, Canada, 119p.

Selles, C., Dib, M.E.A., Allali, H., Tabti, B. (2012a): Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. Mediterr. J. Chem; 2, 408–415.

Selles, Ch. (2012b): Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application des extraits aqueux a inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse de doctorat en sciences physiques, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 175p.

Sharma, V., Thakur, M., Chauhan, N.S., Dixit, V. K. (2010a): Immunomodulatory activity of petroleum ether extract of *Anacyclus pyrethrum*. Pharmaceut. Biol; 48, 1247–1254.

Sharma, V., Thakur, M., Nagendra, S., Chauhan, Dixit, VK. (2010b): Effects of petroleum ether extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. on sexual behavior in male rats. Journal of Chinese Integrative Medicine; 8(8): 767- 773.

Sibilia, J. (2003): Les corticoïdes : mécanismes d'action. La Lettre Du Rhumatologue; 289, 9.

Singh, A. V, (2011): Biopolymers in Drug Delivery: A Review. Pharmacology online; 674, 666–674.

Singh, KS., Gross, RA. (2001): Overview: Introduction to Polysaccharides, Agropoteins, and Poly (amino acids). In: Biopolymers from Polysaccharides and Agropoteins, Ed. American Chemical Society. Washington, DC.

Souza, R. O. S., Madeira, J. C., Chagas, F. D. S., Parreiras, L. A., Santos, G. R. C., Assreuy, A. M. S., Mourao, P. A. S. and Pereira, M. G., (2015): Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. Carbohydrate Polymers; 124, 208-215.

Srivastava, P.K., Pandey, A.K. (2015): Natural products and derivatives: Biological and pharmacological activities. Biochem. Cell. Arch;15(1), 1-38.

Sujith, K., Darwin, C.R., Suba, V. (2012a): Memory-enhancing activity of *Anacyclus pyrethrum* in albino Wistar rats. Asian Pacific Journal of Tropical Disease; 2(4), 307–311.

Sujith, K., Ronald Darwin, C., Suba, V. (2011): Antioxidant activity of ethanolic root extract of *Anacyclus pyrethrum*, International Research J Pharmacy; 2(12), 222-226

Sujith, K., Ronald Darwin, C., Suba, V. (2012b): Toxicological Evaluation of ethanolic extract of *Anacyclus pyrethrum* in Albino Rats. Asian Pacific Journal of Tropic Disease; 2(6):437- 441.

Sun, J., Synytsya, A., Bok, H. (2013): Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba L.*). Int. Immunopharm; 17, 858–866.

Su, Y., Li, L., (2020): Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales. Carbohydr. Polym; 229, 115407.

Tanga, A. (2012): Evaluation d'une stratégie thérapeutique dans la bronco-pneumopathie chronique obstructive basée sur l'administration d'antiprotéases par voie aérosol. Thèse de Doctorat. Université François Rabelais de Tours, France. 250p.

Tauheed, A., Hamiduddin., Akhtar, A. (2017): Aqarqarha (*Anacyclus pyrethrum dc.*) a potent drug in unani medicine: a review on its historical and phyto-pharmacological perspective. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation ; 6, 22–28.

Thakur, M., Weng, A., Fuchs, H., Sharma, V., Shekhar, C., Chauhan, N.S., Dixit, V.K., Bhargava, S. (2012): Rasayana properties of Ayurvedic herbs: are polysaccharides a major contributor. Carbohydrate Polymers; 87, 3–15.

Thomasson, R. (2011) : Effets ergogéniques, métaboliques et hormonaux des glucocorticoïdes chez l'homme et l'animal. Thèse de Doctorat en Médecine humaine et pathologie. Université d'Orléans, France, 253p.

Torres, R., Picado, C., Mora, F. De. (2005): Use of the Mouse to Unravel Allergic Asthma : a Review of the Pathogenesis of Allergic Asthma in Mouse. Arch Bronconeumol; 41(3), 141–152.

Tyagi, S., Mansoori, MH., Singh, NK., Shivhare, MK., Bharadwaj, P., Singh, RK. (2011): Anti-diabetic effect of *Anacyclus pyrethrum DC* in alloxan induces Diabetic Rats. European Journal of Biological Sciences; 3 (4), 117-120.

Ullah, S., Khalil, AA., Shaukat, F., Song, Y. (2019): Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. Foods; 8(8), 304.

Ummartyotin, S. Manuspiya, H., (2015): A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. Renewable and Sustainable Energy Reviews; 41, 402-412.

Urbain, B., Gustin, P., Prouvost, J. F., Ansay, M. (1994): Quantitative assessment of aerial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs. *American Journal of Veterinary Research*; 55(9), 1335–1340.

Usmani, A., Khushtar, M., Siddiqui, H.H., Azizur Rahman, M. (2016): Hepatoprotective effect of *Anacyclus pyrethrum* Linn. against antitubercular drug-induced hepatotoxicity in SD rats. *J Complementary Integrative Medicine* ; 13(13), 1-6.

Van den Eijnden, DH., Stoffyn P., Stoffyn, A. Schiphorst, WECM. (1977): Specificity of Sialyltransferase: Structure of α 1-Acid Glycoprotein Sialylated in vitro: A New Methodology for the Determination of the Structure of the Linkage Formed by Glycosyltransferase Action on Galactosyl-Oligosaccharide-Protein Acceptors. *Eur. J. Biochem.* 81, 1-7.

Van Hoecke, L., Job, E. R., Saelens, X., Roose, K. (2017): Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. *Journal of Visualize Experiments*; 2017(123), 1–8.

Virgine, R. (2012): Implication des canaux CaV1 dans la signalisation calcique des lymphocytes Th₂ murins et humains : possibles applications thérapeutiques dans l’asthme. Thèse de doctorat en Immunologie. Université Toulouse III Paul Sabatier, France. 184p.

Wang, J., Chen, S., Nie, S., Cui, S. W., Wang, Q., Phillips, A. O., Xie, M. (2019): Structural characterization and chain conformation of a water-soluble β -glucan from wild *Cordyceps sinensis*. *J. Agriculture and food chemistry*; 67(45), 12520-12527.

Wang, L., Oh, J.Y., Hwang, J., Ko, J.Y., Jeon, Y., Ryu, B. (2019): In Vitro and In Vivo Antioxidant Activities of Polysaccharides Isolated from Celluclast-Assisted Extract of an Edible Brown Seaweed, *Sargassum fulvellum*. *Antioxidants*; 8(493), 1-12.

Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Zhang, M. (2015): Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydrate Polymers*; 125, 232–240.

Wang, Z., Lu, C., Wu, C., Xu, M., Kou, X., Kong, D., Jing, G. (2014): Polysaccharide of *Boschniakia rossica* induces apoptosis on laryngeal carcinoma Hep2 cells. *Gene*; 536, 203-206.

Wasser, S. P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*; 60, 258–274.

Wu, C.A., Wu, J.J., Tsai, M.J., Chen, R.Y. (2007): Immunomodulatory effects of a traditional Chinese medicine, Chi-Shie-Shuang-Bu-An-Shen-Tang, on BALB/c mice. *J. Ethnopharmacology*; 113, 300–305.

Wu, D.M., Duan, W.Q., Yong, L., Ying, C. (2010): Anti-inflammatory effect of the polysaccharides of Golden needle mushroom in burned rats. *Int. J. Biol. Macromol*; 46, 100–103.

Wu, W., Zhu, Y., Zhang, L., Yang, R., Zhou, Y. (2012): Extraction, preliminary structural characterization , and antioxidant activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Carbohydr. Polym*; 87, 1348–1353.

Wu, Y., Cuis., Tang, J., Wang, Q., Gu, X., (2007): Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited *Sterculia* seeds. *Carbohydrate Polymers*; 70, 437–443.

Yahia-Sendid, S.A. (2015): Chimiokines et interaction entre immunité innée et adaptative dans l’asthme allergique : implication des cellules dendritiques et du récepteur NOD1. Thèse de doctorat en Immunologie. Université du Droit et de la Santé de Lille 2, France 179p.

Yan, H., Xie, Y., Sun, S., Sun, X., Ren, F., Shi, Q., Wang, S., Zha, W., Li, X., Zhang, J. (2010): Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*; 82: 636-640.

Yan, X., (2014): High performance liquid chromatography for carbohydrate analysis. *Int. Telecommun; Energy Conf.* 1–8.

Yu C, H., Dai X,Y., Chen, Q., Zang J,N., Deng L,L., Liu Y, H., Ying H, Z. (2013): Hypolipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Rosae Laevigatae* Fructus in rats. *Carbohydr. Polym*; 94, 56-62.

Yu, X. H., Liu, Y., Wu, X. L., Liu, L. Z., Fu, W., Song, D. D. (2017): Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng. *Carbohydrate Polymers*; 156, 9–18.

Zeng, X., Yuan, Q., Xie, Y., Wang, W., Yan, Y., Ye, H., Jabbar, S. (2015): Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (*Morus alba L.*) leaves. Carbohydrate Polymers; 128, 52-62.

Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., Moucheng, W. (2005): Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. Int. Immunopharm; 5, 811–820.

Zhou, J., Yan, J., Bai, Z., Li, K. Huang, K. (2015): Hypoglycemic activity and potential mechanism of a polysaccharide from the loach in Streptozotocin-induced diabetic mice. Carbohydrate Polymers; 121, 199-206.

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

Annexe

Tableau : Préparation des solutions utilisées.

Nom de la solution	Composition	Quantité des réactifs
Phosphate Buffer Saline ou PBS (10Mm) pH 7,4	NaCl	8.0 g
	KCl	0.2 g
	Na ₂ HPO ₄	1.42 g
	KH ₂ PO ₄	0.24 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution de lyse	NH ₄ CL	0.83 g
	Eau distillée	100 ml
Bleu de trypan	Bleu de Trypan	0.2 g
	Eau distillée	100 ml
NaCl 0.9%	NaCl	0.18g
	Eau distillée	200ml
Formol à 10%	Formol à 34.5 %	144.92 ml
	Eau distillée	500ml
Solution HDM 1	HDM	2.5mg
	Solution saline à 0.9%	1ml
Solution HDM 2	HDM	0.75mg
	Solution saline à 0.9%	1.5ml

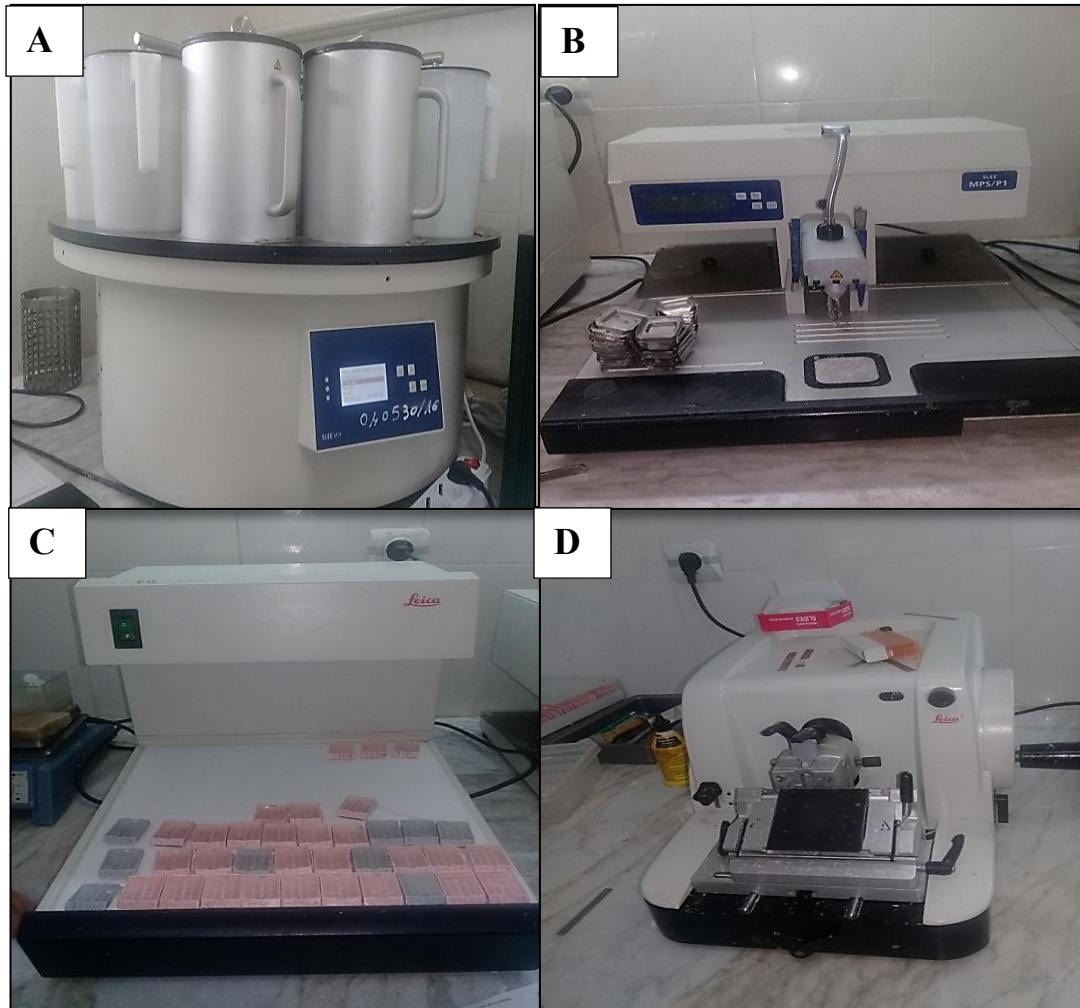


Figure : Matériel utilisé pour la réalisation des coupes histologiques. **(A)** Automate de déshydratation, **(B)** Appareil d'inclusion, **(C)** Plaque de refroidissement, **(D)** Microtome.

Production scientifique

Production scientifique (publication et communications)

- ***Publications internationales (1):***

- Publication internationale intitulée: Anti-inflammatory and antioxidant activity of the hot water-soluble polysaccharides from *Anacyclus pyrethrum* (L.) Lag. Roots. Dans un journal de rang A « the journal of Ethnopharmacology » avec un facteur d'impact 4,360 (2020).

- ***Communications internationales (2):***

- 17-18/01/2018 : participation par poster au séminaire internationale sur les plantes médicinales à l'université d'El-Oued, intitulée : Effet de l'extrait polysaccharidique d'*Anacyclus pyrethrum* sur la réaction inflammatoire respiratoire.
- 16-17/10/2018 : participation par poster au séminaire internationale sur l'agroalimentaire à l'université 8 Mai 1945- Guelma, intitulée : L'effet d'une fraction polysaccharidique d'origine végétale sur l'histologie des organes lymphoïdes.

- ***Communications Nationales (2):***

- 08-09/10/2018 : participation par poster au séminaire nationale Biologie Environnement et Santé à l'université 20 Aout 1955-Skikda, intitulée : Etude thérapeutique des fractions polysaccharidiques végétales sur l'allergie respiratoire (étude histologique).
- 30-31/10/2019 : participation par poster au séminaire national de Biodiversité, Biologie Médicale et Eco-toxicologie Environnementale à l'université 20 Août 1955-Skikda, intitulée: L'effet d'un extrait polysaccharidique végétal sur le taux de cellules immunitaires sanguines.



Anti-inflammatory and antioxidant activity of the hot water-soluble polysaccharides from *Anacyclus pyrethrum* (L.) Lag. roots

Keltoum Alliouche Kerboua^{a,*}, Lilia Benosmane^b, Selma Namoune^b, Khaoula Ouled-Diaf^b, Nora Ghaliaoui^c, Dalila Bendjeddou^b

^a Laboratoire Biologie, Eau et Environnement (LBEE), Université 8 Mai 1945 Guelma, BP, 401, Guelma, 24000, Algeria

^b Faculty of Natural and Life Sciences - Sciences of the Earth and the Universe, University of 8 Mai 1945, Guelma, Algeria

^c Center of Research in Physical and Chemical Analysis CRAPC, BP 248 Algiers, RP, 16004, Algiers, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Anacyclus pyrethrum

Polysaccharides

Anti-inflammatory activity

Phytotherapy

Allergic inflammatory reaction

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: the roots of *Anacyclus pyrethrum* (L.) Lag. (Family: Asteraceae) are used in Algeria to treat respiratory infections, to cure chronic head and nostrils catarrh, and to clear the brain by stimulating the free flow of nasal mucous. They contain a high quantity of hot water-soluble polysaccharides.

Aims of the study: The study aims to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity of polysaccharides extracted from *Anacyclus pyrethrum* roots (APPS).

Materials and methods: The APPS were extracted using boiling water, separated from proteins by the Sevag method then precipitated with 90% ethanol. The antioxidant effect of crude APPS was evaluated using FRAP assay. To investigate the anti-inflammatory potential, mice were treated with crude polysaccharides (25, 50, and 100 mg/kg, i.p.) for 3 days (14th, 15th, and 16th day of the experimentation). Respiratory inflammation was induced by HDM (House Dust Mite), mice were sensitized intranasally with 25 µg HDM suspended in 10 µl NaCl (5 µl/nosril) on days 0 and 7 then challenged with 5 µg HDM on days 14, 15, and 16. Mice were sacrificed 24 h after the last challenge. The number of immune cells in the blood in NL (Nasal Liquid) and in BAL (Broncho Alveolar Liquid) was enumerated, the spleen was removed to calculate the relative spleen weight and to count splenocytes, lungs histopathological examination was carried out to confirm the protective effect of APPS. Structural characterization of APPS was identified using FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy).

Results: The crude APPS possessed reducing power. In vivo assay, treatment with APPS causes a decrease in the number of blood leucocytes at all doses on the one hand, and in the relative spleen weight and splenocytes number on the other hand except at the dose of 50 mg/kg in which an enhancement of the number of splenocytes and immune cells in NL and BAL was significant. The histopathological examination showed clear protection of lung tissue damaged by HDM, after treatment with APPS mainly, at the dose of 50 mg/kg.

Conclusion: Our data clearly showed antioxidant and anti-inflammatory activity of APPS on HDM-challenged mice induced lungs inflammation by equilibrating the inflammatory reaction mostly, with an optimal dose of 50 mg/kg.

1. Introduction

In developed or industrialized countries, respiratory infections are common causes of disability and missed work or school days (Denny, 1995). After cardiac and encephalic vascular disorders, lower respiratory tract infections are the world's third-largest cause of death; however, in countries of low economic status, they take first place (Brown, 1982). In underdeveloped countries, 500 to 900 million acute

respiratory infection episodes are predicted to occur each year. In addition, around 5 million children under the age of five die each year from acute respiratory infections, with 90% of these deaths occurring in poor nations (Savitha et al., 2007), (Ababsa and Aouissi, 2020) reported that Algeria being among the countries with the highest percentage of deaths because of the pandemic COVID-19 which is a severe acute respiratory syndrome.

All classes of microorganisms, including viruses, bacteria, fungi, parasites, and protozoa, are capable of infecting the respiratory tract

* Corresponding author.

E-mail address: keltoum.alliouchekerboua@gmail.com (K. Alliouche Kerboua).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114491>

Received 24 February 2021; Received in revised form 28 July 2021; Accepted 4 August 2021

Available online 5 August 2021

0378-8741/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations

APPS	<i>Anacyclus pyrethrum</i> polysaccharides
BAL	Bronchoalveolar liquid
BHT	Butylated hydroxytoluene
FRAP	Ferric-reducing antioxidant power
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HDM	House dust mite;
I.p	Intraperitoneally
NL	Nasal liquid
PBS	Phosphate buffer saline;
rpm	round per minute
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Scanning electron microscopy
Treg	T regulatory cells

(Denny, 1995). House Dust Mites (HDM; *Dermatophagoides* sp.) are one of the world's most common sources of airborne allergens and the HDM sensitization affects more than 15–20% of the industrialized population and can develop potent inflammatory diseases in allergic asthma, perennial rhinitis, and atopic dermatitis (Jacquet, 2013). Allergic asthma is a chronic disease affecting about 235 million people worldwide and it is characterized by reduced lung function and high levels of eosinophil in the airway inflammation (Willemsen and Leusink, 2016). Fatal complications are the result of outright inflammatory storms due to an extreme reaction of the immune system, for this reason many studies are trying to test products that reduce this reaction (Ababsa and Aouissi, 2020).

However, potential therapies targeting components of the allergic pathways of asthmatic inflammation, have not proven successful in clinical trials (Gregory and Lloyd, 2011). So, the research of the new preventive and/or therapeutic strategies are needed to prevent and/or treat asthmatic disorders since current treatment is still inadequate and shows significant side effects (Willemsen and Leusink, 2016). Many synthetic drugs are derived from herbal sources, it is for this reason that plant extracts can also be a source of new substances (Sujith et al., 2012). Also, drugs from natural products have been known to cause less side effects than other synthetic drugs (Piao et al., 2019). Therapeutically, medicinal herbs with anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial, and/or analgesic properties are used to treat acute infections and inflammatory disorders, (Hart, 2005). Furthermore, several reports have shown that the therapeutic activity of different higher plant extracts can be mediated by interaction with the host's immune system (Bendjeddou et al., 2003).

For centuries, traditional medicine in Algeria has used the roots of *Anacyclus pyrethrum* to treat respiratory infections, they are also used to stimulate salivary glands, cure chronic head and nostrils catarrh, and clear the brain by stimulating free flow of nasal mucous, tears, and stimulating blood flow to the tissues (Bendjeddou et al., 2003). They can also be used in the treatment of epilepsy, paralysis, sciatic, neuralgia, toothache, rheumatism, and cold (Usmani et al., 2016). *Anacyclus pyrethrum* (L.) Lag. (Family: Asteraceae) is a perennial herb in habitat and appearance much like chamomile (Srivastava and Pandey, 2015), which is indigenous to Algeria, Morocco, and Spain (Jawhari et al., 2020), known as Guenthous by Algerian people (Fourment and Roques, 1942), Akarkara in the Ayurvedic system of medicine and Pellitory in western medicine (Thakur et al., 2012). The plant has immunomodulating and immunostimulating properties (Bendjeddou et al., 2003, 2010; Wu et al., 2007), as well as anti-inflammatory and antioxidant potential (Müller et al., 1993; Sujith et al., 2011; Selles et al., 2012). The plant contains a high quantity of hot water-soluble polysaccharides such as fructans mainly the Inulin (Sharma et al., 2010). Polysaccharides represent one of the organic compounds most common in the plant

kingdom (Singh, 2011) and recently, naturally derived polysaccharides have attracted considerable attention due to their non-cytotoxic properties, their beneficial pharmacological effects (Xie et al., 2016), and their biological activities, such as antioxidant, anti-coagulant, antiviral, anti-tumor, immunomodulatory and anti-inflammatory activities (Ramarathnam et al., 1995; Li et al., 2007; Ge et al., 2009; Chen et al., 2011), which are influenced by many structural parameters (Duan and Yu, 2019). On the other hand, Immunomodulation is the most notable biological function of natural polysaccharides, which is associated with their putative role as biological response modifiers (Moradali et al., 2007).

Hot water extraction was widely used as the conventional method for polysaccharide preparation due to the dominant advantages, such as simple and economical (Jin et al., 2012), for this reason, we were interested in this work to the hot water-soluble polysaccharides extracted from the roots of *Anacyclus pyrethrum* in order to study their anti-inflammatory and antioxidant effect on murine respiratory HDM allergy model and to explore their structural characterizations.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The roots of *Anacyclus pyrethrum* were collected from the wild from the region of Sellaoou Announa, Guelma, located in north-eastern Algeria (altitude: 583 m, longitude: 7, 250702) and identified by Dr. Ali Zitouni (Lecturer Class B, Faculty of Natural and Life Sciences, Sciences of the Earth and the Universe, Department of Ecology and Environmental Engineering, 8 May 1945 Guelma University, Algeria).

The plant roots have been washed with water and rinsed with ethanol to remove any impurities, air-dried in the shade and at room temperature. After waiting ten days for drying, a ground product of 300 g was kept in an airtight bottle. A plant sample was deposited in the herbarium of our laboratory (LBEE), 8 Mai 1945 University, with voucher number LBEE/12/3/2017. The name of the plant was checked on the www.theplantlist.org website.

2.2. Extraction of polysaccharides

According to the described method in (Bendjeddou et al., 2003), the extraction of polysaccharides was carried out with some modifications:

First, 300 g of the ground roots are put in water (1 g/18 ml); the suspension was stirred and put in a water bath at 95 °C for 2 h and a half. After cooling, placed overnight in the refrigerator, centrifuged for 30 min at 6000 rpm, the supernatant was recovered, then was reduced to a minimum (1/5) of the volume by evaporation under reduced pressure at 60 °C, and then filtered to remove all residues. The crude polysaccharides were precipitated from the filtrate by adding four volumes of ethanol (95%). This latter was collected by drying amorphous, greenish-brown, and water-soluble AP crude polysaccharides.

Next, the extract (38 g) was dissolved in distilled water, and the Sevag reagent solution (1-butanol/chloroform; 1/4) was added to remove proteins (Wang et al., 2015). The solution obtained was kept for two nights in the refrigerator, after precipitation the solution was divided into two phases: APPS solution after deproteinization as supernatant, denatured protein as precipitate, then the supernatant was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. A fine powder was recovered after precipitation with four volumes of ethanol (95%) and drying. The preparation was dissolved in distilled water (1 g/50 ml), dialyzed against distilled water for 72 h at 4 °C to eliminate small molecules.

Finally, the total polysaccharides were precipitated by adding four volumes of ethanol to obtain after drying and sieving a very fine powder. The percentage yield relative to dry sample weight was 4, 89%.

2.3. Animals and treatments

White female *Mus musculus* mice (6–8 weeks old) with a body weight between 22 and 30 g were purchased from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Mice were housed eight animals in each polycarbonate cage (35 × 23 × 16 cm), and the breeding was done under constant conditions of ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), a natural photoperiod, and a daily food requirement composed of food rich in seeds (wheat, corn), stale bread and water.

After an adaptation period of 10 days, the animals were randomly divided into five groups ($n = 6$): group 1 (normal control), group 2 (allergic control), groups 3, 4, 5 (treated with *Anacyclus Pyrethrum* polysaccharides “APPS” at doses 25, 50, 100 mg/kg body weight respectively). The test solutions of APPS are obtained by adding a quantity of PS which corresponds to the weight of the mouse, and calculated as following: weight of mouse in Kg x the dose, to 0.5 ml of saline (NaCl 0.9%), the whole is put in a water bath to be dissolved easily.

Group 1 received NaCl (0.9%) intranasally on days 0, 7, 14, 15, 16. To induce allergic airway inflammation for groups 2,3,4,5, mice were immunized with 5 μl /nostril of HDM *Dermatophagoides pteronyssinus* extract (02.01.85, Citeqbiologics, Groningen, The Netherlands) at a dose of 25 μg on Day 0 and 7, followed by three intranasal treatments at a dose of 5 μg HDM on days 14, 15, 16 (Madouri, 2016). Mice of APPS treated groups 3, 4 and 5 were received 0,5 ml of APPS solution intraperitoneally on days 14, 15, 16. Twenty-four hours after the last challenge, mice were sacrificed by injecting a lethal dose of a short-acting barbiturate anesthetic intraperitoneally for: blood recovery, bronchoalveolar lavage (BAL), nasal lavage (NL), and removal of lungs and spleen.

All experiments were conducted following US guidelines (NIH publication, 1985) and were approved by the scientific committee of the faculty of Sciences of 8 May 1945 University, Algeria.

2.4. Blood leukocyte formula

Mice were sacrificed by partial decapitation (Bouguenoun et al., 2016). Their peripheral blood was collected in EDTA (Ethylene Diamine Tetra-Acetic) tubes to enumerate the different populations of white blood cells (monocytes, neutrophils, lymphocytes). This was achieved using an auto hematology analyzer (OV-560RET, Balio Diagnostics, Arbonne, France) (Sandor, 2006).

2.5. Nasal lavage (NL)

First, mice under barbiturate anesthesia underwent nasal instillations with 1.5 ml of PBS at 37°C in each nostril (Urbain et al., 1994). Next, the liquid collected from the two nasal cavities was centrifuged (800 g at 4°C for 15 min). After that, each pellet was suspended in 0.9 ml of PBS; then 100 μl of the cell suspension was diluted in 900 μl of the Trypan blue solution before proceeding to cell counting under the light microscope (Leica, USA) using the Malassez cell with magnification at 400 $\times$. Finally, the results were expressed in viable cells per liter of the collected liquid.

2.6. Bronchoalveolar lavage (BAL)

First, mice were anesthetized; an incision in the neck skin and muscles around the trachea was made. Then we introduced a catheter with about 0.5 cm into the tracheal tube and stabilized it using cotton thread (van Hoecke et al., 2017). A syringe loaded with 0.5 ml of PBS at 4°C was connected to the catheter to perform a washing of lungs (three times), the solution was injected then aspirated gently in order to collect the bronchoalveolar liquid. After that, we performed centrifugation at 1500 rpm for 6 min, the supernatant was removed and the pellet obtained was suspended in 0.5 ml of PBS. Next, diluting 100 μl of the cell

suspension in 900 μl of the Trypan blue solution (Bouguenoun et al., 2016). Finally, the viable cells were counted as described before.

2.7. Determination of the relative spleen weight and the number of spleen cells

The animal's spleen was removed after its sacrifice, and relative spleen weight was measured, then placed in a Petri dish containing 3 ml of PBS solution and freed of fat.

The capsule was emptied of its cell content. The cell suspension is then placed in a tube and centrifuged for 3 min at 100 rpm to remove cell debris. The supernatant is recovered and then centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The pellet is resuspended in 0.5 ml of PBS and 4.5 ml of lysis solution (0,83% NH_4Cl) of the red blood cells. After an incubation period of 10 min, the suspension is centrifuged for 10 min at 1500 rpm (Daum et al., 1995., Duncan and Lawrence, 1995). This centrifugation is followed by eliminating the supernatant while the pellet is resuspended in 3 ml of PBS, centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The last step is repeated twice. At the end of the final wash, the cell pellet is taken up in 3 ml of PBS. The viable splenocytes are counted after diluting 100 μl of the cell suspension in 900 μl of the Trypan blue solution.

2.8. Histopathological examination of the lungs

After the dissection of the animals, the lungs were first removed, weighed, then stored in formalin (10%) and oriented to the anatomy-pathological laboratory of the hospital “Ibn Zohr - Guelma” for the histological study. Next the specimens were dehydrated with ethyl alcohol and xylene then embedded in paraffin, cut into into 3-5 μm -thickness sections using a microtome, and stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Finally, the sections were observed using light microscopy (Leica, USA) to evaluate the degree of the inflammation (Bouguenoun et al., 2016).

2.9. Antioxidant activity of APPS

- Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay

First, the FRAP reagent was prepared, then 950 μl was added to 50 μl of APPS solution at 2 mg/ml concentration. Next, the blank of 50 μl distilled water was mixed with the same 950 μl of FRAP solution. After 4 min, the absorbance of the sample was measured at 593 nm by the UV-Visible spectrophotometer (SPECORD 210 PLUS 623F1138, Germany). The total antioxidant capacity was obtained according to the regression equation.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was prepared to prepare different concentrations of solutions (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mmol/L), the linear regression equation: $Y = 0.8876x$, $R^2 = 0.9948$, where Y is the concentration of Fe^{+2} and x is the absorbance. BHT (Butylated hydroxytoluene) is used as a control standard (Benzie and Strain, 1999).

2.10. Structural characterization of APPS

2.10.1. Scanning electron microscopy (SEM) analysis

First, the polysaccharide sample was fixed on the sample holder with double-sided tape and then sprayed with gold powder. Next, the surface structure of the polysaccharide sample was observed by a field emission SEM (Quanta FEG 250, USA). Finally, images were collected with magnification at 1600X and 3000X (Ma et al., 2019).

2.10.2. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

We used FTIR spectroscopy to identify the functional groups present in samples based on peak values in the IR. The Infrared absorption spectroscopy measurements of APPS were performed using an Alpha FT-IR spectrometer (Bruker Optics Inc., MA, Germany) over a wave number ranged from 4000 to 400 cm^{-1} at the resolution 1 cm^{-1} (Chen et al.,

2019).

2.11. Statistical analysis

All the data obtained during the experimentation were analyzed using EXCEL STAT 2010. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), and multiple comparisons were performed using appropriate post-hoc tests. All experimental data were expressed as mean $\pm$ SD, and differences were regarded as significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of APPS on blood leukocytes

The results of counted white blood cells (leucocytes) for each group are presented in (Fig. 1a). The number of blood leukocytes of HDM-treated mice reached a higher level: $7.68 \pm 0.71 \times 10^3$ C/ μ l. The treatment with APPS at all doses (25, 50, 100 mg/kg) shows a decrease of white blood cells number: $1.16 \pm 0.29 \times 10^3$ C/ μ l, $5.85 \pm 0.30 \times 10^3$ C/ μ l, $3.36 \pm 0.35 \times 10^3$ C/ μ l respectively when compared with the HDM group, but only at the dose of 25 mg/kg that this decrease was significant ($p < 0.05$).

The number of different populations of peripheral white blood cells was resumed in (Fig. 1b). The treatment with HDM alone or associated with APPS at the dose of 50 mg/kg induced a significant increase in the lymphocytes number: $5.74 \pm 0.67 \times 10^3$ C/ μ l, $5.27 \pm 0.53 \times 10^3$ C/ μ l respectively but only the dose of 25 mg/kg showed a significant decrease: $0.9 \pm 0.32 \times 10^3$ C/ μ l when compared to the normal group: $0.33 \pm 0.16 \times 10^3$ C/ μ l.

On the other hand, all previous treatments with APPS (25, 50, 100 mg/kg) decreased significantly ($p < 0.05$) the number of blood neutrophils: $0.13 \pm 0.03 \times 10^3$ C/ μ l, $0.35 \pm 0.04 \times 10^3$ C/ μ l, $0.39 \pm 0.03 \times 10^3$ C/ μ l respectively and also blood monocytes: $0.09 \pm 0.019 \times 10^3$ C/ μ l, $0.22 \pm 0.019 \times 10^3$ C/ μ l, $0.55 \pm 0.05 \times 10^3$ C/ μ l respectively in a dose-dependent manner, this decrease was also more remarked in the group treated with 25 mg/kg of APPS when compared to normal group: $0.94 \pm 0.038 \times 10^3$ C/ μ l and $0.68 \pm 0.071 \times 10^3$ C/ μ l and to HDM group: $0.76 \pm 0.12 \times 10^3$ C/ μ l and $0.77 \pm 0.052 \times 10^3$ C/ μ l.

3.2. Effect of APPS on the number of cells in nasal and bronchoalveolar liquids

The count results of immune cells in NL and BAL are depicted in (Fig. 2a) and (Fig. 2b) respectively. The viability of cells tested by Trypan blue dye exclusion was always more than 95%. Briefly, the treatment with HDM alone elevated significantly ($p < 0.05$) the number of NL cells ($4.29 \pm 0.30 \times 10^9$ cells/L) and BAL cells ($5.41 \pm 0.52 \times 10^9$ cells/L) when compared to the normal group: $1.55 \pm 0.56 \times 10^9$ cells/L and $1.26 \pm 0.42 \times 10^9$ cells/L. On the other hand, the combined treatment with HDM and APPS at the doses 25 and 50 mg/kg, extend significantly ($P < 0.05$) this increase in a dose-dependent manner: $6.8 \pm 0.83 \times 10^9$ cells/L and $7.02 \pm 0.66 \times 10^9$ cells/L in NL respectively, $8.76 \pm 1.05 \times 10^9$ cells/L and $30.92 \pm 1.46 \times 10^9$ cells/L in BAL respectively, while the treatment with 100 mg/kg of APPS presented a significant decrease ($p < 0.05$) of both NL cells: $2.5 \pm 0.58 \times 10^9$ cells/L and BAL cells: $2.31 \pm 0.43 \times 10^9$ cells/L when compared with other treated groups.

3.3. Effect of APPS on the spleen relative weight and the number of spleen cells

Figures (Fig. 3a) and (Fig. 3b) represent the relative spleen weight (RSW) of mice and the number of splenocytes respectively when the viability of splenocytes tested by Trypan blue dye exclusion was always more than 95%.

Animals treated with HDM alone or combined with APPS at the dose of 50 mg/kg present a significant increase ($p < 0.05$) of RSW ($0.54 \pm 0.06\%$) when compared with the normal group ($0.28 \pm 0.03\%$). Furthermore, the HDM challenge induced a remarkable increase in the splenocytes number ($13.16 \pm 0.59 \times 10^9$ cells/L) when compared with the control group ($9.28 \pm 0.3 \times 10^9$ cells/L). When 50 mg/kg of APPS was added to the treatment, the number of splenocytes recorded a considerable increase ($15.41 \pm 0.52 \times 10^9$ cells/L) with a significant difference ($P < 0.05$) when compared to the control group on one hand and to the HDM group on the other hand. Unlike that, the dose of 25 and 100 mg/kg of APPS caused a significant decrease ($p < 0.05$) of the splenocytes number when it was compared to the HDM group ($10.37 \pm 0.33 \times 10^9$ cells/L and $9.83 \pm 0.4 \times 10^9$ cells/L respectively).

3.4. Effect of APPS on macroscopic and microscopic lung aspect

Figures (Fig. 4) and (Fig. 5) show the effect of APPS at different doses

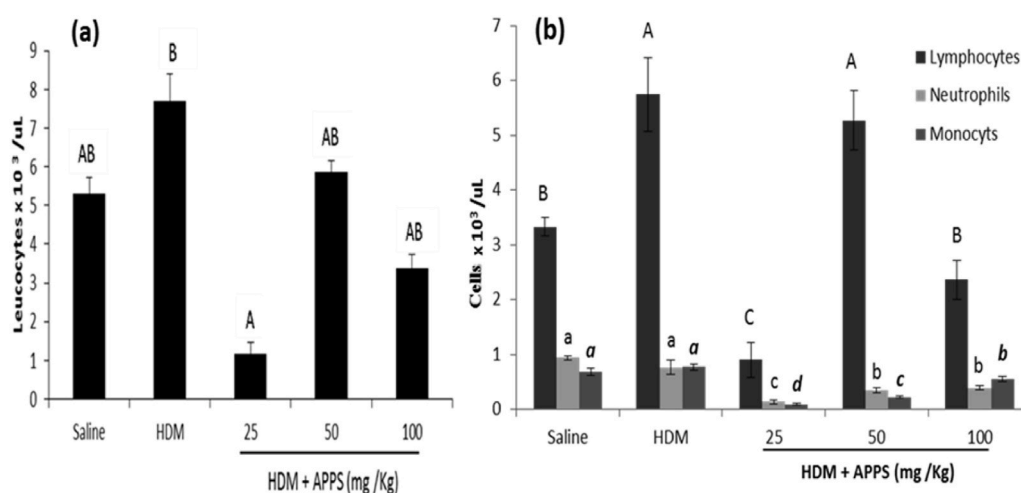


Fig. 1. Effect of APPS on total blood leukocytes number (a) and the different populations (monocytes, neutrophils, lymphocytes) (b) of mice. Animals were sensitized intranasally on days 0 and 7 with 25 μ g HDM suspended in 10 μ l NaCl (5 μ l/nostril) then challenged with 5 μ g HDM on days 14, 15, and 16. APPS treated mice were received with HDM 0, 5 ml of APPS solution intraperitoneally on days 14, 15, 16 at 3 doses: 25, 50 and 100 mg/Kg. Control mice received NaCl only. Animals were sacrificed on day 17 and the blood was recuperated. Data are mean $\pm$ SEM. Means that do not share the same letter are significantly different (A, B, C: leukocytes and lymphocytes groups which are significantly different. a, b, c: neutrophils groups which are significantly different. a, b, c, d: monocytes groups which are significantly different). The significant difference taken from Tukey test was when ($P < 0.05$).

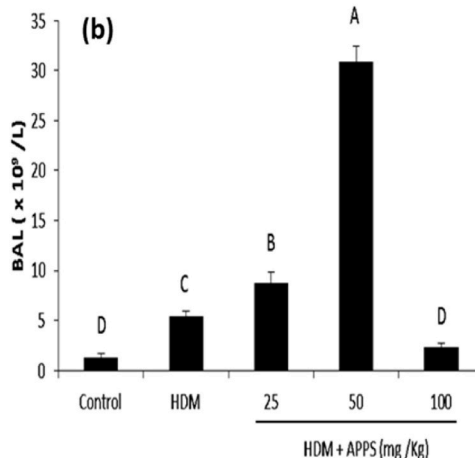
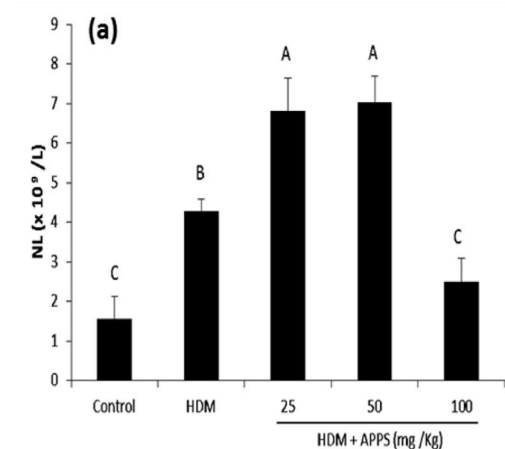


Fig. 2. Effect of APPS on NL cells (a) and BAL cells (b) of mice. Animals were sensitized intranasally on days 0 and 7 with 25 µg HDM suspended in 10 µl NaCl (5 µl/nostril) then challenged with 5 µg HDM on days 14, 15, and 16. APPS treated mice were received with HDM 0, 5 ml of APPS solution intraperitoneally on days 14, 15, 16 at 3 doses: 25, 50 and 100 mg/Kg. Control mice received NaCl only. Animals were sacrificed on day 17 and the liquids were recuperated. Data are mean±SEM. Means that do not share the same letter are significantly different (A, B, C, D: groups of NL cells and BAL cells which are significantly different). The significant difference taken from Tukey test was when ($P < 0, 05$).

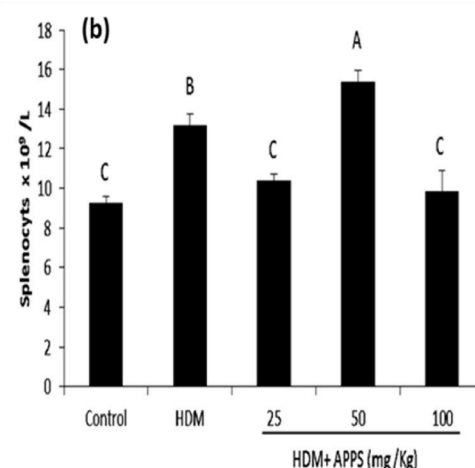
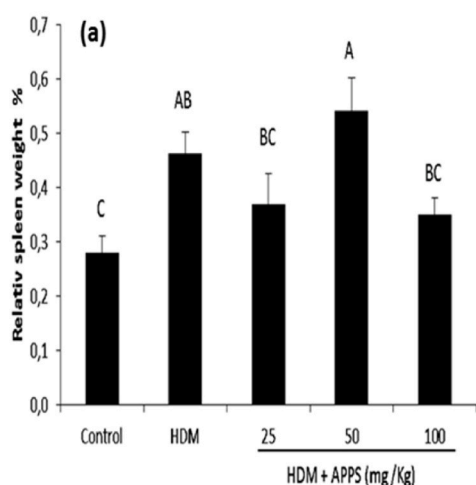


Fig. 3. Effect of APPS on relative spleen weight “RSW” (a) and on the number of spleen cells (b) of mice. Animals were sensitized intranasally on days 0 and 7 with 25 µg HDM suspended in 10 µl NaCl (5 µl/nostril) then challenged with 5 µg HDM on days 14, 15, and 16. APPS treated mice were received with HDM 0, 5 ml of APPS solution intraperitoneally on days 14, 15, 16 at 3 doses: 25, 50 and 100 mg/Kg. Control mice received NaCl only. Animals were sacrificed on day 17 and the spleen was recuperated. Data are mean±SEM. Means that do not share the same letter are significantly different (A, B, C: spleen cells groups, RSW groups which are significantly different). The significant difference taken from Tukey test was when ($P < 0, 05$).

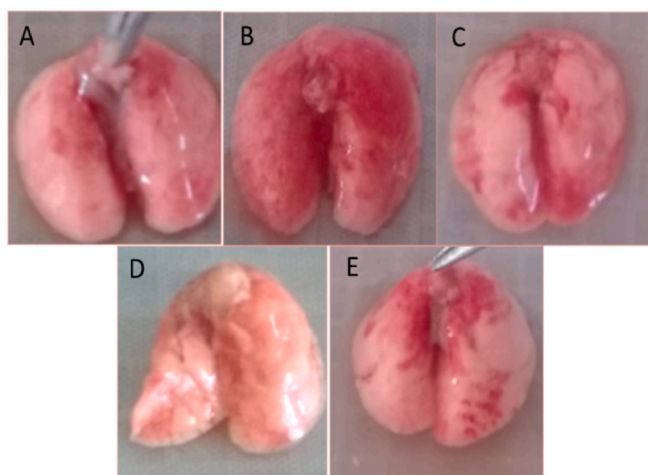


Fig. 4. Effect of APPS on lung macroscopic aspect in HDM-exposed animals. A: normal control group treated with saline only, B: HDM group, C: treated with HDM + APPS (25 mg/kg), D: treated with HDM + APPS (50 mg/kg), E: treated with HDM + APPS (100 mg/kg).

(25, 50, and 100 mg/kg) on the lung macroscopic aspect and lung

histopathology of HDM challenged mice respectively.

As seen in (Fig. 4A) the lung aspect of normal mice has no inflammatory symptoms and shows pink tissue with few post-mortem blood spots. HDM-induced lung damage can be observed directly in (Fig. 4B) compared with normal mice. The lungs appear visibly inflamed and they are covered with bright red spots with darker areas. Signs of improvement are observed in the lungs of mice treated with 25 mg/kg of APPS (Fig. 4C) and 100 mg/kg (Fig. 4E). The pulmonary parenchyma of mice treated with the 50 mg/kg (Fig. 4D) dose kept the pink appearance without any inflammatory signs.

(Fig. 5A) presents the lung section of normal mice; it showed an alveolar pulmonary parenchyma of normal morphology and structure characterized by simple vascular congestion. The alveolar lumens are lined with regular pneumocytic cells. Bronchial walls are identified, bordered by a pseudostratified epithelium of respiratory type. However, post-mortem hemorrhage was noted on the sections.

The lung section of HDM treated mice (Fig. 5B) showed slight pneumocytic hyperplasia and distended alveoli resulting in a decrease in alveolar diameter. The treatment resulted in significant vascular congestion made up of thick-walled, lumen-engulfed vessels in the interstitial tissue. Indeed, an interstitial hemorrhage in some places has been observed thus favoring a discrete lymphoplasmocytic infiltrate.

In the lungs of mice treated with 25 mg/kg of APPS (Fig. 5C), the alterations in the pulmonary parenchyma persist but they are minimal. The congestive and hemorrhagic phenomena are less extensive and the

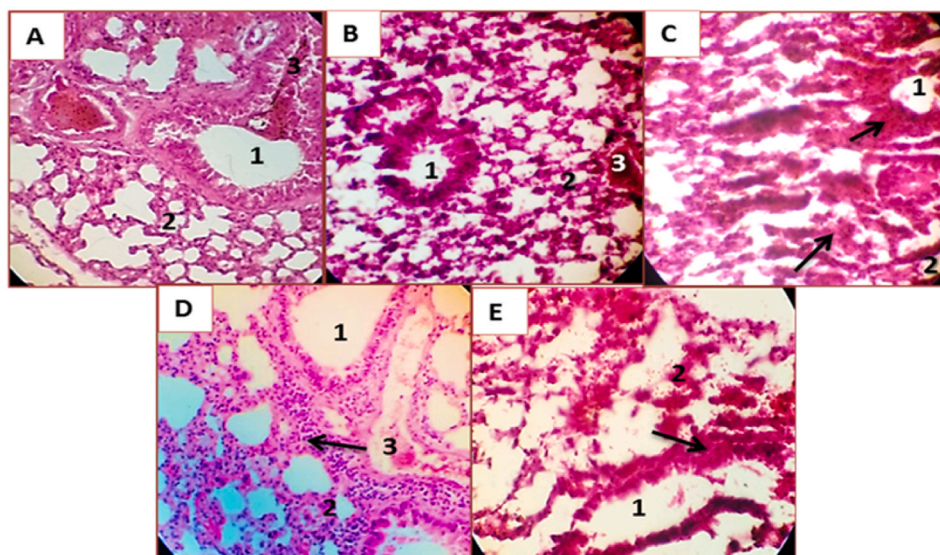


Fig. 5. Photomicrographs of HE-stained lung tissue from each group (x 40). A: normal control group treated with saline only, B: HDM group, C: treated with HDM + APPS (25 mg/kg), D: treated with HDM + APPS (50 mg/kg), E: treated with HDM + APPS (100 mg/kg). 1– Bronchiole, 2– Alveolus, 3– Blood vessel, → - Cell infiltrate.

alveolar damage is less significant.

Regarding the lungs of APPS treated mice at 50 mg/kg (Fig. 5D) and 100 mg/kg (Fig. 5E); the histological appearance is almost similar, the parenchyma is almost at the limit of normal and shows only discrete interstitial alveolus's lesions with a discrete lymphocytic infiltrate.

3.5. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of APPS

The total antioxidant power of APPS was investigated by FRAP assay which is a direct test using a standard curve of FeSO_4 and compared with BHT, the results are shown in (Fig. 6). The results showed that the polysaccharides extracted from *Ancylus Pyrethrum* possessed reducing power, the FRAP value was $0,109283 \pm 0,004$ mmol/mg and it is six times lower than BHT ($0,646473 \pm 0,0003$ mmol/mg). This indicates that APPS can react with reactive oxygen species (ROS) to transform them into stable products if we consider them as effective electron donors (Su and Li, 2020).

3.6. Structural characterization of APPS

3.6.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron micrographs of APPS were shown in (Fig. 7 A, B). The results showed that the polysaccharides extracted from *Anacyclus Pyrethrum* by hot water had a rough surface with characteristic thin wrinkles. These findings were almost similar to those of (Jia et al., 2013)

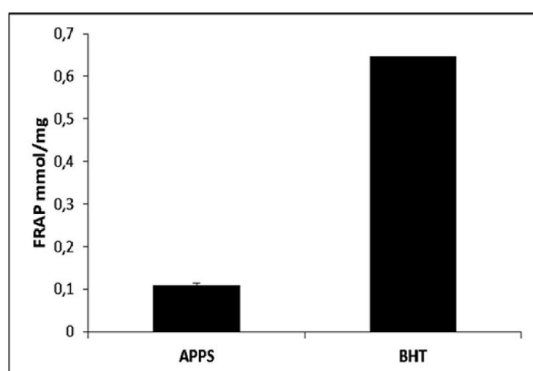


Fig. 6. The FRAP of APPS solution.

in which it was reported that tea polysaccharides extracted by hot water had a rough surface with large wrinkles.

3.6.2. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

Infrared spectroscopy is an important method to study the functional groups and molecular structures of organic compounds, and it is also an indispensable means to study the structure of carbohydrates (Chen and Huang, 2019).

Figure (Fig. 8) illustrates the FT-IR spectrum ranging from 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} of APPS. The large absorption band at around 3238 cm^{-1} could be assigned to the stretching vibrations of hydrogen-bonded $-\text{OH}$ groups; indicating the existence of intermolecular or intra-molecular hydrogen bonds in the polysaccharide. The small absorption band appears at 2930 cm^{-1} assigned to vibrations of $-\text{CH}$. The band at 1635 cm^{-1} was due to $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration.

The bands at $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ suggested that polysaccharides contained in their structure pyran monomers (Wu et al., 2012) and also contained $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ and $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ link bonds (Jia et al., 2013). An absorbance at nearly 933 cm^{-1} and 872 cm^{-1} may derive from β -glycosidic linkages and α -glycosidic linkages respectively between the sugars in the molecular structure (Wu et al., 2012; Jing et al., 2014).

4. Discussion

In biomedical research, polysaccharides isolated from plants have attracted a considerable amount of attention because of their large spectrum of therapeutic features and relatively low toxicities (Yan et al., 2015). In the present study, we have assessed the effect of the hot-water polysaccharides extracted from the roots of an endemic plant in Algeria: *Anacyclus pyrethrum* on allergen-induced airway inflammation and immune response. Inflammation is a common and important pathological process (Cates et al., 2014), its goal is to remove the pathogen and repair tissue damage. Inflammation may often be harmful due to the pathogen's aggressiveness, anomalies in the regulation of inflammatory process law, or quantitative and qualitative abnormalities of the cells involved in inflammation (Korganow et al., 2002).

In bronchial asthma and nasal allergy, HDM is considered as one of the most important antigens (Maeda et al., 1992) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) as a major source of allergen in house dust (Hill and Nunn, 1980). In the present work, murine models for HDM-allergic pulmonary inflammation are commonly used. The results showed that

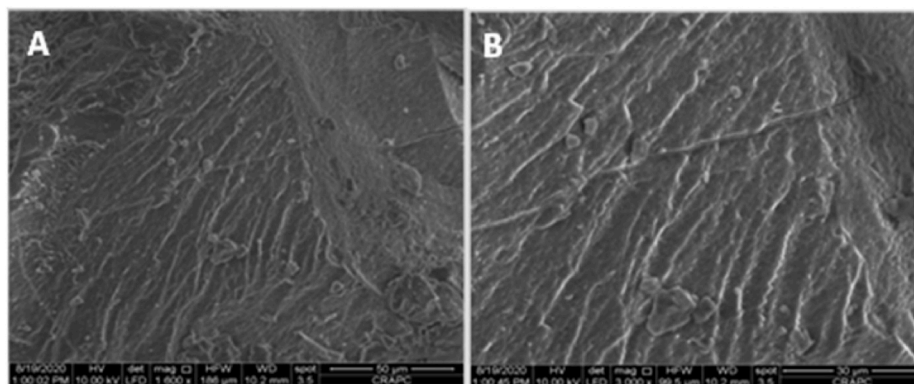


Fig. 7. SEM micrographs of APPS. (A) The morphology of APPS at 1600x. (B) The morphology of APPS at 3000x.

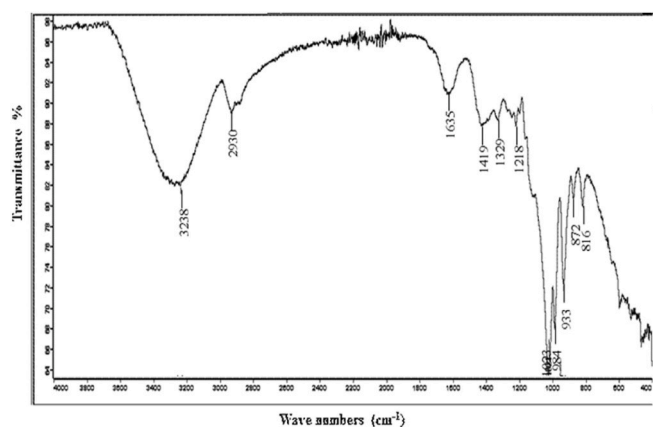


Fig. 8. Infrared spectrum of APPS extract.

this allergen caused a significant pulmonary inflammation and bronchial hyperactivity, the same findings are shown in previous studies (Madouri, 2016). This inflammation follows the stimulation of polynuclear cells thus causing tissue damage (Bouguenoun et al., 2016).

The results of leucocytes counted in the blood showed that the HDM challenge induced an increase in the number of lymphocytes compared to the saline-challenged group and this correlated with the enhancement of the relative spleen weight and the number of splenocytes. Hammad and Lambrecht (2008) reported that (Der p) causes an increase in the permeability of the epithelium by the cleavage of tight-junction molecules (occludin, claudin) which facilitates the migration of immune cells to inflammatory sites. All this, explains the increase in cells counted in NL and BAL on the one hand, and the severity of the inflammation of the respiratory tract observed in the lung of mice exposed only to HDM on the other hand. These findings are in agreement with those found by Hongjia et al. (2010). Thus, the decrease in neutrophils in mice with HDM may be explained by their migration to the respiratory tract. Lamblin et al. (1998) believe that there is an association between the migration of neutrophils and asthma attacks and that the number of neutrophils increases in BAL and bronchial biopsies of asthma patients (Yahia-sendid, 2015).

Polysaccharides obtained from different natural sources are known to affect a variety of biological activities, especially the immune response (Seok et al., 2009). To assess the immune effect of polysaccharides obtained from *Anacyclus pyrethrum* roots by hot water extraction; a treatment at different doses (25, 50, 100 mg/kg) was done and the results confirmed that those compounds have an effective role in the suppression of the inflammation induced by the allergen. At the dose of 50 mg/kg a significant increase in relative spleen weight was observed, these results are in agreement with those found by Nie and Xie

(2011) and Zheng et al. (2005) who noticed an increase in the index of the spleen and that of the thymus after polysaccharides administration, which can be explained by the stimulation of immune cells proliferation in the spleen. These findings are confirmed by the in vitro tests of Bendjeddou et al. (2003) in which hot water polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum* and *Alpinia galanga* enhanced the proliferation of murine splenocytes. Moreover, Meng et al. (2016) reported that under the effect of Lentinan, the increased production of activated cytotoxic T-lymphocytes in the spleen was observed. In contrast, the doses (25 and 100 mg/kg) caused a decrease in the relative spleen weight and the number of splenocytes compared to the HDM-challenged group, for this reason, we can consider that the dose of 50 mg/kg is the immuno-stimulant dose.

Previous studies showed that a fall in the number of leukocytes was observed in the peripheral blood about 30–60 min after intravenous injection of 5 mg of the polysaccharides (Roesler et al., 1991). Our results showed that the total blood leucocytes and also lymphocytes, neutrophils, monocytes counted 24 h after the last polysaccharides administration, was decreased when compared with the HDM group. These findings may be explained by the activation of immune cells' migration into the inflamed airway sites after an increase of their production and release in the blood. The enhancement of cells counted in NL and BAL of polysaccharides treated mice at dosage (25 and 50 mg/kg), confirm the probability of activation of the cells recruitment process from the blood to the inflammatory sites under the effect of polysaccharides treatment in a dose-dependent manner, but the effect of APPS at high dose (100 mg/kg) is reduced, and there is no difference when compared with control group while, lungs appearance is not identical, this may be explained by a strong anti-inflammatory effect exerted by the high dose, via non cellular agent.

It is clear that these polysaccharides can act as potent immunostimulators and this effect can be monitored by the chemokine's production. Sun et al. (2013) reported that chemokine can be produced at the site of infection or injury, during an immune response to mobilize of immune cells (neutrophils, monocytes, lymphocytes, fibroblasts and keratinocytes), whereas others have homeostatic or household roles such as regulating cell migration, in the same report the authors found that water-soluble Mulberry polysaccharides (JS-MP-1) stimulate the murine macrophage's (RAW264) production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in a dose-dependent manner.

All the results of our study were supported by the analysis of macroscopic and histopathological examination which showed clear protection of lung tissue damaged by HDM, after treatment with APPS mainly, at a dose of 50 mg/kg. These observations confirm that the APPS can have a regulatory effect on the inflammatory reaction induced by the allergen. This anti-inflammatory activity is probably due to the activation of regulatory T cells (Treg) which are key players in immune regulation. Several studies have suggested that the onset of asthma in humans may be linked to insufficient development of regulatory T cells

or/and inhibition of their function (Yahia-sendid, 2015). These cells migrate to peripheral sites to regulate the inflammation of injured tissues and to maintain peripheral tolerance at mucosal surfaces (Tr, 2004). Treg act in 2 ways: by their cytotoxic effect (production of perforin and granzyme) or by the production of inhibitory cytokines (IL-10 and TNF) as agents suppressing inflammatory responses (Yahia-sendid, 2015). Previous studies showed that an anti-inflammatory cytokine (IL-10) is considerably produced under the effect of crude polysaccharide and fraction F2 extracted from *Capsosiphon fulvescens*, this suggested that the polysaccharides might suppress the potentially detrimental effect of pro-inflammatory cytokines by releasing anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Karnjanapratum et al., 2012). These findings are confirmed by the results of (Tabarsa, 2012) in which the crude and fractionated polysaccharides from *U. Pertusa*, at various concentrations, increased the mRNA expression of IL-10.

Polysaccharides, which have complex and large molecular structures, via certain signaling pathways, may activate immune cells (Chi et al., 2015). They exert their action by binding to specific receptors on the surface of the immune cells such as macrophages, neutrophils, natural cytotoxic cells (NK) and T lymphocytes, since they cannot penetrate into cells (Sanchez and Phytologie, 2006). In the present study structural characterizations were conducted using physicochemical property, SEM analyses and FTIR. SEM results indicate that APPS have a homogenous structure. On the other hand, IR spectroscopy is typically used for quantitative measurement of organic functional groups which are present in our extract, especially O–H, N–H, and C=O. In polysaccharide structure, there are many hydroxyl groups (Qian et al., 2009) which may have a reducing power reflecting the ability to donate electrons, it is one of the most important indicators of antioxidant activity of bioactive compounds (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). Antioxidant substances can block the radical chain reaction by donating electrons; it can convert reactive oxygen species (ROS) which cause several diseases to more stable products (Tabarsa, 2012). Our results showed that when APPS is added to the reaction mixture, they can reduce ferric ions, because of the presence of good hydroxyl radical scavenging activity in their structure. airway inflammation can be caused by reactive oxygen species (ROS) produced by lung parenchymal cell and lung macrophages (Biswas et al., 2017) and as long as the APPS have an antioxidant reaction it will help to trap ROS and eliminate their harmful effects, so we can also say that they can exert an anti-inflammatory effect via their antioxidant action.

In conclusion, the present study demonstrated direct evidence of the antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides extracted by hot water from *A. pyrethrum* roots on HDM-challenged mice-induced lungs inflammation. These findings confirm previous suggestions which support that several polysaccharides isolated from botanical sources used in traditional medicine have shown immunostimulation against allergens. In the case of APPS, this activity is regulated and the elimination of allergen is realized with minor tissue damage by equilibrating the inflammatory reaction mostly, with an optimal dose of 50 mg/kg. However, more work needs to be carried out to clarify the detailed mechanism of the anti-inflammatory activity of these compounds on one hand and to identify their fine structures on the other hand, hoping to find a solution to relieve the complications of respiratory infections caused by dust mites and even viruses, like the latter which caused a global pandemic COVID 19.

CRedit authorship contribution statement

Keltoum Alliouche Kerboua: Polysaccharides extraction, in-vivo tests, statistical analysis, manuscript writing. **Lilia Benosmane:** Polysaccharides extraction, in-vivo tests. **Selma Namoune:** Polysaccharides extraction, in-vivo tests. **Khaoula Ouled-Diaf:** Polysaccharides extraction, in-vivo tests. **Nora Ghaliaoui:** FRAP test, structural characterization of polysaccharides (SEM, FTIR). **Dalila Bendjeddou:** Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank: Dr. Ali Zitouni, 8 May 1945 Guelma University, for plant identification, Dr. Aissam Bousbia, 8 May 1945 Guelma University, for advice related to statistical analysis, Dr. Samir Sellami, High School of Technological Teaching Enset-Skikda, for English revision.

References

- Ababsa, M., Aouissi, H.A., 2020. Current state of the coronavirus (covid-19) in Algeria. J. Community Med. Heal. Care 5 (1), 1036. <https://doi.org/10.26420/jcommunitymedhealthcare.2020.1036>.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem. 102, 1233–1240.
- Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D., 2010. Immunologically active polysaccharides isolated from *Anacyclus pyrethrum*. Libyan Agric Res Cen J Intl 1, 128–133.
- Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D., 2003. Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. J. Ethnopharmacol. 88, 155–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00226-5).
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 299, 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5).
- Biswas, S., Das, R., Banerjee, E.R., 2017. Role of free radicals in human inflammatory diseases. AIMS Biophys 4, 596–614. <https://doi.org/10.3934/biophys.2017.4.596>.
- Bouguenoun, I., De Pauw-Gillet, M.C., Bensakhri, Z., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Bendjeddou, D., 2016. Effet inflammatoire des extraits de *Cupressus sempervirens* planté dans l'Est de l'Algérie: du modèle murin à la stimulation des cellules BEAS-2B par l'allergène majeur Cup s 1. Rev. Fr. Allergol. 56, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.09.005>.
- Brown, E.R., 1982. Pediatric respiratory disease. The Journal of the American Medical Association J. Am. Med. Assoc. 807. <https://doi.org/10.1001/jama.1982.03330170074042>, 978-956-14-1945-2.
- Cates, E.C., Fattouh, R., Wattie, J., Mark, D., Goncharova, S., Coyle, A.J., Jordana, M., 2014. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. J. Immunol. 173, 6384–6392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6384>. <http://www.jimmunol.org/content/173/10/6384>.
- Chen, D., Tang, J., Khatibi, N.H., Zhu, M., Li, Y., Wang, C., Jiang, R., Tu, L., Wang, S., 2011. Treatment with Z-ligustilide, a component of *Angelica sinensis*, reduces brain injury after a subarachnoid hemorrhage in rats. J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 337, 663–672.
- Chen, F., Huang, G., 2019. Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter gourd polysaccharide. Int. J. Biol. Macromol. 141, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.239>.
- Chen, G., Yuan, B., Wang, H., Qi, G., Cheng, S., 2019. Characterization and antioxidant activity of polysaccharides obtained from ginger pomace using two different extraction processes. Int. J. Biol. Macromol. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.048>.
- Chi, A., Kang, C., Zhang, Y., Tang, L., Guo, H., Li, H., 2015. Immunomodulating and antioxidant effects of polysaccharide conjugates from the fruits of *Ziziphus Jujube* on Chronic Fatigue Syndrome rats. Carbohydr. Polym. 122, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.082>.
- Daum, J.R., Shepherd, D.M., Randolph, J.N., 1995. Physical interactions and early signaling between helper T lymphocytes and B lymphocytes. Methods in Immunotoxol. Singapore Wiley liss Inc, New York, Chichester, Toronto, pp. 469–481.
- Denny, F.W., 1995. The clinical impact of human respiratory virus infections. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152 https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.4_pt_2.s4.
- Duan, G., Yu, X., 2019. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia*. Int. J. Biol. Macromol. 137, 1112–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.177>.
- Duncan, D.D., Lawrence, D.A., 1995. T cells and cloned and transformed T-cell lines to assess immune function. Methods Immunotoxol 1, 483–505.
- Fourment, Roques, 1942. Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, p. 159p. Algiers.
- 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. Carbohydr. Polym. 77, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.020>.
- Gregory, L.G., Lloyd, C.M., 2011. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. Trends Immunol. 32, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.006>.

- Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2008. Dendritic cells and epithelial cells : linking innate and adaptive immunity in asthma. *Immunology* 8, 193–204. <https://doi.org/10.1038/nri2275>.
- Hart, B.L., 2005. The evolution of herbal medicine : behavioural perspectives. *Anim. Behav.* 70, 975–989. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.03.005>.
- Hill, L.E., Nunn, A.J., 1980. Antibody response following prolonged. Hyposensitization with Dermatophagoides pteronyssinus Extract 440, 431–440.
- Hongjia, L., Qingling, G., Meiyang, L., et al., 2010. House dust mite regulate the lung inflammation of asthmatic mice through TLR4 pathway in airway epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 28 (7), 597–603.
- Jacquet, A., 2013. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy* 18. <https://doi.org/10.1155/2013/735031>, 2013.
- Jawhari, F.Z., El Moussaoui, A., Bourhiah, M., Imtara, H., Mechchate, H., Es-Safi, I., Ullah, R., Ezzeldin, E., Mostafa, G.A., Grafov, A., Ibenmoussa, S., Boustia, D., Bari, A., 2020. Anacyclus pyrethrum (L): chemical composition, analgesic, anti-inflammatory, and wound healing properties. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25225469>.
- Jia, X., Dong, L., Yang, Y., Yuan, S., Zhang, Z., Yuan, M., 2013. Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from Hawk tea (*Litsea coreana* var. *lanuginosa*). *Carbohydr. Polym.* 95, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.005>.
- Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C., Shang, P., 2012. Isolation , structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv .) Diels : a review. *Carbohydr. Polym.* 89, 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.049>.
- Jing, P., Zhao, S., Lu, M., Cai, Z., Pang, J., Song, L., 2014. Multiple Fingerprint Analysis for Investigating Quality Control of *Flammulina Velutipes* Fruiting Body Polysaccharides. <https://doi.org/10.1021/jf504349r>.
- Karnjanapratum, S., Tabarsa, M., Cho, M., You, S., 2012. International journal of biological macromolecules characterization and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens*. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.006>.
- Korganow, A.S., Martin, T., Pasquali, J.L., 2002. Item 112 – Réactions inflammatoires : aspects biologiques et cliniques. *Conduite à tenir* 3–13.
- Lamblin, C., Gosset, P., Tillie-leblond, I., Saulnier, F., 1998. Bronchial Neutrophilia in Patients with Noninfectious Status Asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 394–402.
- Li, Z.S., Li, H.Y., Li, Q., Wang, Z., Qiu, S., 2007. Research of the function of *Angelica sinensis* Diels (ASD) on the hemopoietic rehabilitation of X-ray radiated mice [J]. *LISHIZHEN Med Mat Med Res* 18, 3048–3049.
- Ma, J., Liu, H., Han, C., Zeng, S., Xu, X., 2019. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed. *Carbohydr. Polym.* 115409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115409>.
- Madouri, F., 2016. Asthme allergique induit par un allergène d'acarien , House Dust Mite (HDM) : rôles de la caspase-1 et de la protéine kinase C θ (PKC- θ). *Allergologie*. Université d'Orléans. 247.
- Maeda, K., Yamamoto, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., 1992. House Dust Mite (HDM) Antigen in Naturally Occurring Lesions of Atopic Dermatitis (AD): the Relationship between HDM Antigen in the Skin and HDM Antigen-specific IgE Antibody 3.
- Meng, X., Liang, H., Luo, L., 2016. Antitumor polysaccharides from mushrooms : a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr. Res.* 424, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.02.008>.
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A., 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. Immunopharm.* 7, 701–724. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.01.008>.
- Müller, K., Gührer, D., Piwek, S., Wiegand, W., 1993. Antiproliferative antrones with modulated redox properties. 1. Novel 10-substituted 1, 8-dihydroxy-9 (10H)-anthracenones as inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 36, 4099–4107.
- Nie, S., Xie, M., 2011. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids* 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.010>, 25.
- NIH Publication #85-23, 1985. Respect for Life. National Institute of Environment. Health. Sci. NIEHS. <http://www.niehs.gov/oc/factsheets/wri/studybgn.htm>.
- Piao, C.H., Song, C.H., Lee, E.J., Chai, O.H., 2019. Saikosaponin A ameliorates nasal inflammation by suppressing IL-6/ROR- γ t/STAT3/IL-17/NF- κ B pathway in OVA-induced allergic rhinitis. *Chem. Biol. Interact.* <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108874>, 108874.
- Qian, J., Chen, W., Zhang, W., Zhang, H., 2009. Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM , XRD , IR and optical rotation : a primary approach. *Carbohydr. Polym.* 78, 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.025>.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S., 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 75–82.
- Roesler, J., Emmendorfer, A., Steinmijller, C., Luettig, B., 1991. Application of Purified Polysaccharides F Rom Cell Cultures of the Plant *Echinacea Purpurea* to Test Subjects Mediates Activation of the Phagocytesystem *, vol. 13, pp. 931–941.
- Sanchez, M.P., Phytologie, D.D.E., 2006. Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec.
- Sandor, S., 2006. Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 504–506. <https://doi.org/10.1002/micr>.
- Savitha, M.R., Nandeeshwara, S.B., Pradeep Kumar, M.J., Farhan-Ul-Haque, Raju, C.K., 2007. Modifiable risk factors for acute lower respiratory tract infections. *Indian J. Pediatr.* 74, 477–482. <https://doi.org/10.1007/s12098-007-0081-3>.
- Selles, C., Dib, M.E.A., Allali, H., Tabti, B., 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. *Mediterr. J. Chem.* 2, 408–415. <https://doi.org/10.13171/mjc.2.2.2012.01.11.22>.
- Seok, J., Youl, J., Kee, E., 2009. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. *Carbohydr. Polym.* 78, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.036>.
- Sharma, V., Thakur, M., Chauhan, N.S., Dixit, V.K., 2010. Immunomodulatory activity of petroleum ether extract of *Anacyclus pyrethrum*. *Pharmaceut. Biol.* 48, 1247–1254. <https://doi.org/10.3109/13880201003730642>.
- Singh, A.V., 2011. Biopolymers in drug delivery: a review. *Pharmacologyonline* 674, 666–674.
- Srivastava, P.K., Pandey, A.K., 2015. Natural products and derivatives: biological and pharmacological activities. *Biochem. Cell. Arch.* 15, 1–38, 1.
- Su, Y., Li, L., 2020. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales. *Carbohydr. Polym.* 229, 115407. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115407>.
- Sujith, K., Darwin, C.R., Suba, V., 2012. Memory-enhancing activity of *Anacyclus pyrethrum* in albino Wistar rats. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 2, 307–311. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60067-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60067-X).
- Sujith, K., Ronald Darwin, C., Suba, V., 2011. Antioxidant activity of ethanolic root extract of *Anacyclus pyrethrum*. *Int. Res. J. Pharm.* 2, 222–226.
- Sun, J., Synysya, A., Bok, H., et al., 2013. Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.). *Int. Immunopharm.* 17, 858–866. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.09.019>.
- Tabarsa, M., 2012. Molecular characteristics and immunomodulatory activities of water-soluble sulfated polysaccharides from *ulva pertusa*. *J. Med. Food* 15, 135–144. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.1716>.
- Thakur, M., Weng, A., Fuchs, H., Sharma, V., Shekhar, C., Chauhan, N.S., Dixit, V.K., Bhargava, S., 2012. Rasayana properties of Ayurvedic herbs : are polysaccharides a major contributor. *Carbohydr. Polym.* 87, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.035>.
- Tr, T., 2004. Specialization in tolerance : innate cd4/cd 25- versus acquired Tr1 and Th3 regulatory T cells, pp. 12–15. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000106471.23410.32>, 1 77.
- Urban, B., Gustin, P., Prouvost, J.F., Ansary, M., 1994. Quantitative assessment of arial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1335–1340.
- Usmani, A., Khushf, M., Siddiqui, H.H., 2016. Hepatoprotective effect of *Anacyclus pyrethrum* Linn . against antitubercular drug-induced hepatotoxicity in SD rats. *J. Compl. Integr. Med.* <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0001>.
- van Hoecke, L., Job, E.R., Saelens, X., Roose, K., 2017. Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. *JoVE* 1–8. <https://doi.org/10.3791/55398>.
- Wang, Xiaohu, Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, Xiaoli, Zhang, M., 2015. Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydr. Polym.* 125, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.040>.
- Willemsen, K., Leusink, S., 2016. The development of allergic inflammation in a murine house dust mite asthma model is suppressed by symbiotic mixtures of non - digestible oligosaccharides and *Bifidobacterium breve* M - 16V. *Eur. J. Nutr.* 55, 1141–1151. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0928-8>.
- Wu, C.A., Wu, J.J., Tsai, M.J., Chen, R.Y., 2007. Immunomodulatory effects of a traditional Chinese medicine, Chi-Shie-Shuang-Bu-An-Shen-Tang, on BALB/c mice. *J. Ethnopharmacol.* 113, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.021>.
- Wu, W., Zhu, Y., Zhang, L., Yang, R., Zhou, Y., 2012. Extraction , preliminary structural characterization , and antioxidant activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Carbohydr. Polym.* 87, 1348–1353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.024>.
- Xie, J.H., Tang, W., Jin, M.L., Li, J.E., Xie, M.Y., 2016. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill., *Plantago* spp., and *Morus* spp.: structures and functionalities. *Food Hydrocoll.* <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.030>.
- Yahia-sendid, S.A., 2015. Chimiokines et interaction entre immunité innée et adaptative dans l'asthme allergique : implication des cellules dendritiques et du récepteur NOD1. *Immunologie*. Université du Droit et de la Santé de Lille 2. 179p. <http://www.ginasthma.com>.
- Yan, C.U.I.H., Chang-lu, W., Yu-rong, W., Zhen-jing, L.I., Mian-hua, C., Feng-juan, L.I., Yan-ping, S.U.N., 2015. *Pleurotus nebrodensis* polysaccharide (P N-S) enhances the immunity of immunosuppressed mice. *Chin. J. Nat. Med.* 13, 760–766. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30076-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30076-5).
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., Moucheng, W., 2005. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharm.* 5, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.11.011>.



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued

Faculté des Sciences Exactes



Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM-2018)

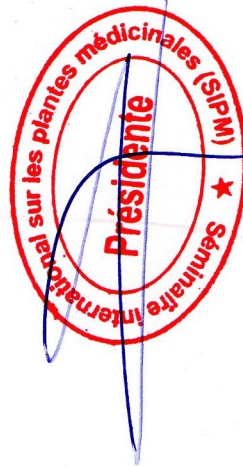
ATTESTATION DE PARTICIPATION

Keltoum ALLIOUCHE KERBOUA

a présenté UNE COMMUNICATION PAR AFFICHE

au Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM-2018), organisé du 17 au 18 janvier 2018 à l'Université d'El-Oued, intitulée : « Effet de l'extrait polysaccharidique d'*Anacyclus Pyrethrum* sur la réaction inflammatoire respiratoire »

Co-auteur (s) : L. Benosmane, S. Namoune, K. Ouled-Diaf, K. Lalaoui, D. Bendjeddou



Présidente du Séminaire

Dr. Naïma BENCHIKHA



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

LE DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ORGANISE



Le Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »

Attestation de participation

Le président du **Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »**

organisé le **16 - 17 Octobre 2018**, atteste que Mlle/Mm/Mr. : **ALLIOUCHE KERBOUA Keltoum a**

présenté une communication Affichée intitulée : **L'effet d'une fraction polysaccharidique d'origine végétale sur**

l'histologie des organes lymphoïdes.

Co-auteurs: SANOGO D., DIARRA H., BENDJEDDOU D.

PRÉSIDENT DU SÉMINAIRE



El Yamine MEZROUA
Président du SIA 2018

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 20 AOÛT 1955 SKIKDA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

SNBES
2018



Séminaire National Biologie Environnement et Santé

SNBES 2018

08-09 Octobre 2018

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Je soussignée Dr. Slimani S., présidente du Séminaire National Biologie Environnement et Santé SNBES 2018, atteste que : **ALLIOUCHE KERBOUA KELTOUM** a présenté : une communication affichée

Intitulée : «ETUDE THERAPEUTIQUE DES FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES VEGETALES SUR L'ALLERGIE RESPIRATOIRE (ETUDE HISTOLOGIQUE) ».

Co-Auteurs: SANOGO D, DIARRA H, BENDJEDDOU D.

La présidente du Séminaire:

Dr. Souheila Slimani
UNIVERSITÉ 20 AOÛT 1955 SKIKDA

FACULTÉ DES SCIENCES
Département de la biologie, de la nature et de la vie
Séminaire national de biologie, environnement et santé
SNBES 2018



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 20 Aout 1955 Skikda
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale
Skikda le 30_31 octobre 2019

Le Président du Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale, atteste que:

Mme.: **ALLIOUCHE KERBOUA KELTOUM**

A présentée une communication *Affichée* intitulée

L'EFFET D'UN EXTRAIT POLYSACCHARIDIQUE VEGETAL SUR LE TAUX DE CELLULES IMMUNITAIRES SANGUINES.

Co-auteurs : BENOSMANE L., NAMOUNE S., OULED-DIAF K. et BENDJEDDOU D.

Université 20 Aout 1955 Skikda
Président du SNBBMEE
Département des Sciences de la nature et de la vie
Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale
Et Ecotoxicologie Environnementale
SNBBMEE 2019
Dr: LAIB Messaoud

Résumé

Résumé

L'*Anacyclus pyrethrum* est une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle locale dans le traitement de diverses maladies. Elle est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et immunostimulantes dus à la présence de certains composants bioactifs citons entre autres les polysaccharides. Cette étude vise à évaluer les activités anti-oxydante et anti-inflammatoire des polysaccharides totaux (PST) extraits des racines d'A.p avec de l'eau bouillante, ainsi de ceux des deux fractions polysaccharidiques (F1 et F2). L'effet anti-oxydant a été évalué via le test FRAP, alors que le potentiel anti-inflammatoire a été testé par un traitement des souris avec différentes doses de PST (25, 50 et 100 mg/kg, I.p.), ainsi qu'avec les deux fractions polysaccharidiques (50 mg/kg), en comparaison avec l'effet d'un corticoïde (Physiolone). L'inflammation respiratoire a été induite par les acariens de la poussière de maison (HDM : House Dust Mite). Le nombre de cellules immunitaires dans le sang, dans le liquide nasal et dans le liquide bronchoalvéolaire a été énuméré, la rate a été prélevée pour calculer son poids relatif et compter les splénocytes, l'examen histopathologique des poumons et des surrénales ont été réalisés pour confirmer l'effet protecteur du traitement. La caractérisation structurale de l'extrait et des fractions polysaccharidiques a été identifiée à l'aide de FTIR, MEB, CPG. Les résultats obtenus ont démontré que l'extrait polysaccharidique testé possédait une activité anti-oxydante réductrice. *In vivo*, le traitement avec les PST a provoqué une diminution du nombre de leucocytes sanguins à toutes les doses d'une part, et du poids relatif de la rate et du nombre des splénocytes d'autre part, sauf avec la dose 50 mg/kg, une augmentation du nombre de splénocytes et les cellules immunitaires dans LN et LBA était importante. L'examen histopathologique a montré une claire protection du tissu pulmonaire endommagé par l'HDM après traitement et principalement avec la dose 50 mg/kg. La Fraction F1 a montré des résultats thérapeutiques très satisfaisants qui ont révélé une nette activité anti-inflammatoire limitant de façon considérable le degré et l'extension des dommages causés par l'allergène (HDM), avec une amélioration des signes inflammatoires chez les animaux traités. L'analyse de caractérisation chimique de cette pure fraction nommée PS.Ap, démontre que c'est un homoglycane.

Mots clés: Polysaccharides - *Anacyclus pyrethrum* - Réaction inflammatoire respiratoire – Phytothérapie - Analyse structurale et fonctionnelle des polysaccharides.

Abstract

Anacyclus pyrethrum is one of the plants most used in local traditional medicine for the treatment of various diseases. It is known for its anti-inflammatory and immunostimulating properties due to the presence of certain bioactive components, including polysaccharides. This study aims to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of the total polysaccharides (TPS) extracted with boiling water from the roots of *A.p*, as well as those of the two polysaccharide fractions (F1 and F2). The antioxidant effect was evaluated via the FRAP test, while the anti-inflammatory potential was tested by treating mice with different doses of TPS (25, 50 and 100 mg /kg, *I.P*), as well as with both polysaccharide fractions (50 mg/kg), in comparison with the effect of one corticosteroid (Physiolone). Respiratory inflammation has been induced by house dust mites (HDM). The number of immune cells in the blood, nasal fluid and bronchoalveolar fluid was enumerated, the spleen was removed to calculate its relative weight and to count splenocytes, histopathological examination of the lungs and adrenal glands was performed to confirm the protective effect of treatment. The structural characterization of the extract and the polysaccharide fractions was identified using FTIR, SEM and GC. The results obtained demonstrated that the polysaccharide extract tested possessed a reducing antioxidant activity. In vivo, treatment with TPS caused a decrease in the number of blood leukocytes at all doses on the one hand, and in the relative weight of the spleen and the number of splenocytes on the other hand, except at the dose of 50 mg/kg, in which an increase in the number of splenocytes and immune cells in LN and LBA was significant. The histopathological examination showed a clear protection of the lung tissue damaged by HDM after treatment and mainly with the dose of 50 mg/kg. Fraction 1 has shown very satisfactory therapeutic results which have revealed a marked anti-inflammatory activity which considerably limits the degree and the extension of the damage caused by the allergen (HDM), with an improvement of the inflammatory signs in the treated animals. The chemical characterization analysis of this pure fraction called PS.*Ap* shows that it is a homoglucon.

Keywords: Polysaccharides - *Anacyclus pyrethrum* - Inflammatory respiratory reaction - Phytotherapy - Structural and functional analysis of polysaccharides.

المخلص

يعتبر القنطس (*Anacyclus pyrethrum*) أحد النباتات الشائعة الاستخدام في الطب التقليدي المحلي لعلاج الأمراض المختلفة. يشتهر هذا النبات بخصائصه المضادة للالتهابات والمنشطة للمناعة بسبب وجود بعض المكونات النشطة بيولوجيًا ، بما في ذلك السكريات المتعددة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات للسكريات الكلية المستخلصة من جذور نبات القنطس بالماء المغلي، وكذلك تلك الخاصة بقطفات عديد السكريات "F1 و F2". تم تقييم تأثيرها المضادات للأكسدة من خلال اختبار FRAP ، بينما تم اختبار القدرة المضادة للالتهابات عن طريق معالجة الفئران بجرعات مختلفة من السكريات المتعددة الكلية PST (25، 50 و 100 مغ / كغ) ، وكذلك من قطفات عديد السكريات (50 مغ / كغ) ، بالمقارنة مع تأثير كورتيكوستيرويد (Physiolone). تم إحداث التهاب الجهاز التنفسي بعث غبار المنزل (HDM). وقد تم إحصاء عدد الخلايا المناعية في الدم والسوائل الأنفية و القصبية ، كما تمت استئصال الطحال لحساب وزنه النسبي وعدد خلاياه، كما تم دراسة نسيجية للرئتين والغدة الكظرية لتأكيد التأثير الوقائي للعلاج. وأخيرا تم تحديد الخصائص البنوية للمستخلص والقطفات السكرية باستخدام تقنيات FTIR و MEB و CPG. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلصات السكرية المختبرة تمتلك نشاطًا مضادًا للأكسدة. وقد تسبب العلاج بها في انخفاض عدد كريات الدم البيضاء مع جميع الجرعات من ناحية ، وفي الوزن النسبي للطحال وعدد خلاياه من ناحية أخرى ، باستثناء جرعة 50مغ / كغ التي أدت إلى زيادة عدد الخلايا الطحالية وكذلك الخلايا المناعية في السوائل الأنفية و القصبية. كما أظهر الفحص النسيجي حماية واضحة لأنسجة الرئة المتضررة من تأثير HDM بعد العلاج وجرعة 50 مغ / كغ بشكل رئيسي. أظهرت القطفة F1 نتائج علاجية مرضية للغاية والتي كشفت عن نشاط مضاد للالتهابات بشكل ملحوظ مما يحد بشكل كبير من درجة وتوسع الضرر الناجم عن مسببات الحساسية (HDM)، مع تحسين المظاهر الالتهابية عند الحيوانات المعالجة. من ناحية أخرى بين تحليل الخصائص الكيميائية للجزيئة النقية المسماة PS.Ap ، أنها متعدد سكريات متجانس و متكون اساسا من الجلوكوز.

الكلمات المفتاحية : متعدد السكريات - القنطس - التهاب الجهاز التنفسي - العلاج بالنباتات - التحليل البنوي

والوظيفي للسكريات.