

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة – د. الطاهر مولاي –

Université de Saïda– Dr Tahar Moulay –

Faculté de Science



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de MASTER

Spécialité : Biotechnologie végétale

Par : Sadli Houssam Eddine Mustapha

Bouabaya Adel

METHODES ET TECHNIQUES D'ISOLMENT ET DE CARACTERISATION DES POLYSACCHARIDES CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURES

Soutenu, le 14 / 07 / 2021, devant le jury composé de :

<u>Qualité</u>	<u>Nom et Prénom</u>	<u>Grade</u>	<u>Etb d'origine</u>
Président	Mme / Benabdessellem Yasmina	Maître de conférences classe B	Univ-Saïda
Encadreur	M / Hachem Kadda	Professeur	Univ-Saïda
Examineur	Melle / Chikhi Amira	Maître de conférences classe B	Univ-Saïda

2020 /2021

Remerciements

Nous adressons nos plus sincères sentiments de reconnaissance et de remerciement envers le Dieu, le Clément et le Miséricordieux, celui qui nous a donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos gratitude et nos respects à notre encadreur,

Le professeur Hachem Kadda pour le temps qu'il nous a accordé, sont aidant scientifique, ainsi que ces précieux conseils. Et les efforts consacrés à la réussite de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi aux membres du Jury : Mme Benabdesslem Yasmîna, qui nous a fait l'honneur de présider la soutenance de ce mémoire et Melle CHIKHI AMIRA, pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit. Leurs remarques et leurs précieux conseils me permettront d'améliorer notre travail au mieux.

Nous remercions tous les enseignants, qui nous ont suivi durant ce parcours de nos études, et notamment les enseignants du département de Biologie (Filière Biotechnologie).

Finalement, Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont soutenus, de près ou de loin, ont contribué à la

*réalisation de ce travail, sans oublier nos familles pour le soutien tout
au long de la période nos études.*

Sadli Houssam Eddine Mustapha

& Bouabaya Adel

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mon père Driss et ma mère Kheira pour leur amour inestimable, leurs sacrifices, leur confiance, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. «Merci, cette mémoire est la vôtre».

A ma grand-mère Yahyaoui Aarbía, Pour son amour, pour toute l'affection qu'elle m'a donnée et pour son précieux encouragement.

A mes chères sœurs, Fouziya Aya, Nihed Aicha, Pour leur appréciation et leur respect pour moi.

A mes amis de cœur, Houcini Habib, Kerrfouf Habib, Negadi Oussama Nabil, Pour leurs soutien et leurs présence comme des frères.

A mes oncles et mes tantes de la famille Sadli, spécialement Sadli Abdullah, pour leurs mots d'encouragement et leur gentillesse.

A toute la promotion de biotechnologie végétale.

A tous nos frères palestiniens, A Gaza et Alquds, Qui nous avoir donné des leçons de patience et de résistance.

Houssam

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mon père Kouïder et ma mère Mokhtaria pour leur amour inestimable, leurs sacrifices, leur confiance, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. «Merci, cette mémoire est la vôtre».

A mes grand-mères Belakehal Fatima et Halimi Arbía, Pour son amour, pour toute l'affection qu'elles m'ont donnée et pour son précieux encouragement.

A mes chers sœurs, Samira, Bouchera, et Fatima Pour leur appréciation et leur respect pour moi.

A mon frère Abdenour et mes amis, Bouzidi Abdelkader, Abd El Rahman Mohamed Amine, Belabed Abd El Monaim, Hattraf Abd El Basset, Pour leur soutien et leur présence comme des frères.

A mes oncles et mes tantes de la famille Ould Kada, spécialement Ould Kada Mohamed, pour leurs mots d'encouragement et leur gentillesse.

A toute la promotion de biotechnologie végétale.

A tous nos frères palestiniens, A Gaza et Alquds, Qui nous avoir donné des leçons de patience et de résistance.

Adel

Sommaire

Sommaire.....	V
La liste des figures.....	X
La liste d'abréviation.....	XII
Introduction générale.....	01
Chapitre I : Les polysaccharides des végétaux supérieur.....	03
I. Généralité sur les polysaccharides des végétaux supérieurs.....	04
II. Les polysaccharides structuraux chez les végétaux supérieurs.....	05
II. 1. Cellulose.....	05
II.2. Hémicellulose.....	07
II. 2. 1. Les xyloglucanes.....	07
II. 2. 2. Les xylanes.....	08
II. 2. 3. Glucanes.....	09
II. 3. Les pectines.....	10
II. 3. 1. Homogalactoronanes.....	11
II. 3. 2. Rhamnogalactoronanes.....	12
II. 3. 3. Rhamnogalactorananes.....	12
III. La paroi site de synthèse des polysaccharides de structure	12
III. 1. Généralité.....	12
III. 2. L'architecture de la paroi.....	13
III. 2. 1. Lamelle moyenne.....	13
III. 2. 2. Paroi primaire.....	13
III. 2. 3. Paroi secondaire.....	14
III. 2. 3. 1. Lignine.....	15
IV. Les polysaccharides de réserve chez les végétaux supérieure.....	17
IV.1. Amidon.....	17

IV.1.1. Localisation.....	18
IV.1.1.1. Plastes.....	18
IV.1.1.2. Amyloplaste.....	19
IV.1.2. La structure chimique.....	19
IV.1.2.1. Amylose.....	19
IV.1.2.2. Amylopectine.....	20
IV.2. Gomma.....	21
IV.3. Mucillage.....	21
Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides.	22
I. Introduction.....	23
II. Les méthodes et les technique d'extraction et purification des polysaccharides.....	23
II. 1. Les méthodes d'extraction.....	23
II. 1. 1. les méthode physique.....	23
II. 1. 1. 1. Ultrasonic Extraction.....	23
II. 1. 1. 2. Extraction par micro-ondes.....	24
II. 1. 1. 3. L'extraction en eau subcritique.....	25
II. 1. 2. Les méthodes chimiques.....	25
II. 1. 2. 1. L'extraction des polysaccharides hydro soluble.....	25
II.1.2.2. Méthode d'extraction de polysaccharide non- hydrosoluble.....	28
II. 1. 2. 3. Méthode d'extraction des pectines.....	29
II. 1. 2. 4. Méthode d'extraction des hémicelluloses.....	33
II. 1. 3. Les méthodes sélectives.....	35
II. 1. 3. 1. La méthode de Sun et al. (1995) , (La cellulose)	35
II. 1. 3. 2. Les méthodes de Cutillas-Iturralde et al. (1998), (Xylanes et xyloglucanes)	37
II. 1. 3. 3. La méthode d'Izydorczyk et al. (1998), (β -glucanes et xylanes)	39
II. 1. 3. 4. La méthode de Goff et al. (2001) (Pectines)	40

II. 2. Purification et séparation des Polysaccharides.	41
II. 2. 1. Élimination des protéines.....	42
II. 2. 2. Délignification.....	42
II. 2. 3. Élimination des pigments.....	43
II. 2. 4. Les méthodes chromatographique:	43
II. 2. 4. 1. Chromatographie par perméation de gel (GPC).	44
II. 2. 4. 2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)	45
III. Les méthodes d'études.....	46
III. 1. Composition monosaccharidique.....	46
III. 1. 1. Dosage colorimétrique.....	47
III. 1. 1. 1. La méthode de Dubois.....	47
III. 1. 1. a. Dosage des oses neutres.....	47
III.1.1.1.b. Dosage des oses totaux.....	48
III. 1. 1. 2. Dosage des oses neutres Monsigny.....	48
III. 1. 1. 3. Dosage des acides uroniques la méthode de Blumenkrantz.....	48
III. 2. Méthodes de fractionnement.	49
III.2.1. Chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD).	49
III. 2. 2. La chromatographie en phase gazeuse CPG.....	50
III. 2. 3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	52
III. 3. Analyse structurale.....	54
III. 3. 1. Analyse par méthylation.....	54
III. 3. 1. 1. La méthode de Hakomori (1964).	54
III. 3. 1. 2. La méthode Ciucanu (1984).	55
III. 3. 2. Hydrolyse enzymatique.	56
III. 3. 3. Hydrolyse acide.....	56
III. 3. 3. L'autohydrolyse.	57

III. 3. 4. Les méthodes spectroscopiques.	57
III. 3. 4. 1. La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).	57
III.3.4. 2. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN.....	58
III. 3. 4. 2. a. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN ¹³ C.	59
III. 3. 4. 2 .b. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- ¹ H)	59
III. 3. 4. 2. c. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN 2D.....	60
 Chapitre III : Les activités biologiques et les applications des polysaccharides	61
I.Introduction	62
II. Les activités Biologique	62
II.1. Polysaccharides à activité immuno-modulatrice.....	62
II.1.1. Cas des polysaccharides d' <i>Angelica sinensis</i>	63
II.1.2. Cas des polysaccharides de <i>Dendrobium officinale</i>	63
II.2. Polysaccharides à activité anti complément.....	64
II.2.1. Cas des polysaccharides de <i>Cola cordifolia</i>	64
II.3. Activité antivirale des polysaccharides.	65
II.3.1. Cas des polysaccharides d' <i>Azadirachta indica</i>	65
II.4. Activité antioxydant des polysaccharides.	65
II.4.1. Cas des polysaccharides de <i>Cereus triangularis</i>	66
II.5. Polysaccharides à activité antimicrobien.....	66
II.5.1. Cas des polysaccharides des <i>Astragales</i>	67
II.6. Polysaccharides à activité gastroprotective.....	67
II.6.1. Cas des polysaccharides de <i>Chenopodium quinoa</i>	68
III. Les applications des polysaccharides	68
III.1. Applications industrielles	69
III.1. 1. Films barrières.	69
III.1. 2. Gabarit pour les céramiques avec des nano-pores uniformes.....	69

III.1. 3. Application optique OLED.	70
III.2. Applications alimentaires et nutritionnelles.....	70
III.3. Applications pharmaceutiques.....	71
III.3. Applications médicales.....	71
Conclusion générale.....	72
Références bibliographiques.....	73

La liste des figures

Figure 1 : Représentation de la molécule de cellulose (Roig., 2011).	05
Figure 2 : (A) Structure de la cellulose et (B) organisation des liaisons hydrogènes intra- et inter-chaînes (Benaoun , 2017).	06
Figure 3 : représentation schématique de la structure des micro-fibrilles de cellulose et l'organisation des fibres dans la paroi végétale. (Delescaille ,2005).	06
Figure 4 : Structure des xyloglucanes (Hijazi, 2011) .	08
Figure 5 : Structure générale des xylanes (Rennie et Scheller, 2014).	09
Figure 6 : Exemple de β -(1,4)(1,3)-glucanes (Vannucci et al., 2013) .	09
Figure 7 : Organisation générale des structures pectiques (Leclere et al., 2013). <i>AG</i> : arabinogalactane, <i>HGA</i> : homogalacturonane, <i>RG</i> : rhamnogalacturonane, <i>XG</i> : xylogalacturonane (Benaoun, 2017).	11
Figure 8 : architecture de la paroi primaire. (Roig, 2011).	14
Figure 9 : les niveaux de la paroi végétale.	15
Figure 10 : Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine: 1 alcool <i>p</i> -coumarylique ; 2 alcool coniférylique ; 3 alcool sinapylique (Wertz, 2010).	16
Figure 11 : Structure possible de la lignine (Roig., 2011).	16
Figure 12 : Interconversion plastidiale. Tous les plastes observés dans les cellules des végétaux supérieurs dérivent d'un plaste embryonnaire (proplaste). Les plastes peuvent être chlorophylliens ou non. Dans tous les cas, la seule structure membranaire commune est l'enveloppe (membrane interne et membrane externe).	18
Figure 13 : structure chimique de l'amylose. (Bahrani, 2012).	20
Figure 14 : structure chimique de l'amylopectine. (Buléon et al, 1990).	20
Figure 15 : Schéma général du procédé d'extraction de polysaccharides hydrosoluble . (Peters , 2016).	27
Figure 16 : Schéma général du procédé d'extraction de polysaccharides non-hydrosoluble (Kouadri, 2018).	29

Figure 17 : Schéma d'extraction de pectines pariétales (Hachem, 2014).	30
Figure 18 : Schéma d'extraction de pectines. (Rezzoug et al , 2007).	32
Figure 19 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle des polysaccharides pariétaux d'après (Hachem, 2014).	34
Figure 20 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle de cellulose. (Sun et al. 1995).	36
Figure 21 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle Xylanes et xyloglucanes. (Cutillas- Iturralde et al.1998).	38
Figure 22 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle des pectines. (Goff et al.2001).	41
Figure 23 : Principe de la technique MALDI. (Moine, 2005)	58
Figure 24 : OLED, the organic light-emitting diode.	70

La liste d'abréviation

Ag: Angelica sinensis.

APS : Polysaccharides des Astragales.

ASP : Angelica sinensis polysaccharides.

AG : arabinogalactanes.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

AG : Arabinogalactanes.

BSTFA: (N, O-bis(triméthylsilyl)- trifluoroacétamide.

CC1p1: Cola cordifolia polysaccharides.

C-BSA : Albumine de sérum bovin cationique.

°C : Degré Celsius.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

DPPH: Diphényl-1-picrylhydrazyl.

Da: Dalton.

DMSO : DiMéthylSulfOxyde.

DP : Degré de Polymérisation.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

FM : Faiblement Méthylestérifié.

Fuc : Fucose.

Fp : fraction de polysaccharide.

GAL : Galactane

Glc : Glucose.

GalA : d'acides galacturoniques.

G : guaïacyl.

HM : Hautement Méthylestérifié.

HGA : homogalacturonane.

H : p-hydroxyphényl.

IL: Interleukine.

KOH: Hydroxyde de potassium.

LPS: Lipopolysaccharides.

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation.

Min: Minute.

MLG: mixed-linkage β -glucans.

NK: Natural killers.

NO: l'oxyde nitrique.

PV-1 : Phase de réplication virale 1.

OLED: the organic light-emitting diode.

Ppm : Partie par million.

Rha : Rhamnose.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

RG-I : Rhamnogalacturonanes type 1.

RG-I: Rhamnogalacturonanes type 1.

RG-II: Rhamnogalacturonanes type 2.

S: siryngyl.

Th1: T helper 1.

Th2: T helper 2.

TNF- α : Tumor necrosis factor Alfa.

TCD8+: cellule T cytotoxique avec une protéine de surface CD8.

TCD4+: cellule T helper avec une protéine de surface CD4.

TFA : Acide TriFluoroacétique.

TMCS : triméthylchlorosilane.

Xyl : Xylose.

XG : Xyloglucanes.

Xyl : Xylose.

μ L : Microlitre.

μ m : Micromètre.

Introduction

Générale

Introduction générale :

Toute discipline scientifique a beaucoup de connaissances ramifiées et enchevêtrées. C'est pourquoi nous devons placer ces connaissances dans un contexte unique et clair. Dans cette perspective, nous avons fait ce travail afin d'apporter une contribution à la recherche scientifique et particulièrement au niveau de notre département de biologie à l'Université de Saïda - Dr Moulay Tahar.

Dans ce cadre, ce document représente une recherche bibliographique générale concernant les méthodes et les techniques d'isolement et de caractérisation des polysaccharides des végétaux supérieurs. Ces derniers qui représentent des biomolécules d'intérêt les plus abondantes de la biosphère, avec une structure complexe et diverses activités fonctionnelles. Ils peuvent être produits par des champignons, levures, algues, bactéries, animaux et les plantes supérieures. Sont fortement utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, pour leurs propriétés technologiques, physiologiques et pharmaceutiques, sont des acteurs importants dans l'économie mondiale.

Ce document est structuré en trois chapitres, Le premier chapitre est consacré à une recherche bibliographique concernant les polysaccharides des végétaux supérieurs, la paroi végétale et les plastes. Il décrit la structure chimique et la localisation des polysaccharides de structure (cellulose , Hémicellulose , Pectine) et les polysaccharides de réserve (Amidon , Gomme , Mucilage). Il expose aussi d'une manière détaillée et profonde, l'architecture de la paroi végétale, et clarifier la répartition de ces polysaccharides à l'intérieur de cette matrice extracellulaire comme certains scientifiques appellent (**Roig, 2011**), représentent le site de localisation des polysaccharides. Et se composent premièrement d'une interface entre deux cellules adjacentes , Riche en éléments pectiques et dépourvues de cellulose que l'on appelle la lamelle moyenne (**Hachem , 2014**). Deuxièmement elles se composent d'un réseau hydraté qui se forme après la formation de la lamelle moyenne , contient 15-30% de cellulose, de 25-50% d'hémicelluloses , 10-35% de pectines et 10% de protéines , et que l'on appelle la paroi primaire (**Nguyen-Kim , 2015**) . Et en fin , cette matrice extracellulaire formée trois couches distinctes appelées S1, S2 et S3 , composée de plusieurs plans de microfibrilles de cellulose et surtout caractérisée par l'apparition des dépôts hydrophobes de lignine , et qui peut représenter jusqu'à 35% de la masse sèche , donc ces trois niveaux forment la paroi secondaire .

Introduction Générale

Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des techniques et les méthodes d'extraction, de purification, et de caractérisation des polysaccharides. Au début, Il porte sur les différents méthodes et protocoles d'extraction, que se soit des méthodes physique, qui joue sur les propriétés physique de la molécule et les influencer par utilisation des phénomène physique, telle que les ondes, l'eau chaude...ect. Ou mis le polysaccharides en extraction, par des procédés chimiques réalisés à l'aide des solutions aqueuse à l'ébullition, Par l'utilisation des solvant chimique telle que, KOH, NaOH Pour l'extraction des hémicelluloses, et les agent chélateur pour l'extraction des pectines...ect, Ces procédés chimiques sont désormais concurrencés par les procédés enzymatiques, plus spécifiques et qui permettent une hydrolyse dans des conditions moins sévères, comme La méthode **d'Izidorczyk et al, (1998)**. La seconde partie de ce chapitre englobe l'ensemble des méthodes d'études, qui se divise en : technique chromatographique, spectrale et méthode de dosage qui nous permette de déterminée la composition en monosaccharide, le fractionnement et l'analyse structurale.

Le troisième chapitre emploie les résultats de l'évaluation *in vitro* des polysaccharides obtenus dans les différentes études. Et enfin, ce travail se termine par une conclusion générale.

Chapitre I :

Les polysaccharides des végétaux supérieurs

I. Généralité sur les polysaccharides des végétaux supérieurs

Les polysaccharides, appelés également glycanes, sont constitués de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques pour avoir la configuration α ou β , et sans taille moléculaire défini. Ils sont divisés selon leurs fonctions en deux groupes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides selon qu'ils présentent un ou plusieurs types de monosaccharides. Les homopolysaccharides peuvent être classés en fonction de la nature de leur unité monosaccharide. Bien que les séquences monosaccharidiques des hétéropolysaccharides puissent, en principe, être aussi variées que celles des protéines, elles ne sont généralement formées que de quelques types de monosaccharides qui alternent selon une séquence répétitive. Les polysaccharides peuvent avoir une structure branchée aussi bien que linéaire. Cela vient de ce que les liaisons glycosidiques peuvent s'établir avec n'importe lequel des groupements hydroxyle d'un monosaccharide, la plupart des polysaccharides sont linéaires et ceux qui sont branchés ne font intervenir que quelques types de branchement bien précis. (Voet, 2005)

Les polysaccharides sont présents dans la plupart des organismes vivants *Le xanthane* *Le gellane* *Le hyaluronane*, ils se trouvent dans les algues les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, les animaux et principalement dans les végétaux (amidon celluloses, hémicelluloses, pectines, des exsudats, gommages ou mucilages). (Abekhti & Ben ahmed, 2019)

L'étude des polysaccharides végétaux passe en premier lieu par la prise de conscience de la très grande variabilité structurale en partie liée à leurs nombreuses fonctions biologiques. Le plus souvent séparés en deux catégories, on distingue (i) les polysaccharides de réserve (ii) des polysaccharides de structure. (Benaoun, 2017)

II. Les polysaccharides structuraux chez les végétaux supérieurs.

II. 1. Cellulose :

Le cellulose c'est le polysaccharide le plus abondant et le plus largement répandu dans la nature, il représente 15 à 30% de la matière sèche de la paroi primaire et constitue de 20 à 50 % de la matière sèche de la plupart des tissus végétaux , la cellulose est une molécule stable, insoluble et homopolymère , linéaire , peut contenir jusqu'à 3.000 molécules de glucose liée entre eux avec des liaisons β -(1-4)-D-glucosidique . (Hijazi, 2011 ; Fonty et Forano,1999)

L'existence des liaisons hydrogène intramoléculaires, conduit à la stabilisation de la cellulose dans son orientation linéaire, ce qui lui confère une certaine rigidité. De plus L'existence des liaisons hydrogène inter-chaînes conduit à la formation des fibres (pseudo cristallin), ce qui favorise l'établissement d'un état solide, pseudo cristallin et permet la formation de microfibrilles (cristallin). La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance mécanique, ainsi que son caractère non soluble dans l'eau. L'assemblage des molécules de cellulose dans la paroi en longues rangées parallèles vas créée un réseau des microfibrille qui confère a ces dernier un caractère cristallin chaque microfibril a un diamètre d'environ 50 a 60 molécule de cellulose. (Nguyen-Kim , 2015 ; Hijazi , 2011)

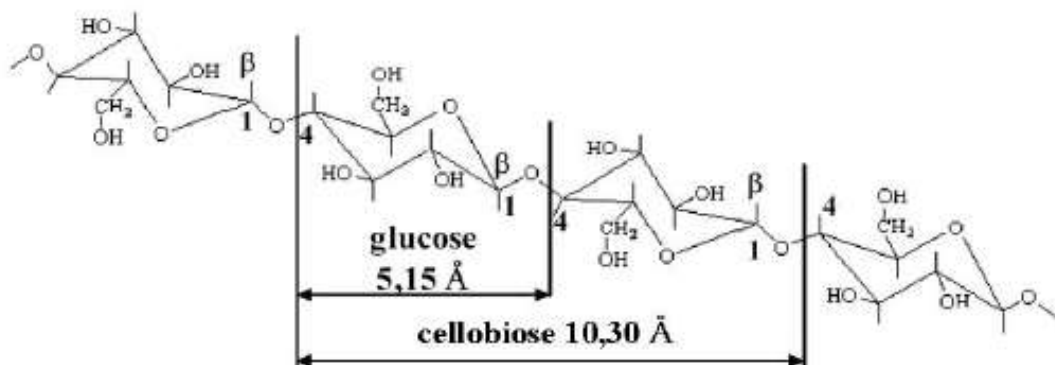


Figure 1: Représentation de la molécule de cellulose (Roig, 2011).

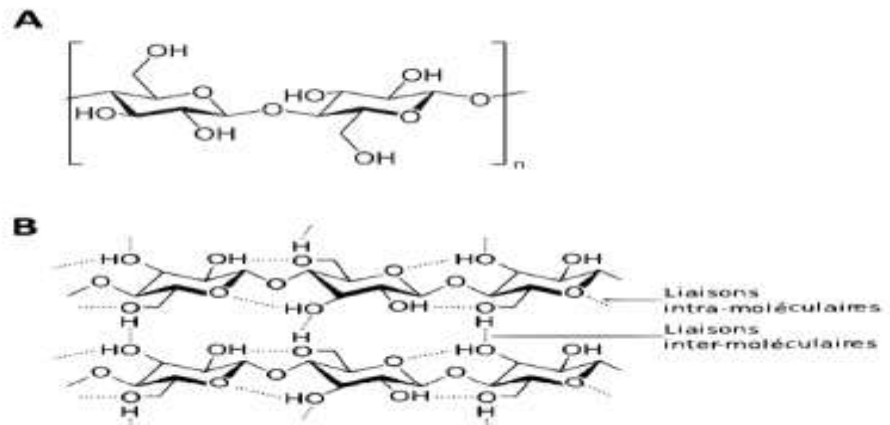


Figure 2: (A) Structure de la cellulose et (B) organisation des liaisons hydrogènes intra- et interchaînes (Benaoun , 2017).

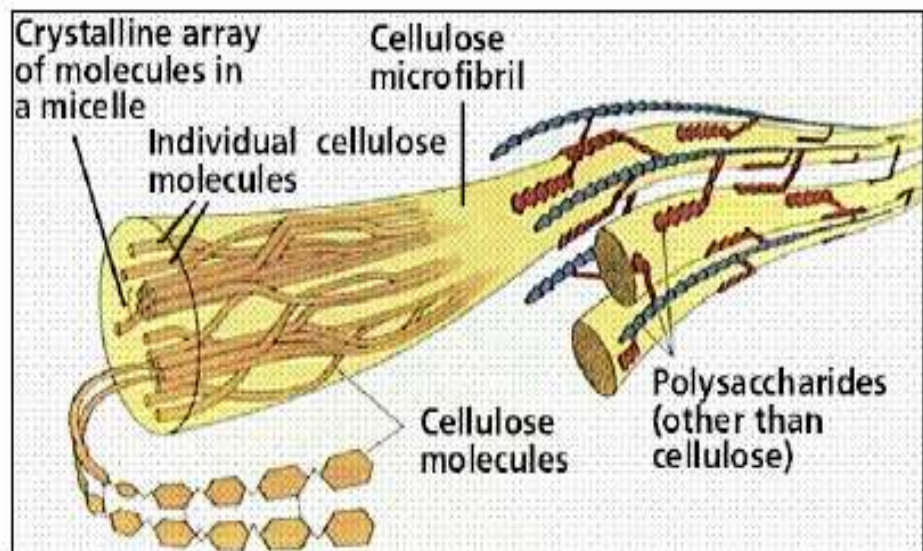


Figure 3: représentation schématique de la structure des microfibrilles de cellulose et l'organisation des fibres dans la paroi végétale. (Delescaille ,2005).

La cellulose est synthétisée et organisée en microfibrilles par des complexes enzymatiques appelés rosettes. Composés de six sous-unités, contenant chacune six cellulose synthases (CESA) (Nguyen-Kim , 2015), Les complexes de cellulose-synthase sont localisés dans la membrane plasmique où ils synthétisent les molécules de cellulose à partir de résidus UDP-Glc. Plusieurs gènes Cesa responsables de la synthèse de la cellulose ont été identifiés par l'étude de mutants déficients en cellulose (Hijazi, 2011). En fin, La cellulose est

Chapitre I : Les polysaccharides des végétaux supérieurs

synthétisée par des organismes aussi différents que les bactéries, les champignons et les plantes y compris les mousses. (Fonty et Forano ,1999)

II. 2. Hémicellulose :

Hémicellulose et l'un des polysaccharides de structure important dans les parois végétale, Il existe une grande variété d' hémicelluloses selon l'ose constitutif de ses chaines (pentoses, hexoses, des acides uroniques...). Ces chaines sont linéaires (de β -(1-4)-D-glycopyranose) avec présence de ramifications. Contrairement a la cellulose, hémicellulose il a une diversité structurale grâce a ces unités glucosidique qui peut s'arranger de multiple façon.

La molécule d'hémicellulose influe d'une manière indirecte sur la disposition des microfibrille cellulosique l'un sur l'autre, grâce a les liaisons non-covalent formée entre les polymères hémicellulosique et la cellulose. Autrement les hémicellulose peut aussi établir des liaisons covalent avec la pectine. Ce qui contribue au renforcement de la paroi cellulaire par ces interactions avec les microfibrilles de cellulose et la pectine et par fois avec la lignine par des liaison non-covalent, Les hémicelluloses comprennent les xylanes, les xyloglucanes, les mannanes, les glucomannanes et les β -(1,3) (1,4)-glucanes. Ces types d'hémicelluloses sont présents dans les parois cellulaires de toutes les plantes terrestres. (Nguyen-Kim , 2015 ; Hijazi , 2011)

II. 2. 1. Les xyloglucanes:

Dans la paroi primaire des dicotylédones, les plus abondants et les plus étudiés des polymères hémicellulosiques sont les xyloglucanes qui représentent 10 à 30% de la masse sèche des parois cellulaires, Les XG sont des hétéropolymères constitués d'un squelette de β -(1,4)-D-Glc Jusqu'à 75% de ces Glc, peuvent être substitués en α -(1,6) par des résidus D-xylose (Xyl) (Nguyen-Kim , 2015). Ils présentent une structure basée sur la répétition de motifs constitués de 7 à 10 monomères Ils constituent habituellement 20 à 25% de la masse des parois primaires des dicotylédones, mais seulement 1 à 5% des parois primaires des graminées, Former un réseau XG-cellulose par la formation des liaisons hydrogène avec les microfibrilles de cellulose. Ces liaisons jouer un rôle dans le contrôle de l'élargissement de la cellule. (Hijazi, 2011)

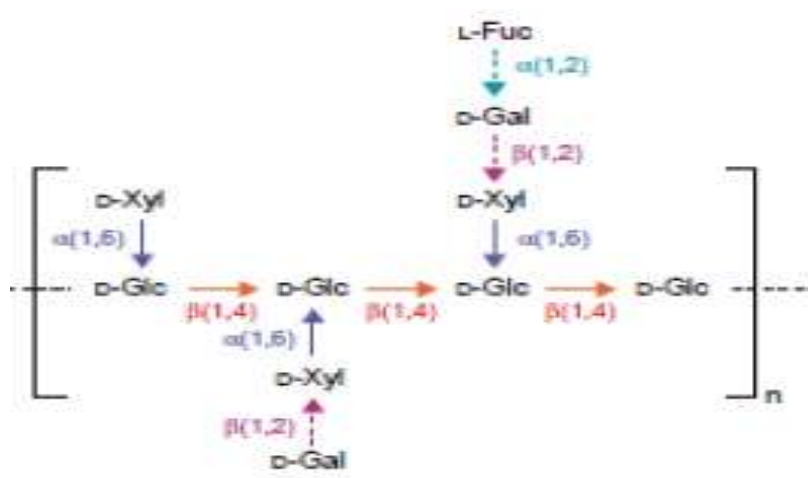


Figure 4 : Structure des xyloglucanes (Hijazi , 2011) .

Le XG de type XLFG chez *A. thaliana* est représenté dans cette figure. Les flèches pleines indiquent des liaisons toujours présentes et les flèches en pointillés indiquent des patrons de substitution.

II. 2. 2. Les xylanes:

Les xylanes sont des hétéropolymères constitués d'une chaîne principale de D-Xylp liés en β- (1,4), plus ou moins branché par des chaînes oligosaccharidiques ou des résidus terminaux, Chez les dicotylédones, ils sont prédominants dans les parois Secondaires et peu représentés environ 5% dans les parois primaires. Les xylanes peuvent être liés avec des microfibrilles de cellulose et avec d'autres polymères (lignine, pectines, protéines) par des liaisons hydrogènes et par des liaisons covalentes. (Benaoun, 2017)

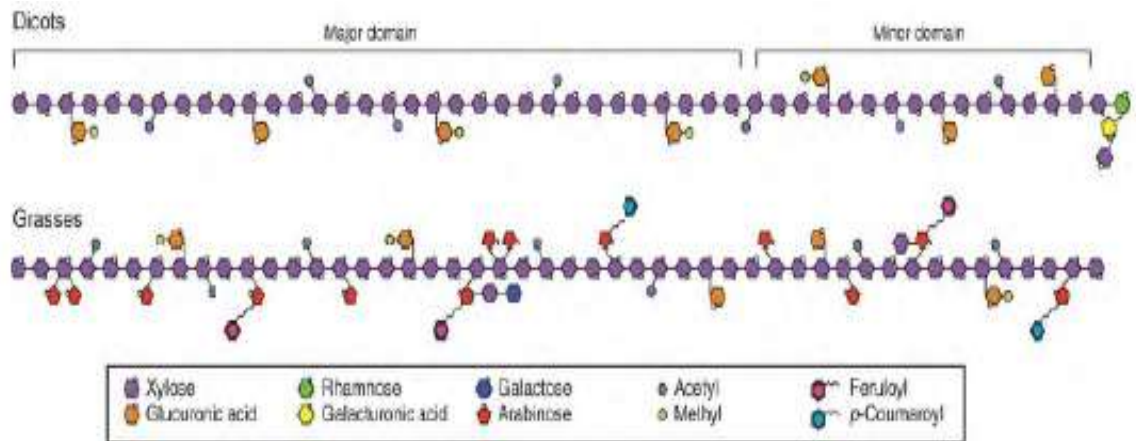


Figure 5: Structure générale des xylanes (Rennie et Scheller, 2014) .

II. 2. 3. β -(1,4)(1,3) -Glucanes:

Les β -(1,4)(1,3)-glucanes aussi appelés MLG (*mixed-linkage β -glucans*) ; sont des polymères non ramifiés de Glc qui contiennent en moyenne 30% de liaisons β -(1-3) et 70% de liaisons β -(1-4). Ces glucanes se trouvent principalement dans les parois primaires des graminées. Les chaînes sont constituées d'une répétition d'un motif de base de 3 à 4 Glc liés en β -(1,4) séparés par des liaisons β -(1,3) isolées altérant la rigidité de la chaîne. Ces glucanes se trouvent principalement dans les parois primaires des graminées. Chez les dicotylédones et les bryophytes, ils sont apparemment absents. (Nguyen-Kim, 2015)

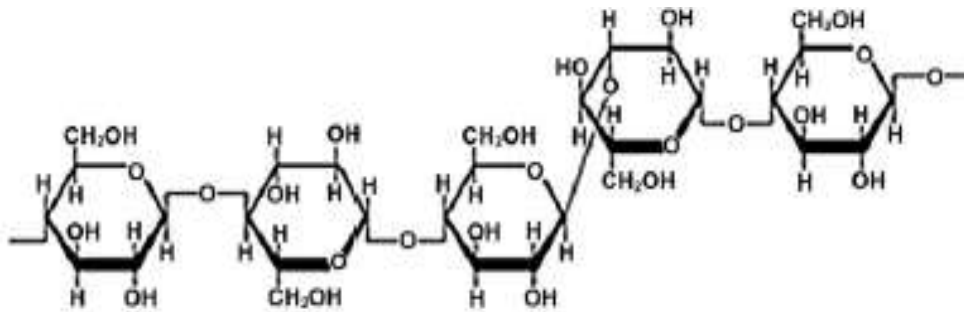


Figure 6: Exemple de β -(1,4)(1,3)-glucanes (Vannucci et al., 2013) .

II. 3. Les pectines :

Les pectines sont une classe de polysaccharides hétérogènes représentent environ 30% de la masse des parois primaires de dicotylédones. Elles sont également abondantes dans la lamelle moyenne des parois des cellules. et sont essentiellement composées d'acides galacturoniques, on retrouve également des pectines dans la matrice des parois primaires et absent au niveau de la paroi secondaire. Différents polysaccharides pectiques peuvent être détectés dans les parois primaires. On peut le séparer en plusieurs catégorie, à savoir les pectines acides, comme les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes (RG) de type I et II et les pectines neutres, comme les arabinanes, galactanes et arabinogalactanes (AG). **(Yamada, 1996 ; Pérez *et al.*, 2003)**

Parmi Les rôles important de la pectine dans la paroi:

- Constitue un réseau adapté à l'expansion cellulaire du fait de son caractère hydrophile qui rend la paroi plastique.
- Elle régule également la porosité, le pH et la charge globale de la paroi et favorise l'adhésion entre les cellules.
- Impliquées dans les mécanismes de défense et de signalisation. **(Nguyen-Kim, 2015)**

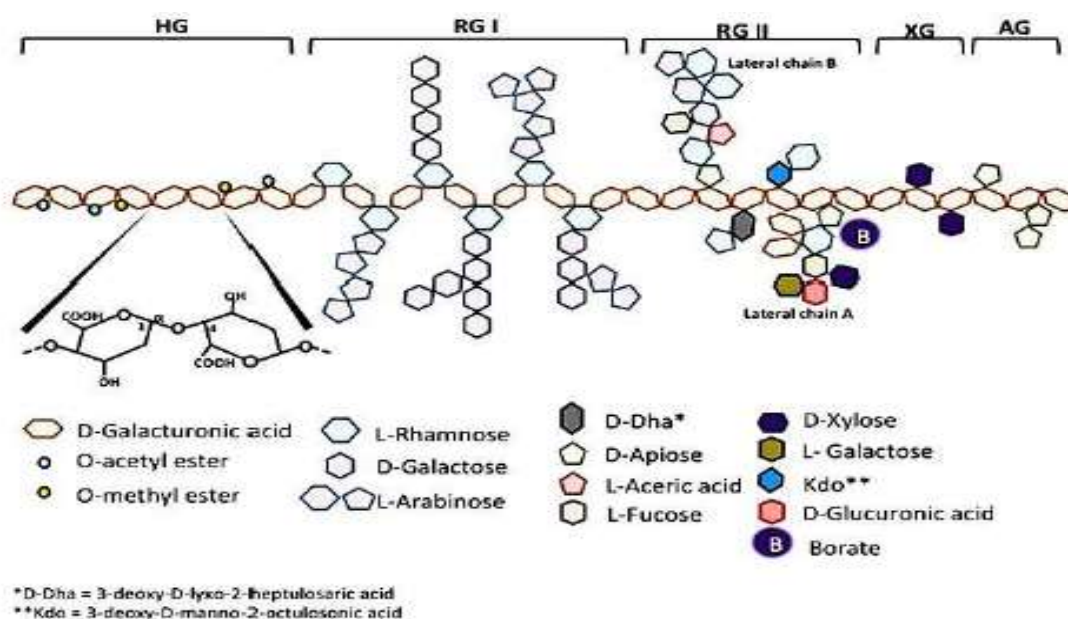


Figure 7: Organisation générale des structures pectiques (Leclere et al., 2013). AG : arabinogalactane, HGA : homogalacturonane, RG : rhamnogalacturonane, XG : xylogalacturonane (Benaoun , 2017).

II. 3. 1. Homogalactoronanes:

Le polysaccharide pectique le plus abondant est HG, un homopolymère linéaire d'acides galacturoniques (GalA) liés en α -(1,4). Il s'agit de chaînes linéaires de 100 à 200 résidus de GalA et représente environ 65% des pectines des parois primaires. Les HGA possèdent également des groupements méthyle en positions *O*-2, *O*-3 et *O*-6 des GalA, le taux de méthylesterification au sein des HGA est variable (la cellule est capable d'estérifier de manière réversible les groupements carboxylique grâce à une pectine méthylestérase et on dénombre trois catégories d'acides pectiques en fonction du degré de méthylation (DM), les acides pectiques (i) de DM < 5%, (ii) faiblement méthylés de DM < 50% et (iii) hautement méthylés de DM > 50 (Benaoun, 2017). Lorsque deux portions de chaînes sont majoritairement constituées de GalA non méthyl-estérifiés (désesterification réalisée par les pectines méthylestérases pariétales), elles peuvent interagir en présence de Ca^{2+} selon une structure ordonnée appelée « boîte à œufs » formant ainsi un bloc de jonction. En fin, les propriétés des HG et leurs fonctions biologiques sont souvent corrélées à leur capacité à établir des interactions électrostatiques. (Hijazi, 2011 ; Nguyen-Kim, 2015).

II. 3. 2. Rhamnogalactoronanes I (RG I).

Le RG I représente 20 à 35% des pectines des parois primaires Il est composée de la répétition d'une centaine de motifs disaccharidiques α -(1,4)-GalA- α (1,2)-Rha , leur DP proches de 1000 . Les résidus Rha sont très souvent substitués en position O-4 par des chaines latérales très variables portant des unités Gal et Ara. reportent également quelques branchements en position O-3 des Rha . En général, les chaines latérales d'AG sont de type II même si on trouve occasionnellement du type I (ces chaines latérale incluent les arabinogalactanes, les α -(1,5)-arabinanes et les β -(1,4)-galactanes et peuvent également contenir des résidus α -L-Fuc, β -D-GlcA et 4-O-Me β -D-GlcA). (Hijazi , 2011 ; Nguyen-Kim , 2015 ; Benaoun. , 2017)

II. 3. 3. Rhamnogalactorananes II (RG II).

Le RG II est la molécule la plus complexe des pectines. Elle représente jusqu'à 10% des pectines de la paroi primaire (Nguyen-Kim, 2015). le RG comprend environ neuf résidus de GalA liés en α 1,4 décorés avec des branches latérales composées d'au moins 12 types de sucres monosaccharidique (tels que le D-apirose (Api), le L-acerate (AceA), le 2-O-méthyl L-Fuc, le 2-O-méthyl D-Xyl, le L-Gal, l'acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha), et le 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate (Kdo)), ces monosaccharides sont rarement trouvés dans d'autres polysaccharides et sont reliés par plus de 20 types de liaisons différentes (Nguyen-Kim, 2015). Le RG II existe principalement sous forme de dimères qui sont liés de manière covalente par des diesters de borate et ils apportent une certaine flexibilité à la paroi végétale en permettant notamment des liaisons intermoléculaires avec la cellulose. (Hijazi, 2011 ; Benaoun, 2017)

III. La paroi site de synthèse des polysaccharides de structure.

III. 1. Définition :

Toutes les cellules végétales ou animales sont constituées d'un cytoplasme délimité par une membrane plasmique. Seules Les cellules végétales sont entourées par des parois cellulaires, ont appelle des cellules « revêtues ». La membrane est doublée par une enveloppe continue et solide. Certains autres préfèrent l'appeler « matrice extracellulaire » « Dans les cellules végétales, la matrice extracellulaire comprend surtout la paroi cellulaire, qui

Chapitre I : Les polysaccharides des végétaux supérieurs

confère rigidité et protection au protoplaste sous-jacent et qui est finalement responsable du maintien de la morphologie de la cellule » (Hopkins, 2003). Les parois contribuent à la détermination de la forme des cellules et assurent la communication entre les cellules, De plus, elles contribuent à l'adaptation des plantes à leur environnement et à leur protection contre les stress environnementaux. (Roig, 2011)

La paroi végétale est une structure variable selon la fonction, l'âge, l'espèce et se forme dès la division cellulaire au niveau de la plaque cellulaire, puis de la mise en place de la lamelle moyenne. Constitue principalement d'une paroi de type primaire qui entour la jeune cellule lors de la croissance puis une paroi de type secondaire produite dans une cellule dont la croissance est terminais. (Roig, 2011 ; Nguyen-Kim, 2015)

III. 2. L'architecture de la paroi.

III. 2. 1. Lamelle moyenne :

La lamelle moyenne, forme une interface entre deux cellules adjacentes. Elle conditionne la cohésion intercellulaire, contient principalement des substances pectiques et dépourvues de cellulose. Son épaisseur varie de 0,2 à 1 μm . (Hachem, 2014)

III. 2. 2. Paroi primaire :

La paroi primaire est un réseau hydraté qui se forme après la formation de la lamelle moyenne et renforcée pendant la croissance cellulaire. la paroi primaire est mince son épaisseur est faible relativement a l'épaisseur totale de la paroi n'atteint que quelques micromètres de 0,03 à 1 μm , elle est aussi a la fois extensible et résistante , elle est constituée de polymères de glucose appelés cellulose et d'hémicelluloses et des pectines donc les polysaccharides représente le constituant majeure de la paroi primaire (90% de la masse sèche) . cette dernière contiennent aussi environ 10% de glycoprotéines qui possèdent un contenu très élevé en un acide aminé : l'hydroxyproline. Les autres constituants en quantités très faibles sont des esters phénoliques, des minéraux, de l'eau et des enzymes. (Roig, 2011 ; Nguyen-Kim, 2015 ; Moine., 2005)

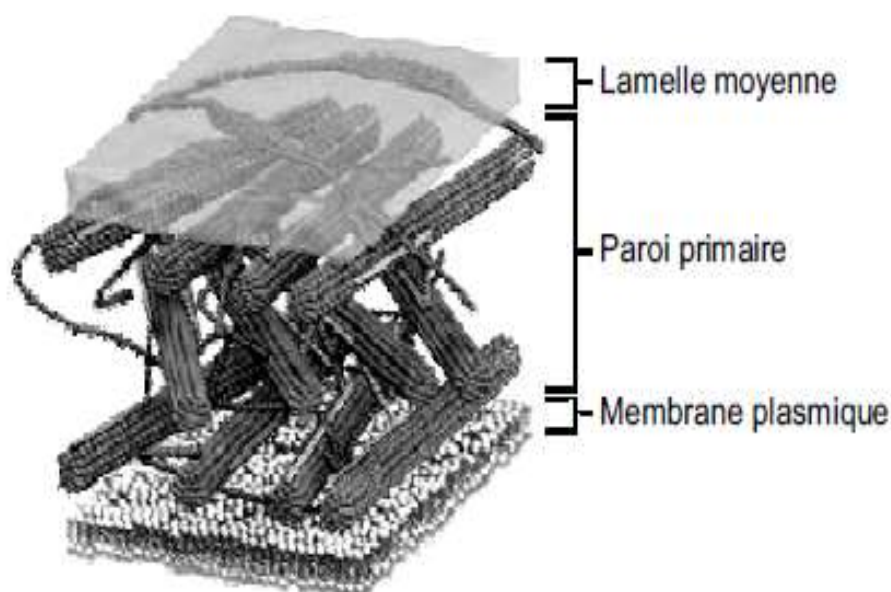


Figure 8: architecture de la paroi primaire. (Roig, 2011).

III. 2. 3. Paroi secondaire :

La paroi secondaire située entre la membrane cytoplasmique et la paroi primaire formée en fin de croissance c'est-à-dire Elle apparaît dans les cellules matures. La paroi secondaire est rigide et peut atteindre jusqu'à 10 μm d'épaisseur (Roig, 2011). Elle est de composition différente de la paroi primaire dans lequel la paroi secondaire elle a une faible teneur en pectine par rapport a la paroi primaire et surtout caractérisée par l'apparition des dépôt hydrophobe de lignine , qui peut représenter jusqu'à 35% de la masse sèche des tissus ligneux , La lignine est très solide, même plus solide que les micro fibrilles de cellulose , ces dernier qui constituer 45% de la matière sèche de la paroi secondaire avec les hémicelluloses. (Hopkins, 2003)

La paroi secondaire est composée de trois couches distinctes appelées S1, S2 et S3 chacune composée de plusieurs plans de microfibrilles de cellulose La couche centrale S2 est la plus épaisse (de 0,5 à 8 μm) et son angle d'inclinaison est le plus faible des trois couches qui implique une grande résistance mécanique. La rigidité de la cellule dépend donc de cette couche centrale S2. (Roig, 2011)

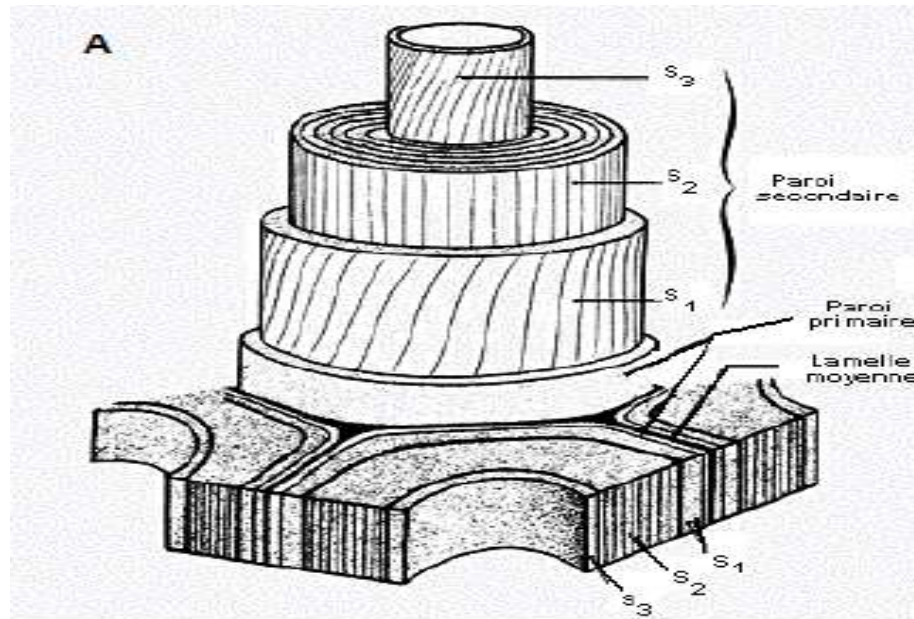


Figure 9: les niveau de la paroi végétale. S1, S2, S3 : les trois couches de la paroi secondaire (Hachem ,2014).

III. 2. 3. 1. Lignine :

La lignine est le second biopolymère organique majoritaire chez les plantes après la cellulose. Les microfibrilles cellulosiques sont intégrées dans un réseau d'hémicelluloses et de lignine. La réticulation de ce réseau elle rendre les parois cellulaires hydrophobes et contribue aux caractéristiques structurelles des parois secondaires tel que la rigidité et l'imperméabilité. La lignine est représentée un vaste groupe de polymères aromatiques. Ces unités de base sont principalement des monomères d'alcools hydroxycinnamyl appelés monolignols (alcool p-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique), Les monolignols sont différents entre eux par leur degré de méthylation sur leur cycle aromatique. Donc ce polymère tridimensionnel (lignines) provient de la copolymérisation de ces trois alcools, qui sont les unités p-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et silyngyl (S). (Wertz, 2010)

La composition de la lignine en monomère varie selon l'espèce végétale, les types cellulaires, la strate pariétale (les couches de la paroi), l'âge des cellules et l'environnement. Les gymnospermes sont principalement composées d'unités G avec des niveaux faibles d'unités H. Les angiospermes dicotylédones contiennent les deux unités G et S (avec de faibles quantités d'unités H). Les angiospermes monocotylédones (herbes) contiennent les trois unités H, G et S. Les unités dans la lignine sont liées par des liaisons labiles de type β -O-

Chapitre I : Les polysaccharides des végétaux supérieurs

4 , Les liaisons résistantes, telles que les liaisons biphenyles (Roig , 2011 ; Nguyen-Kim , 2015).

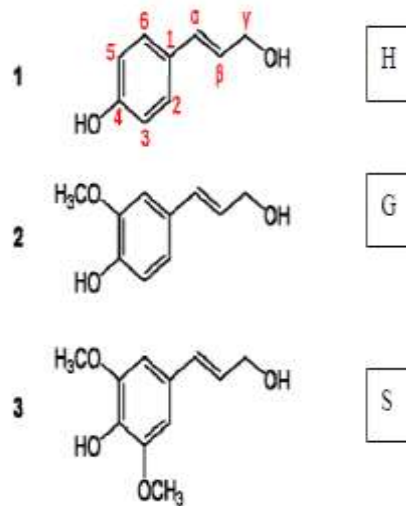


Figure 10: Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine: 1 alcool *p*-coumarylique ; 2 alcool coniférylique ; 3 alcool sinapylique (Wertz , 2010).

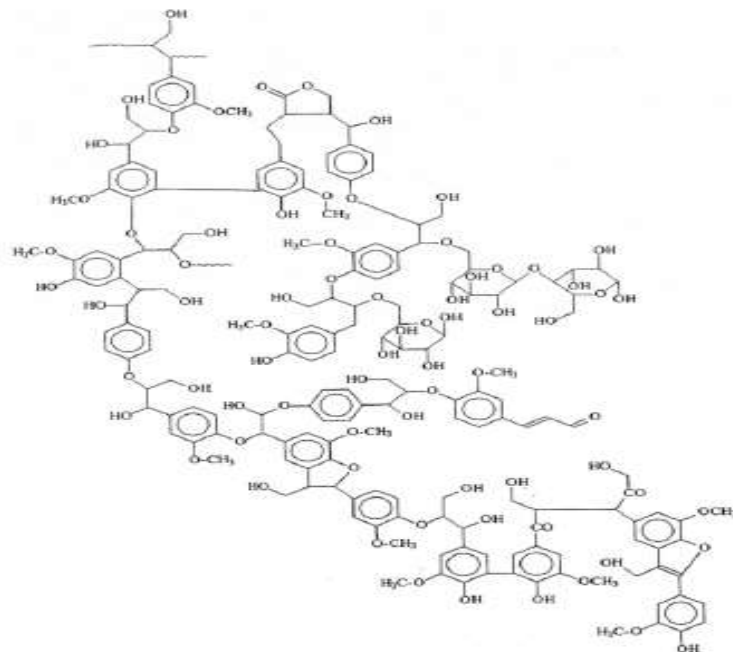


Figure 11: Structure possible de la lignine (Roig., 2011).

III. Les polysaccharides de réserve chez les végétaux supérieurs.

III. 1. Amidon :

L'amidon est une réserve nutritionnelle pour les plantes et un aliment majeur pour les animaux. L'amidon est un mélange de glucanes que les plantes synthétisent comme réserve nutritive principale qu'il représente jusqu'à 30 ou 60 % du poids sec d'un tissu végétal; (Audigie et Zonszain, 1991), Il est abondant dans les graines et les tubercules. Généralement On le trouve dans le cytoplasme sous forme de granules insolubles. (Voet, 2005)

L'amidon est constitué majoritairement d'une fraction glucidique (98 à 99%) et d'une fraction non glucidique mineure (1 à 2%). L'amidon est un homopolymère d'unité D-glucose. Les unités D-glucoses sont liées majoritairement (95 à 96 %) par des liaisons de type $\alpha(1,4)$ et dans une moindre mesure (4 à 5 %) par des liaisons de type $\alpha(1,6)$. L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente : l'amylose, molécule essentiellement linéaire et l'amylopectine, molécule ramifiée. Selon l'origine botanique, les teneurs en amylose et en amylopectine varient respectivement de 20 à 30% et de 70 à 80% pour les amidons standards, sur le plan structural L'amidon est formé de petits grains d'aspect microscopique spécifique dans lesquels on observe généralement autour d'un hile ponctiforme ou étoilé des zones concentriques alternativement hydratées (foncées) et peu hydratées (claires). Les grains sont biréfringents, donc anisotropes, et présentent le phénomène de la croix noire au microscope polarisant. (Bahrani., 2012)

L'amidon aussi elle est insoluble dans les solvants organiques et l'eau froide bien qu'il soit hydrophile. Par agitation avec l'eau, il se forme une suspension instable appelée lait d'amidon qui, chauffée vers 70 °C, devient visqueuse et translucide, au cours du chauffage les grains d'amidon s'hydratent, gonflent formant ainsi un gel, l'empois d'amidon. Ce gel peut rétrograder, sa viscosité diminue ; il se fluidifie puis précipite. La rétrogradation est un inconvénient pour certaines préparations industrielles et alimentaires (colles et pâtes). (Rouabah et Boulkandoul, 2015)

III. 1. 1. Localisation.

III. 1. 1. 1. Les plastes :

Les plastes sont des organelles spécifiques des cellules végétales (des plantes et des algues). Ils sont le lieu de réactions importantes du métabolisme (ex. la photosynthèse, la synthèse des acides gras, etc.), et du stockage de nombreux produits comme l'amidon (Nacir , 2015).

Les plastes sont spécialisés selon le type de cellules dans lesquelles ils se trouvent et présentent une grande variété de structures et de fonctions. Ils dérivent des proplastides que l'on trouve dans les cellules embryonnaires (zygote et méristèmes, tissus peu ou indifférenciés formant une zone de croissance où ont lieu les mitoses). Les proplastides contiennent uniquement un stroma dense et granuleux, quelques ribosomes, des vésicules, un ADN circulaire et deux membranes constituant l'enveloppe (Nacir , 2015).

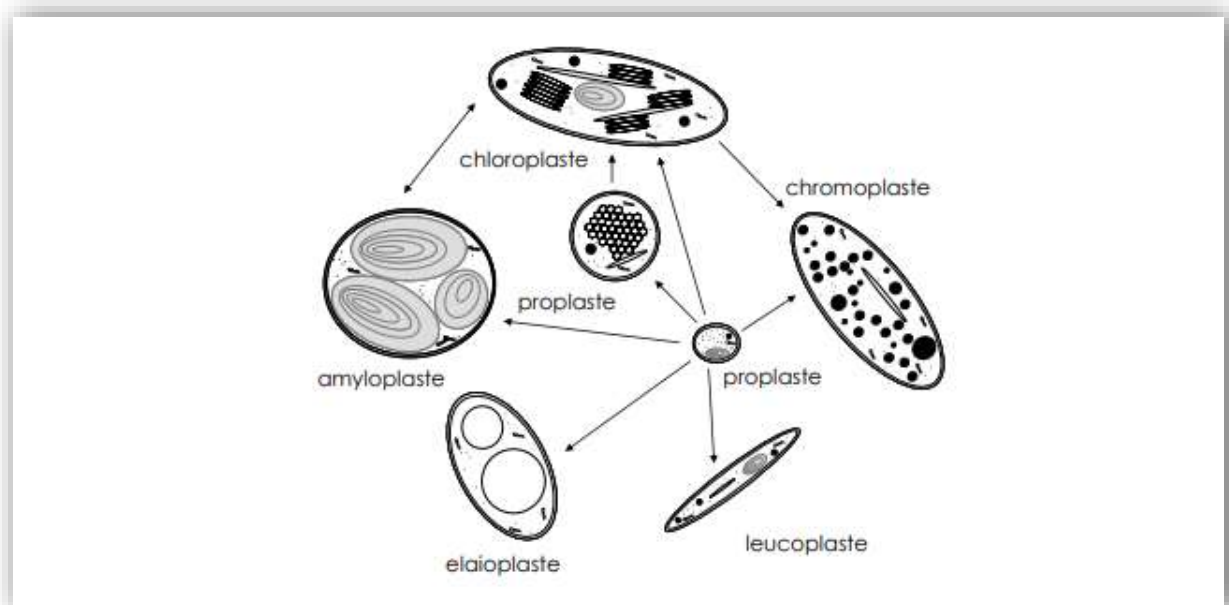


Figure 12: Interconversion plastidiale. Tous les plastes observés dans les cellules des végétaux supérieurs dérivent d'un plaste embryonnaire (proplaste). Les plastes peuvent être chlorophylliens ou non. Dans tous les cas, la seule structure membranaire commune est l'enveloppe (membrane interne et membrane externe).

III. 1. 1. 2. Amyloplaste:

Accumulent de l'amidon. Ils sont présents dans les organes de réserves (tiges, tubercules, graines...). Ils peuvent être formés, de façon réversible, à partir des proplastides, des chromoplastes ou des chloroplastes en réponse à un stress. Les amyloplastides des racines sont appelés des statolithes. Ils sont localisés dans la zone apicale du méristème des racines et jouent un rôle dans la détection de la gravité (**Nacir, 2015**).

Le développement des plastides implique le fonctionnement coordonné de deux génomes : le génome plastidial et le génome nucléaire. Le génome plastidial contient environ 100 gènes codant pour des ARNt et des ARNr, des protéines impliquées dans la photosynthèse, la transcription et la traduction des gènes plastidiaux. La plupart des protéines du plastide sont codées par le génome nucléaire et doivent donc traverser l'enveloppe par un mécanisme d'import des protéines (**pour revue voir Heins et al., 1998**).

III. 1. 2. la structure chimique.

III. 1. 2. 1. Amylose:

L'amylose est caractérisé par une macromolécule de structure linéaire constituée d'unités α -D-glucose, liées par des liaisons de type α (1-4). L'amylose se compose de plusieurs chaînes présentant des degrés de polymérisation variables, fonction de l'origine botanique, entre 500 et 6000 unités glucose.

l'amylose est susceptible de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules organiques ou minérales, comme l'iode, les acides gras libres, les lipides monoacylés et certaines molécules aromatiques, Dans le cas de l'iode, la formation du complexe conduit au développement d'une coloration bleue (absorption maximale à 640 nm) caractéristique, propriété utilisée pour mesurer la quantité d'amylose dans l'amidon. (Bahrani , 2012 ; **Audigie et Zonszain , 1991**)

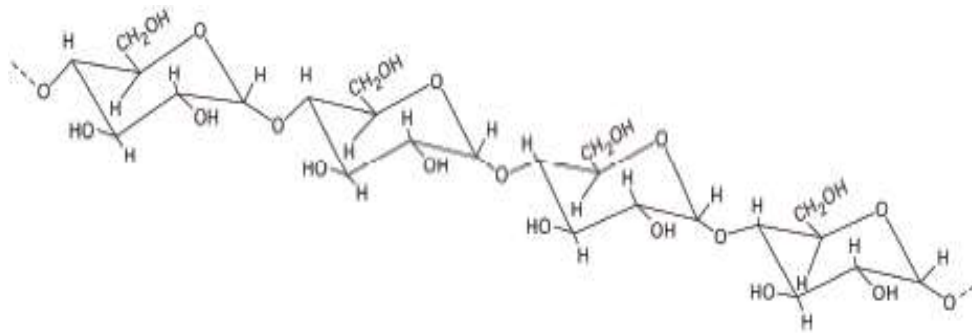


Figure 13: structure chimique de l'amylose. (Bahrani, 2012).

III. 1. 2. 2. Amylopectine.

L'amylopectine est une macromolécule de structure ramifiée. L'amylopectine est formée par la polymérisation d'un seul monomère D-glucose, lié principalement par des liaisons α (1-4) et quelques liaisons α (1-6) à l'origine des ramifications, ces dernières représentent environ 5 à 6% du nombre total de liaisons.

L'amylopectine se complexe également avec l'iode pour donner une couleur variant du rouge au violet (et non pas bleue comme dans le cas de l'amylose) car la complexation de l'iode se fait seulement sur les chaînes externes de l'amylopectine.

Le haut degré de ramification de l'amylopectine ne lui permet pas de rétrograder rapidement comme dans le cas de l'amylose. Cependant, on attribue à l'amylopectine la propriété de pouvoir gélifier très lentement. (Bahrani, 2012)

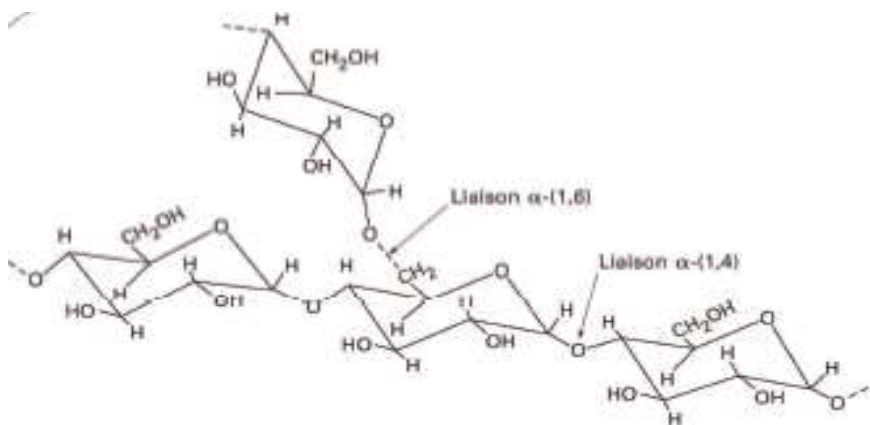


Figure 14 : structure chimique de l'amylopectine. (Buléon et al, 1990).

III. 2. Gomme :

Constituants pathologiques s'écoulant à l'extérieure du végétal, exsudation centrifuge spontanée ou forcée, Sont collantes et proviennent de la surface des arbres. Les propriétés physico-chimiques des gommés d'origine végétale peuvent changèrnt fonction du site d'origine, de l'espèce et des propriétés du sol.

La plus part des gommés se dissolvent dans l'eau formant des solutions visqueuses et elles précipitent par addition d'éthanol. donc la viscosité de la gomme varie en fonction de la période de récolte: elle est faible en période de pluies et élevée en période sèche. Le calibrage de la gomme. Tient compte de plusieurs variables physico-chimiques dont la viscosité. (Bahrani , 2012)

Les gommés sont des molécules hétérogènes ramifiées contenant des acides uroniques (Acide glucuroniques comme la gomme arabique et ecide galacturoniques comme les gommés agragante et gomme sterculia). La gomme arabique constituée principalement de l'acide glucuronique + L-arabinose +L-rhamnose + D-galactose. La gomme adragante Elle est constituée à 30% de la tragacanthine (un polysaccharide acide qui libère par hydrolyse de l'acide galacturonique, du fucose et du xylose) et à 70% de la bassorine (un polysaccharide complexe formé d'acide polyméthoxylé). Et finalement la gomme sterculia qui ont formée de l'acide galacturonique + rhamnose + galactose + acide glucuronique.

III. 3. mucilage:

Les mucilages sont des polymères ramifiés pouvant être acides ou neutres , sont polaires et très hydrophiles, de très hautes masse molaires, , considérés comme des constituants normaux des végétaux . Le rôle physiologique du mucilage n'est pas négligeable puisqu'il permet à la plante d'absorber et stocker des quantités hydriques importantes. En cas de besoin, la libération progressive de l'eau vers d'autres tissus est possible en période de sécheresse. Inversement, en présence de quantités d'eau trop importantes, le gonflement du mucilage peut entraîner l'éclatement des tissus. Les mucilages divise en deux catégorie, les mucilage acide qui sont employés comme laxatifs et en trouve chez la famille des *plantaginacées* , et les mucilages neutre comme la gomme de caroube (les graines renferment 10%) qui sont constitué de galactose et de mannose . (Bahrani , 2012)

Chapitre II :

**Les méthodes et les
techniques d'extraction et
caractérisation des
polysaccharides**

I. Introduction :

Ce chapitre sera composé de deux parties. Dans la première partie, nous décrirons les différentes méthodes d'extraction et de purification des polysaccharides, Dans la seconde partie, nous présenterons les différentes techniques utilisées pour La caractérisation structurale des polysaccharides.

l'extraction des polysaccharides est toujours l'approche dominante pour les obtenir, l'extraction de ces dernier est réalisée à l'aide d'une solution aqueuse à l'ébullition après broyage ou découpage du matériel, généralement s'effectue par nombreuses méthodes selon le type des polysaccharides. Concernant les analyse structurale nous disons que sont des technique complexe et impose l'utilisation conjoint des méthodes physique (technique spectrales) et des méthodes chimiques (hydrolyse, méthanolyse, hydrolyse partielle, Formation de dérivés, dégradations contrôlées du polymère et de dérivés de celui-ci.).

II. Les méthode et les techniques d'extraction et purification des polysaccharides.

II. 1. Les méthodes d'extraction :

II. 1. 1. Les méthodes physiques :

II. 1. 1. 1. Ultrasonic Extraction :

La méthode d'extraction ultrasonic basée sur la cavitation des ondes ultrasoniques est utilisée pour briser les parois cellulaires et accélérer la dissolution des substances organiques dans les cellules, améliorant ainsi le rendement des polysaccharides.

Peng et al, (2011) ont utilisé des ondes ultrasonores pour extraire des polysaccharides de lentinan, Le rendement d'extraction du polysaccharide de lentinan est de 20,58 %, ce qui est proche de la valeur prédite de 22,37 %, ce qui indique que l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse pour optimiser le rendement des polysaccharides de lentinan est raisonnable. La technologie d'extraction optimisée est meilleure que l'ébullition traditionnelle à l'eau chaude, ce qui augmente le rendement des polysaccharides de lentinelle de 33,29 % et diminue également la consommation d'énergie de 55,51 %.

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

Des recherches récentes suggèrent que la méthode d'extraction ultrasonique pourrait améliorer de façon significative le taux de dissolution des polysaccharides et optimiser leur rendement. (Peng et al, 2011 ; Ren & al , 2019)

II. 1. 1. 2. Extraction par micro-ondes :

Le principe de la méthode d'extraction par micro-ondes est que, lorsque la cellule absorbe l'énergie des micro-ondes, la pression et la température intracellulaire augmente, ce qui entraîne la rupture de la cellule et fait passer les composants actifs dans le solvant.

La méthode d'extraction assistée par micro-ondes peut améliorer le rendement des polysaccharides de manière significative tout en économisant de l'argent, l'énergie et du temps. Par exemple dans une études comparative dédirigé par Boudraa ., et al sont constater que la meilleure valeur du rendement est celle de la pectine extraite par la méthode assistée par micro-ondes avec une valeur de 45.33% pour la Thomson et 44.5 % pour la sanguine, suivie par celle de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique avec des valeurs respectives de 41.26% et de 32.83%, et vient en dernière position celle utilisant l'acide citrique montrant des valeurs largement inférieures aux précédentes, 28.33% et 25.66 % . (Ren & al , 2019 ; Boudraa & Benali , 2017)

Mode opératoire :

Une quantité de la matière sèche , introduites dans la chambre d'extraction avec une quantité d'eau acidifiée par l'acide sulfurique (pH=1.4). La puissance micro-ondes appliquée est de 400 W avec une durée de 169s, puis le mélange est centrifugé à 3500 rpm/5minutes. Le liquide a été précipité avec un volume égal d'éthanol à 95% (v / v). La masse de polysaccharide coagulée a été lavée trois fois avec de l'éthanol (v/v) afin d'éliminer les mono et les disaccharides. Après l'extraction, le polysaccharide humide a été séchée à 50 °C dans une étuve jusqu'à un poids constant (Boudraa & Benali , 2017).

Le rendement en polysaccharide (% P) a été calculé à partir de l'équation suivante :

$$MP \% = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

M_0 (g) : est le poids de polysaccharide séchée.

M (g) : est le poids de la poudre de matière séchée.

II. 1. 1. 3. L'extraction en eau subcritique:

L'extraction en eau subcritique , également connue sous le nom d'eau chaude pressurisée, est de l'eau chauffée au-dessus du point d'ébullition normal de 100° C mais inférieur à la température critique élevée de 374° C à une pression donnée, tout en restant à l'état liquide.

Cette technique a été appliquée avec succès à l'extraction des composants actifs de produits naturels. Bien que l'application de cette technique aux polysaccharides naturels en soit encore au stade de la recherche fondamentale et n'ait pas encore fait l'objet d'une étude approfondie , et n'a pas atteint le niveau de la production industrielle, cette méthode peut être utilisée pour extraire des polysaccharides de meilleure qualité et maintenir une activité plus élevée. (**Ren & al , 2019**)

II. 1. 2. Les méthodes chimiques :

II. 1. 2. 1. L'extraction des polysaccharides hydro soluble :

Après un nettoyage manuelle à l'eau de robinet pour éliminer les poussière et un coséchés à l'étuve à 40 °C . ont été ensuite broyés à l'aide d'un mélangeur mécanique à haute vitesse (Blender 800 ES) afin d'obtenir une poudre fine. Donc après cette phase préparatoire, nous avons réalisé une extraction aqueuse. pour obtenir une première fraction de polysaccharides hydrosolubles nommée FP1. Elle a été suivie d'une seconde extraction à partir du culot 1 issu de la matière première végétale pour obtenir une seconde fraction de polysaccharides hydrosolubles nommée FP27.

Protocole d'extraction : (Petera, 2016)

- Mises la poudre en suspension dans L d'eau distillée.
- Le mélange est homogénéisé sous agitation à 750 rpm pendant 3 heures à température ambiante à l'aide d'un agitateur à pales.
- Filtré à travers une passoire à mailles fines pour retirer les débris macroscopiques insolubles (Culot 1).
- Le filtrat obtenu est centrifugé à 20 000 g pendant 15 minutes à 20 °C à l'aide d'une centrifugeuse (BECKMAN COULETR, anti-J-E, centrifuge).
- Filtré le surnageant sous vide à l'aide d'un Buchner muni de papier Wattman de porosité 20- 25 µm.
- Les polysaccharides présents dans le filtrat sont précipités par 3 volumes d'éthanol 96 % sous agitation (350 rpm) pendant 30 minutes et récupérés par filtration sur verre fritté de porosité 2 µm .
- Ils sont lavés à l'éthanol 96 % (500 mL) puis à l'acétone (150 mL) à l'aide d'une passoire à mailles fines.
- Séchés Les polysaccharides obtenus à 45°C pendant 24 h dans une étuve et broyés en poudre fine (FP1).
- Ce procédé d'extraction est répété sur le Culot 1 pour pouvoir récupérer le reste des polysaccharides, les polysaccharides issus de cette opération sont nommés FP2. (Petera , 2016)

Le rendement d'extraction des polysaccharides est calculé selon la formule suivante : (Seddiki & al , 2017).

$$\text{Rendement de l'extraction (\%)} = \frac{\text{poids de l'extrait des polysaccharide (g)}}{\text{poid de la poudre sec de plante (g)}} \times 100$$

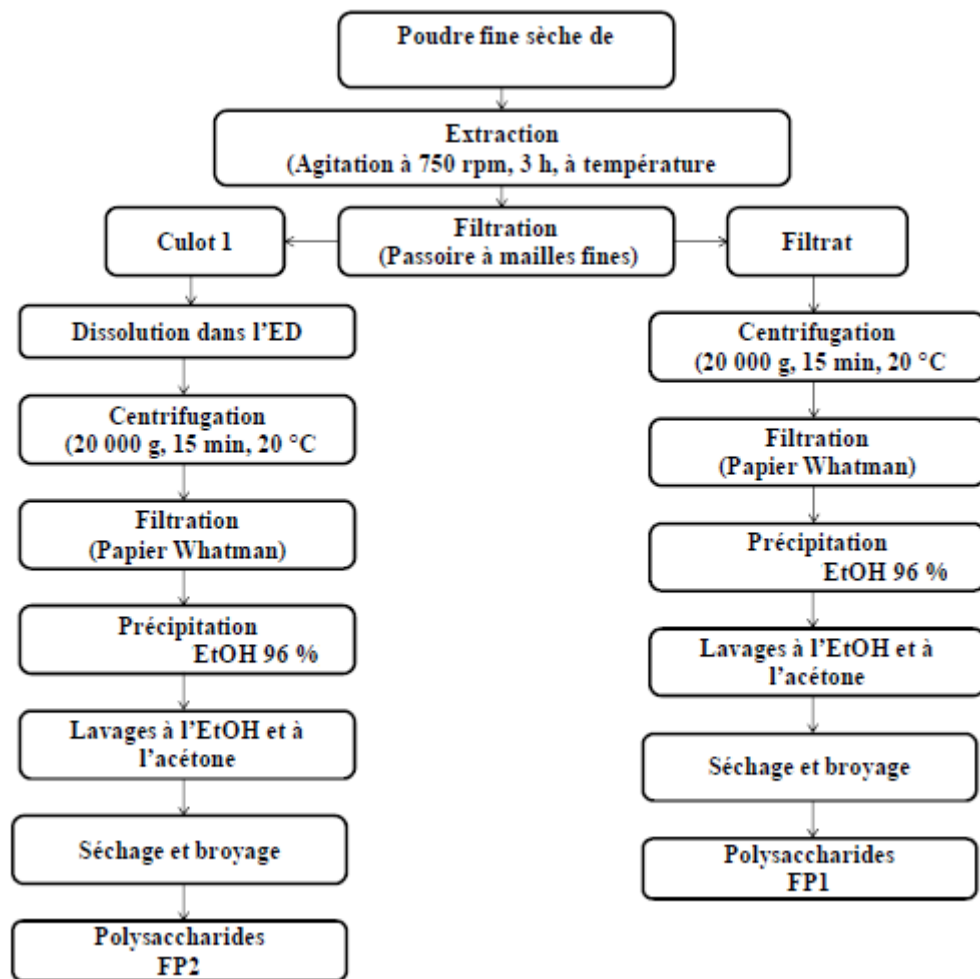


Figure 15: Schéma général du procédé d'extraction de polysaccharides hydrosoluble . (Petera , 2016).

II.1.2.2. Méthode d'extraction de polysaccharide non- hydrosoluble.

Pour l'extraction des polysaccharides insoluble dans l'eau , on a commence notre travail par une étape d'extraction des lipides suivie par une étape de deproteinisation et du blanchiment .

Protocole d'extraction : (Kouadri, 2018)

- Ont été mélangées dans une solution aqueuse notre échantillon avec le NaOH (1M) dans le rapport (poudre/solution) a 70°C pendant 24h . la partie insoluble a été séparée par centrifugation (10000 rpm, 20 min), suivie par un lavage plusieurs fois avec de l'eau purifiée jusqu'a l'obtention du pH neutre, puis lyophilisée.

- Le matériau lyophilise A1 a été mélange avec une solution de chloroforme/méthanol, Apres 4h d'agitation a température ambiante, la partie insoluble a été séparée par centrifugation (10000 rpm, 20 min), suivie par un lavage trois fois avec de l'acétone et finalement lyophilisée.

- Agitée la matière lyophilisée A2 avec la solution de blanchiment , pendant 6 h a 80°C. La partie insoluble a ensuite été filtrée, lavée plusieurs fois avec de l'eau purifiée jusqu'à l'obtention du pH neutre et finalement lyophilisée pour obtenir une poudre blanche.

Protocole de la solution de blanchiment :

Mélangée une solution aqueuse de chlorite (1,7% en poids de NaClO₂ dans l'eau) avec un tampon acétate de sodium de pH = 4,8.

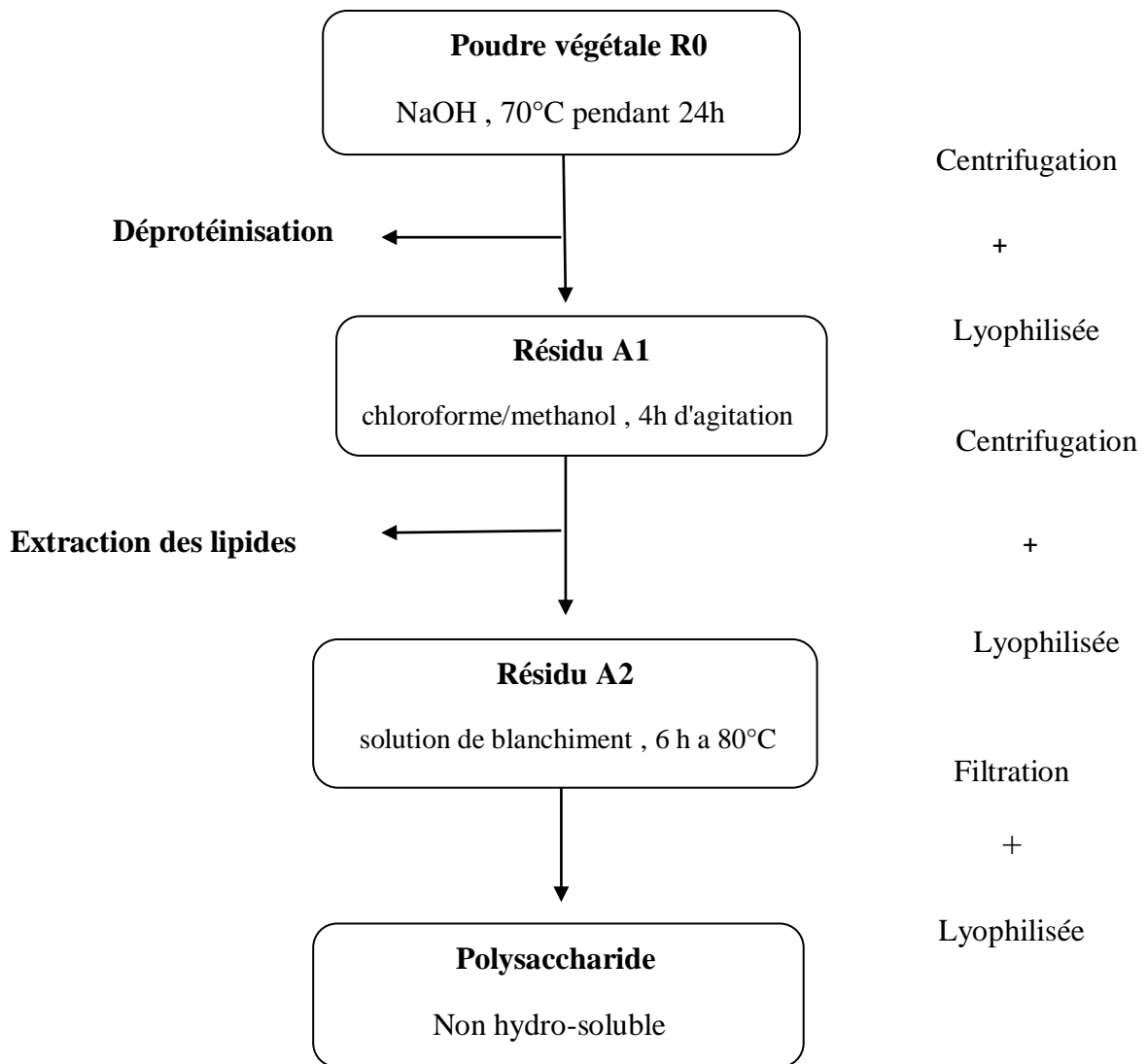


Figure 16: Schéma général du procédé d'extraction de polysaccharides non-hydrosoluble (Kouadri , 2018).

II. 1. 2. 3. Méthodes d'extractions des pectines.

Les pectines sont classées suivant leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, soit par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).

➤ **Protocole d'extraction des pectines à l'eau chaude selon (Hachem, 2014).**

- Traités les résidus pariétaux à l'eau à 100° C deux fois durant 2 heures.
- Après précipitation à l'éthanol, dialyse contre de l'eau distillée puis centrifugation, on obtient les fractions notées AL-WSP (water soluble pectic).
- Ensuite traités les résidus obtenus par une solution aqueuse d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 1% pendant 6h à 80°C.
- Après filtration, les extraits sont dialysés contre l'eau distillée, précipités à l'éthanol, puis centrifugés et enfin lyophilisés. Les fractions obtenues sont notées AL-CSP (chelating soluble pectic).

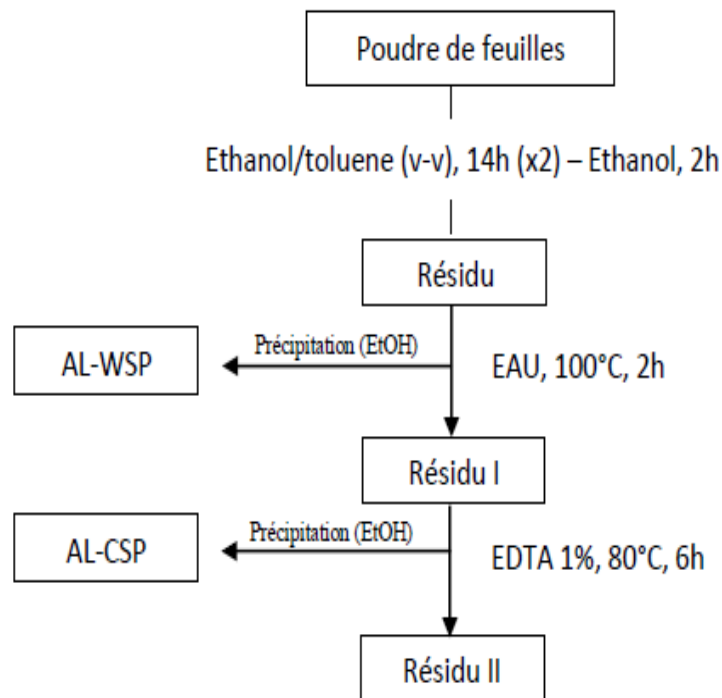


Figure 17: Schéma d'extraction de pectines pariétales (Hachem , 2014).

➤ **Protocole d'extraction de la pectine à l'acide dilué à chaud (Rezzoug et al, 2007).**

- Ajoutée (1 g) de poudre à une solution de 20 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N puis porté à ébullition dans un système à reflux à 90 °C pendant 45 minutes.
- 10 ml du mélange obtenu ont été prélevés après 6 minutes puis plongés dans la glace afin d'arrêter le processus d'hydrolyse.
- Le filtrat est récupéré après filtration sur une grille.
- La pectine est alors précipitée avec deux volumes d'alcool (éthanol) pour un volume de filtrat.
- Le précipité obtenu est lavé par un volume d'alcool à 6,6 % puis centrifugé à 10000 tours par minute pendant 20 minutes.
- Le culot est ensuite recueilli, une portion de celui-ci est analysée dans une balance pour la détermination de la quantité de la pectine extraite de 1 g de broya.

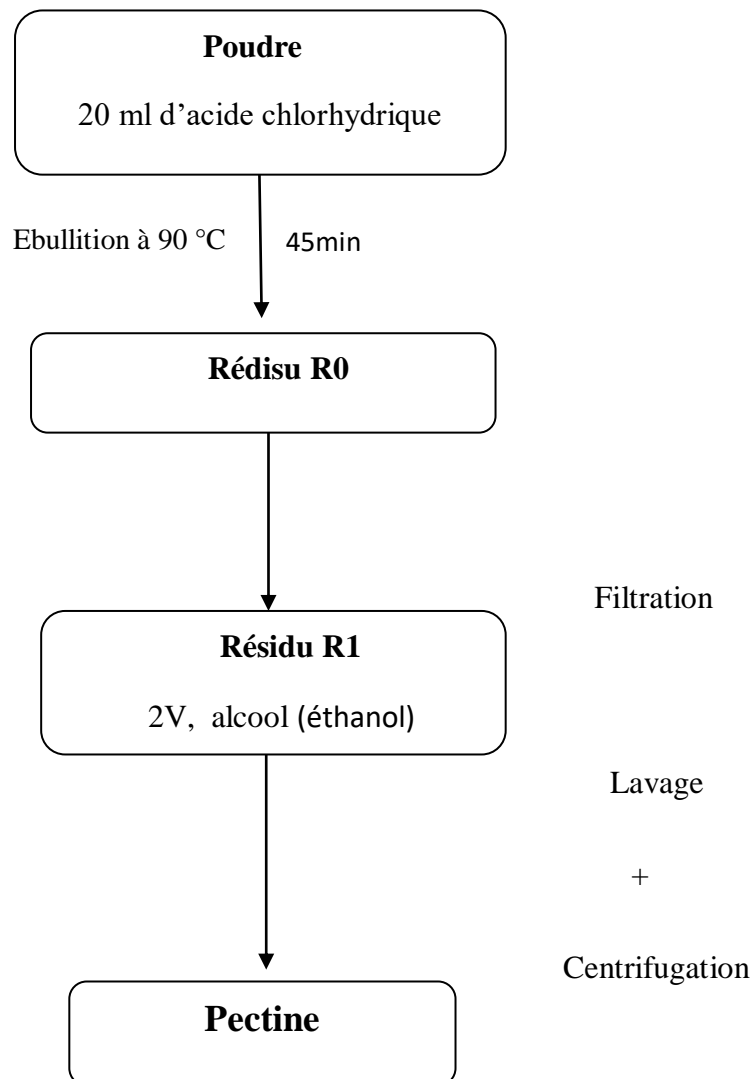


Figure 18: Schéma d'extraction de pectines . (Rezzoug et al , 2007).

➤ **Protocole d'extraction de la pectine par des agents chélateurs de cations divalents (Kar et Arslan, 1999).**

- Solubilisation par HCl pH 2.5, 90°C, pendant 90 minutes.
- Précipitation soit par l'oxalate d'ammonium 0,25%, pH 3.5, 75 °C, pendant 90 minutes.
- Soit avec de l'EDTA (EDTA : Acide disodique éthylènediamine tétraacétique 0,5% 90 °C, 90 minutes.

II. 1. 2. 4. Méthode d'extraction des hémicelluloses.

➤ Protocole d'extraction des hémicelluloses (Hachem, 2014).

Obtention des fractions (S) :

- La première étape du protocole consiste à éliminer les pigments dans un premier temps par l'acétone puis par l'isopropanol.

- Puis les matières extractibles (les sucres circulants, les tanins, les éléments minéraux) sont éliminées par l'éthanol 80% (fraction S1).

- Dans une troisième étape les pectines sont extraites de façon séquentielle : d'une part, les pectines HM (hautement méthylestérifiées) sont extraites à l'eau chaude à 100°C pendant 20 minutes (fraction S2), d'autre part les pectines FM (faiblement méthylestérifiées) sont extraites en présence d'oxalate d'ammonium $C_2O_4(NH_4)_2$ 1%, 2h à 85°C (fraction S3), un chélateur de calcium qui permet de déstabiliser les structures en « boîte à œuf ».

- Puis enfin, les hémicelluloses sont extraites en deux étapes fractions S4 (hémicelluloses KOH) et fraction S5 : hémicelluloses NaOH par des solutions alcalines (KOH et NaOH 4,3 M respectivement) additionnées d'un agent réducteur, le $NaBH_4$. Le résidu cellulosique est obtenu après avoir répété la dernière étape à chaud pendant 1h.

Obtention des résidu (C):

- Le traitement de la poudre avec l'eau à 100°C pendant 20 minutes par l'acétone puis par l'isopropanol conduit à obtenir le résidu C1.

- Après filtration on obtient le résidu C2 .

- Par la suite une extraction de 24 h à température ambiante par la potasse 4.3 M en présence de borohydrure de sodium (3 g/l) conduit, après filtration sur verre fritté (Porosité 3) et rinçage par l'eau, au résidu C4.

- Celui-ci subit la deuxième étape d'extraction par la soude 4.3 M en présence de borohydrure de sodium (3 g/l) pendant 24 h à température ambiante.

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- Le résidu C5 est obtenu par filtration de la suspension sur verre fritté (porosité 3) puis rinçage par l'eau.

- Afin d'éliminer les dernières impuretés, le résidu est traité par la soude 4.3 M en présence de borohydrure de sodium (3 g/l) pendant 1 h à 100°C. Un résidu cellulosique final (C6) est obtenu.

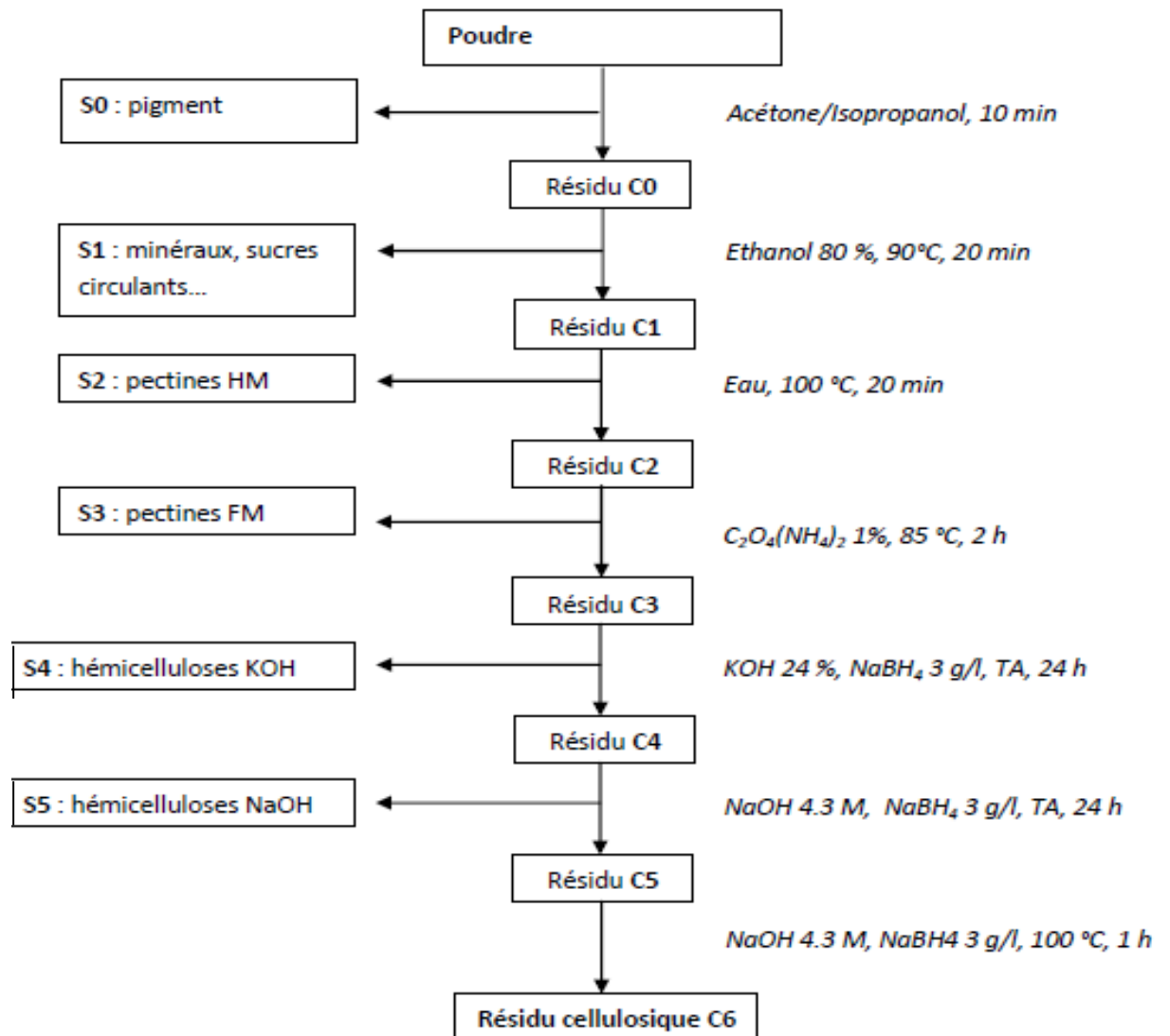


Figure 19: Protocole d'extraction sélective et séquentielle des polysaccharides pariétaux d'après (Hachem , 2014).

II. 1. 3. Les méthodes sélectives.

II. 1. 3. 1. La méthode de Sun et al. (1995), (La cellulose).

La méthode de Sun et al. (1995) isole à partir de paille de froment la cellulose en plusieurs étapes D'extraction chimique.

➤ Protocole d'extraction :

- Un prétraitement de l'échantillon à la NaOH 1,5 % pendant 144 h à 20°C.
- Les pectines résiduelles dans l'échantillon sont extraites par un agent chélatant, l'oxalate d'ammonium à 0,25 % pendant 4 h à 85 °C.
- Éliminée La lignine résiduelle par une extraction au NaClO₂ et à l'acide acétique (pH entre 4,2 et 4,7) pendant 24 h à 75 °C (Sun et al., 1995).
- Extraite les cendres, les hémicelluloses à la KOH 24 % et à l'acide borique 2 % pendant 2 h et à 20 °C (Sun et al , 1995).

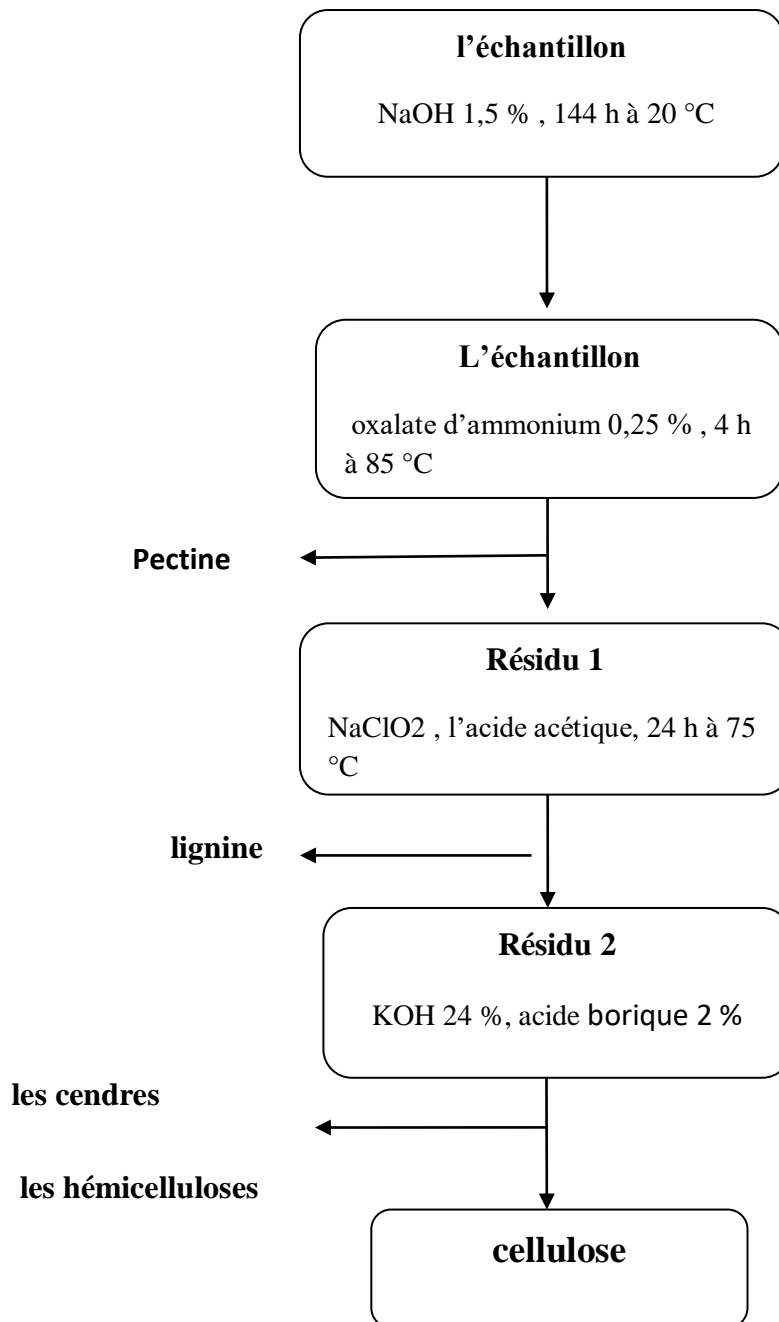


Figure 20: Protocole d'extraction sélective et séquentielle de cellulose.(Sun et al. 1995).

II. 1. 3. 2. Les méthodes de Cutillas-Iturralde et al. (1998) , (Xylanes et xyloglucanes).

➤ **Protocole d'extraction :**

- La délignification de L'échantillon au NaClO₂ 40 % et au H₂SO₄ 0,3 % pendant 2 h à 70 °C.
- Mettre L'échantillon dans le KOH 1 M, au NaBH₄ 20 mM et sous atmosphère d'azote pendant 2 h à 60 °C.
- Obtenus Les xylanes et les xyloglucanes du culot, après centrifugation.
- Centrifugée cette suspension afin de récupérer les xylanes dans le surnageant et les xyloglucanes dans le culot.
- Les xyloglucanes du culot sont extraits par quatre traitements à la KOH 4 M et au NaBH₄ 20 mM sous atmosphère d'azote pendant 24 h à 20 °C.
- La suspension résultante est centrifugée.
- Les quatre surnageant sont combinés pour obtenir la fraction des xyloglucanes.

Remarque : Les fractions de xylanes et de xyloglucanes sont purifiées par l'hydrolyse de l'amidon et des protéines par respectivement des glycohydrolases (α -amylase et pullulanase) et des protéases.

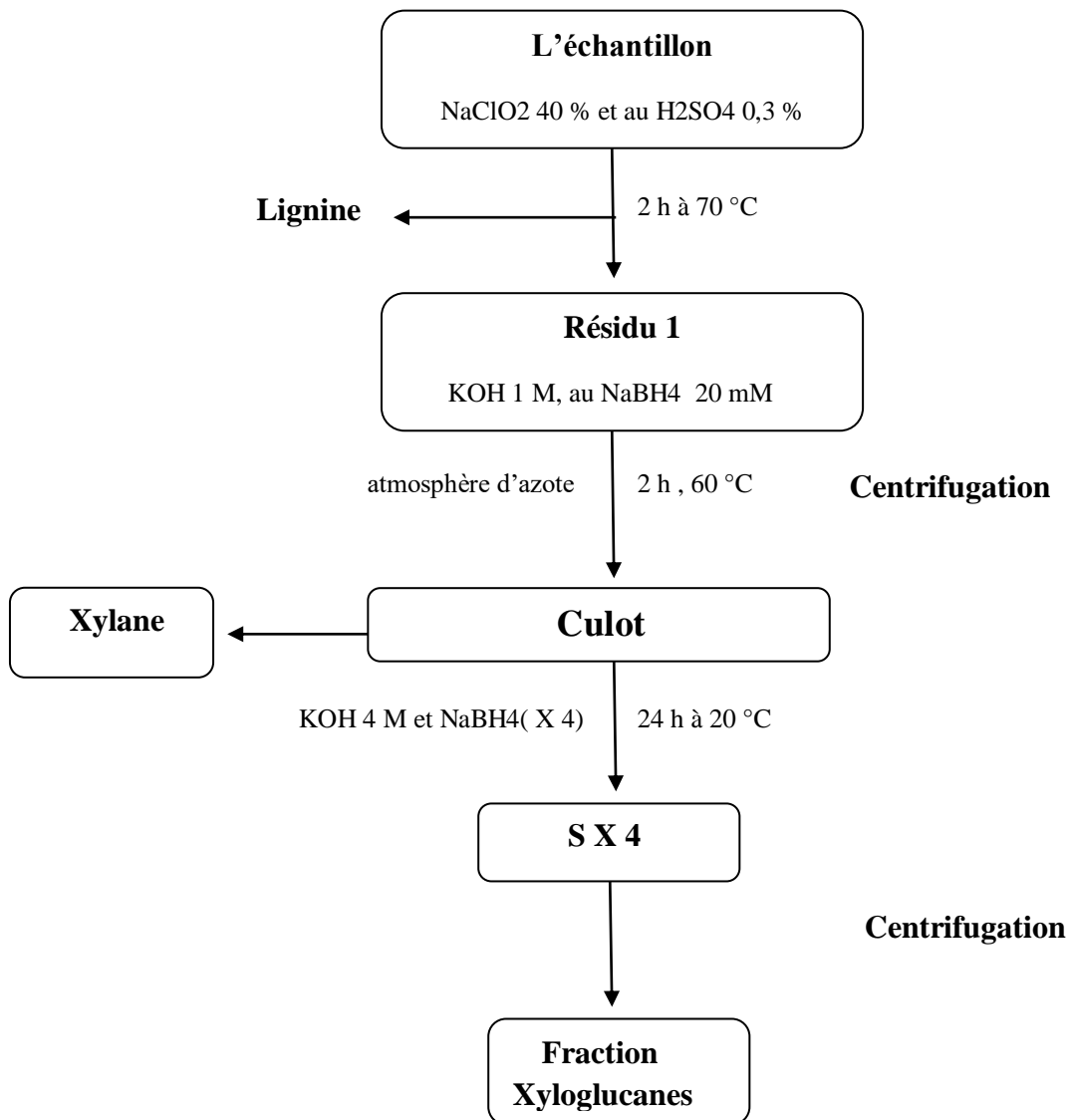


Figure 21 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle Xylanes et xyloglucanes.(Cutillas- Iturralde et al.1998).

II. 1. 3. 3. La méthode d'Izydorczyk et al. (1998), (β -glucanes et xyloxyanes).

➤ **Protocole d'extraction :**

- Extrait par voie enzymatique à partir de grains d'orge une fraction de β -glucanes et de xyloxyanes.
- Les β -glucanes sont séparés des xyloxyanes par une précipitation sélective au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- L'échantillon est traité dans de l'eau à 40 °C pendant 30 min.
- L'échantillon est soumis à deux centrifugations.

➤ **Obtenir les β -glucanes et les xyloxyanes hydrosolubles à purifier:**

Premièrement, les protéines du mélange des deux surnageant contenant les β -glucanes et les xyloxyanes hydrosolubles sont dénaturées en chauffant la solution à 95 °C. L'élimination des protéines du mélange des deux surnageant est effectuée par filtration sur de la diatomite suivie par adsorption des protéines du filtrat sur de l'argile. Un nouveau surnageant est obtenu par centrifugation de la suspension. Ce surnageant est soumis à l'hydrolyse de l'amidon par de l' α -amylase pancréatique. la solution est dialysée pour en éliminer les hydrates de carbone non structuraux, chauffée à 95 °C pour en désactiver les enzymes ajoutées et centrifugées.

➤ **Obtenir les β -glucanes et les xyloxyanes non hydrosolubles purifiés :**

Deuxièmement, les β -glucanes et les xyloxyanes non hydrosolubles contenus dans le culot initial sont extraits par voie alcaline par une solution saturée en $\text{Ba}(\text{OH})_2$ contenant 1 % (p/v) de NaBH_4 . Les β -glucanes et les xyloxyanes sont séparés du résidu insoluble par deux centrifugations. Les deux surnageants sont combinés et neutralisés par de l'acide acétique. Cette solution contenant les β -glucanes et les xyloxyanes non hydrosolubles est soumise à l'hydrolyse de l'amidon et des protéines par respectivement de l' α -amylase pancréatique et de la pronase. cette solution est dialysée pour en éliminer les hydrates de carbone non structuraux et les protéines hydrolysées, chauffée à 95 °C pour en désactiver les enzymes et centrifugée.

II. 1. 3. 4. La méthode de Goff et al. (2001) (Pectines).

Fractionne les pectines en trois catégories : solubles en milieu alcalin, solubles en milieu acide et solubles en milieu neutre.

➤ **Protocole d'extraction :**

- Extraire la fraction des substances, dont les pectines solubles en milieu alcalin, par un traitement à la NaOH 1 M pendant 2 h à 4 °C.
- Faire descendre le pH à 5, de l'acide acétique glacial est ajouté à la solution.
- Filtrée la suspension résultante.
- La fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu acide, est extraite du résidu insoluble au HCl 1 M pendant 24 h à 80 °C.
- Ensuite centrifugée de la suspension résultante.
- La fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu neutre, est extraite du résidu insoluble en ramenant le pH à 7.
- Ensuite centrifugée la suspension résultante.

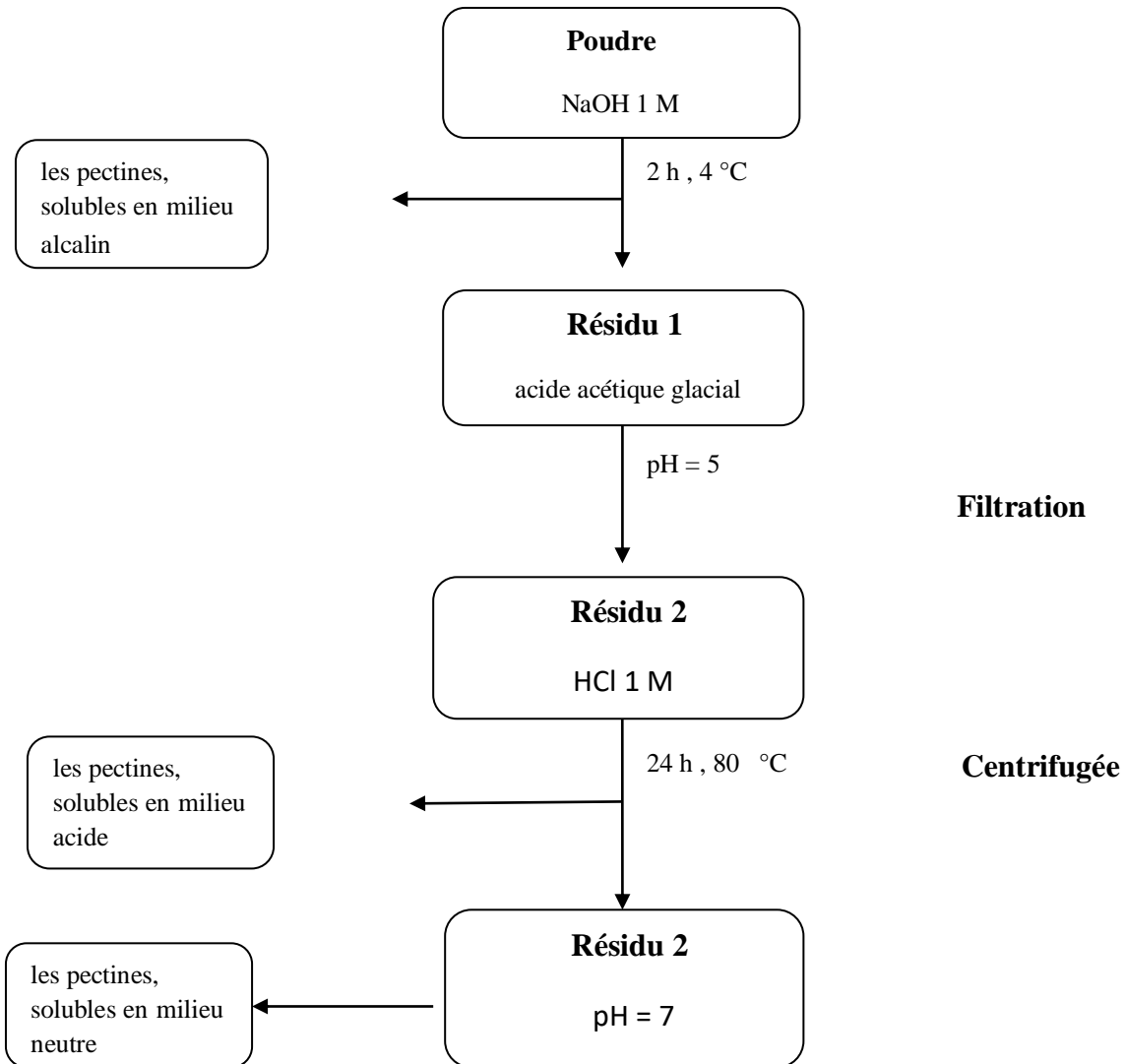


Figure 22 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle des pectine .(Goff et al.2001).

II. 2. Purification et séparation des Polysaccharides.

Les polysaccharides extraits des produits naturels contiennent de nombreuses impuretés, telles que des pigment, des protéines, de la lignine, etc.

Afin d'évaluer et analyser la structure des polysaccharides bruts, certains protocoles sont nécessaires à faire pour séparer ces polysaccharides bruts, donc Le mélange des polysaccharides différents doit être purifié en un seul composant polysaccharidique ayant le même degré de polymérisation et la même conformation spatiale. (Ren & al , 2019)

II. 2. 1. Élimination des protéines :

Les protéines et les polysaccharides sont des biopolymères hydrophiles complexes aux structures diverses. La séparation et la purification des protéines des polysaccharides bruts fait par plusieurs méthodes.

Les méthodes conventionnelles pour ce processus sont:

- la méthode Sevag et la méthode de l'acide trichloroacétique , cependant, la méthode Sevag est compliquée et prend beaucoup de temps.
- l'addition des microorganismes pour la sécrétion de protéase est également utilisée.

Remarque: la combinaison Sevag-enzyme pourrait réduire efficacement la perte de polysaccharides.

- Les protéines peuvent être éliminées à l'eau froide ou chaude L'inconvénient de ce traitement est alors le risque de solubiliser une partie des hémicelluloses. (Moine , 2005 ; Ren & al , 2019).

II. 2. 2. Délignification :

Toutes les méthodes de délignification sont des réactions d'oxydation permettant l'entraînement de la lignine, utilisant des agents électrophiles, car ils peuvent oxyder à la fois.

les structures phénoliques et non phénoliques de la lignine. Les oxydants utilisés classiquement sont le chlorite de sodium en milieu acide ou le chlore. (Moine , 2005)

Le protocole classique de délignification, décrit par Adams (1965):

- Utilise une solution aqueuse de chlorite de sodium à pH 4 (tamponnée par de l'acide acétique), à 75°C, durant 3h.
- Deux traitements suffisent pour réduire le taux de lignines, donc le surnageant est éliminé et la procédure est répétée.

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- Ensuite Le résidu est filtré et lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralisation.

Remarque: la délignification implique toujours une certaine perte de la quantité de sucres (<5% par rapport à la quantité totale).

II. 2. 3. Élimination des pigments :

Les composés phénoliques produisent des pigments, qui affectent l'analyse chromatographique et empêchent l'identification précise des polysaccharides par oxydation.

Les polysaccharides bruts d'origine végétale sont plus clairs. Les méthodes de décoloration comprennent généralement la méthode de la résine, la méthode du charbon actif et la méthode d'oxydation du peroxyde d'hydrogène. Plus spécifiquement, une résine échangeuse d'ions ou une résine d'adsorption qui présente les avantages d'un taux élevé de changement de couleur et de compositions de groupes caractéristiques stables après le changement de couleur. (Moine , 2005)

II. 2. 4. Les méthodes chromatographique:

La chromatographie sur colonne est une méthode de purification efficace pour la séparation et la purification des composants naturels, sur la base des propriétés physicochimiques de la substance cible, la phase stationnaire et la phase mobile les plus appropriées sont sélectionnées pour obtenir un rendement élevé de la substance cible, selon le principe de fonctionnement de la phase stationnaire de remplissage, plusieurs technique chromatographique sont utiles pour la purification et la séparation des composantes naturels , parmi ces techniques , on va parler sur deux technique importantes.

II. 2. 4. 1. Chromatographie par perméation de gel (GPC).

Principe :

Cette technique de chromatographie liquide est basée sur la rétention sélective des solutés en fonction de leur volume hydrodynamique (rayon de giration) et leur taille en solution. Les grosses molécules, exclues de la totalité ou d'une partie seulement des pores de la phase stationnaire, migrent plus rapidement que les petites molécules qui peuvent pénétrer dans un plus grand nombre de pores. La phase stationnaire est un solide poreux, dont les pores ont des dimensions voisines de celles des espèces à séparer. La phase mobile peut être un solvant organique : on parle alors de chromatographie de perméation de gel GPC. (Audigie & Zonszain , 1991)

Méthode de purification :

Avant la purification, un gel avec de petits vides peut être utilisé pour éliminer les impuretés telles que les petites molécules et les sels inorganiques.

Les gels (par exemple, le gel de dextran, le gel de polyacrylamide et le gel d'agarose) sont couramment utilisés comme phase stationnaire.

dextran, gel de polyacrylamide et gel d'agarose), et l'eau désionisée ou une solution saline diluée sont utilisées comme éluant.

Pour éviter le tailing, la force ionique de l'éluant doit être supérieure à 20 M. Différents gels sont appropriés pour les polysaccharides de différentes masses moléculaires. Par conséquent, la colonne de gel spécifique doit être sélectionnée en fonction de la masse moléculaire relative du polysaccharide cible. (Ren & al , 2019)

II. 2. 4. 2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) :

Cette technique de chromatographie liquide est basée sur la rétention sélective des Solutés en fonction de leur taille en solution. Les grosses molécules, exclues de la totalité ou d'une partie seulement des pores de la phase stationnaire, migrent plus rapidement que les petites molécules qui peuvent pénétrer dans un plus grand nombre de pores.

Ce type de chromatographie est plus particulièrement employé dans le domaine des macromolécules, qu'elles soient biologiques ou de synthèse. Cependant, on l'utilise également pour séparer des composés de faible masse moléculaire et permettre ainsi l'analyse exhaustive d'une grande variété d'échantillons, même s'ils contiennent des polymères. (**Pozo , 1993 ; Audigie & Zonszain , 1991**)

Principe :

Le principe de séparation SEC est basé sur la diminution d'entropie d'une macromolécule lorsqu'elle pénètre dans un pore de diamètre comparable à ses propres dimensions. Le nombre de conformations permises pour un polymère flexible diminue fortement à l'approche d'une paroi solide. Pour éviter ces régions de faible entropie, le polymère garde une distance de séparation entre son centre de gravité et l'interface solvant/gel qui est, en moyenne, de l'ordre du rayon hydrodynamique (R_h) de la molécule. Ainsi, les macromolécules pénètrent ou non selon leur taille propre par rapport à la taille des pores. Les plus petites molécules pénètrent plus profondément dans tous les pores comme elles peuvent pénétrer dans les petits pores tandis que les grosses molécules sont exclues des pores dont la taille effective est plus petite que la taille des molécules. Par conséquent, les grosses molécules s'éluent d'abord des colonnes, suivies des molécules de taille moléculaire décroissante. La séparation se fait donc dans l'ordre des tailles décroissantes. (**Audigie & Zonszain , 1991**)

Exemple d'un protocole :

Chromatographie basse pression sur Biogel P2 :

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

Les séparations par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne en basse pression, ont été réalisées sur colonnes de Biogel P2 (100-1800 Da ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm). Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. L'élution se fait grâce à une pompe péristaltique dont le débit est fixé à 15 ml/h, les différentes fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia Biotech.) et contrôlées par CCM (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution d'H₂SO₄ 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 100°C. (Hachem , 2014)

Exemple d'un protocole :

Chromatographie d'exclusion stérique sur Sepharose CL-4B:

Purifié les extraites par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de gel de Sepharose CL-4B (BIORAD - seuil de séparation 1000-6000 Da ; imension de la colonne : Ø 2,5 cm × 50 cm). L'éluant utilisé est le tampon Acétate de sodium 50 mM à pH=5. L'élution se déroule à un débit constant de 15 ml/h grâce à une pompe péristaltique (Pharmacia LKB. Pump P-1). L'élution est suivie grâce à un détecteur UV (BIORAD, ECONO MONITOR) relié à une imprimante BIO RAD Model 1327 ECONO-RECORDÉ. Des fractions de 2 ml sont recueillies en sortie de colonne à l'aide d'un collecteur (Pharmacia LKB-RediFrac). (Hachem , 2014)

III. Les méthodes d'études :

III. 1. Composition monosaccharidique:

En général, les polysaccharides naturels sont composés de différents monosaccharides. La détermination de la composition monosaccharidique d'un polysaccharide a pour prédire la structure centrale de la chaîne principale des polysaccharides et pour étudier les propriétés physico-chimiques des polysaccharides. Nous faisons l'analyse de la composition des monosaccharides à l'aide de diverses méthodes et diverses techniques. la détermination de la composition monosaccharidique sera commencé par une étapes de dosage colorimétriques (ose neutre , ose totaux , acide uroniques, des protéine ... ect), par la suite en utilise les méthodes chromatographique pour le fractionnement de

polysaccharides ,tel que la chromatographie échangeuse d'ion . En fin on soumet ces fraction obtenu à des analyses structurale par usage des techniques spectrales notamment La résonance magnétique nucléaire (RMN) ,(Matrix Assisted Laser Desorption -MALDI –TOF) ... ect.

III. 1. 1. Dosage colorimétrique :

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en oeuvre et rapides, permettent d'estimer de manière globale et rapide les quantités de sucres présents dans un échantillon, et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques.

Dans la présente étude de cette partie, nous allons aborder la méthode de **Dubois (1956)**, qui a été choisie pour le dosage des oses totaux, qui utilise le phénol comme chromogène pour la détermination quantitative des oses (**Seddiki & al , 2017**). Tandis que, le dosage des oses neutres a été réalisé selon la méthode de **Monsigny et al (1988)**, qui utilise le résorcinol comme chromogène (**Boual , 2014**) , plus la méthodes de **Dubois et al.(1956)** , qui utilise le phénol et l'acide sulfurique (se dosage a réalisé dans les mêmes conditions que le dosage des oses totaux). Ainsi que, le dosage des acides uroniques a été réalisé par la methode de **Blumenkrantz et Asboe-Hansen, (1973)** qui utilise le tétraborate de sodium et l'acide sulfurique comme des reactifs. (**Hachem , 2014**)

III. 1. 1. 1. la méthodes de Dubois et al.(1956):

1. 1. a. Dosage des oses neutres (Hachem, 2014):

- Dans des tubes en verre , A 200 µl de solution à doser, on ajoute 200 µl d'une solution aqueuse de phénol à 5%.
- Le mélange est homogénéisé au vortex .
- Introduit rapidement 1ml d'acide sulfurique concentré .
- Homogénéisation, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 minutes .

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes .
- La lecture des densités optiques est réalisée à 480 nm .
- Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de glucose de concentrations 25, 50 et 100 µg/ml.

1.1.1.b. Dosage des oses totaux (Seddiki & al , 2017)

La quantité d'oses totaux constitutifs des polysaccharides est déterminée par la méthode de dosage colorimétrique de Dubois et al. (1956) utilisant le phénol et l'acide sulfurique. Ce dosage se réalise dans les mêmes conditions que le dosage des oses neutre décrit ci-dessus.

III. 1. 1. 2. Dosage des oses neutres (Monsigny *et al.*, 1988) (Boual , 2014):

- Déposer 400 µl de solution à doser ou de l'étalon (le blanc est réalisé à l'eau bi-distillée dans tubes en verre).
- Ajouter 400 µl de solution résorcinol (6 mg/ml d'eau bidistillée).
- Ajouter 2 ml d'H₂SO₄ à 80%.
- Mettre les tubes à l'étuve à 90°C, pendant 30 mn jusqu'à coloration (couleur jaune brun).
- Laisser refroidir à température ambiante pendant 30 mn à l'abri de la lumière.
- Lire l'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm à la spectroscopie UV Visible.

(Boual , 2014)

III.1.1. 3. Dosage des acides uroniques (Blumenkrantz et Asboehansen, 1973).

- Dans des tubes en verre, ajouter 400µl de solution à doser ou de l'étalon.
- Ajouter 2,4ml de solution sulfurique de tétraborate de sodium.

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- Agiter les tubes puis les maintenir 20mn dans un bain-marie à 80°C.
- Après refroidissement dans un bain de glace, ajouter 80µl de solution de MHDP.
- Agiter les tubes puis laisser au repos pendant 10mn.
- Lire l'absorbance à 525nm.

III. 2. Méthodes de fractionnement.

III.2.1. Chromatographie échangeuse d'anions haute performance

(HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD).

La chromatographie d'échange d'anions haute performance combinée à la détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) est une nouvelle technologie utilisée pour analyser les monosaccharides et les oligosaccharides provenant de polysaccharide hydrolysés, ces dernier peuvent être dissociés en anions par élution à un pH > 12, ou sont échangé et distribué sur la résine échangeuse d'anions à haute efficacité et détecté par un détecteur ampérométrique pulsé (DAP) . (**Ren & al , 2019**)

Principe :

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions qui va permettre de séparer les molécules anioniques. Cette phase est constituée de billes de polystyrène et de divinylbenzène de 10 µm de diamètre, sur lesquelles sont agglomérées des particules fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaire (NR₄⁺). Ce type de phase stationnaire peut supporter des pressions de 4 000 psi (275 bars) dans une large gamme de pH (de 0 à 14). (Benaoun , 2017) Les monosaccharides issus d'hydrolysats de polysaccharides (ou de monosaccharides standards) sont transformés dans la phase mobile en alcoolates à des pH supérieurs au pK_a de leurs fonctions hydroxyles (-OH → -O⁻). La phase mobile est constituée d'un gradient d'acétate de sodium et d'hydroxyde de sodium. Lorsque les monomères sont élués de la colonne, ils sont oxydés à la surface d'une électrode en or. L'oxydation génère un courant électrique proportionnel à la concentration en analytes ce qui rend l'analyse quantitative. Le potentiel appliqué à l'électrode, génère des produits d'oxydation qui abîment sa surface. Afin de prévenir la diminution du signal, la surface de

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

l'électrode est nettoyée par l'application d'une série de potentiels pendant des périodes fixées après le potentiel de détection (ampérométrie pulsée). Une gamme d'étalons externes puis l'ajout d'un étalon interne dans l'échantillon à analyser permet d'estimer qualitativement et quantitativement la composition en monosaccharides des hydrolysats de polysaccharides.

Protocoles :

- Les échantillons hydrolysés sont neutralisés par une solution de NH₃ 33%.
- Puis centrifugés à 13000 g pendant 15 min à 4°C.
- Des dilutions (1 mL) à 1/10, 1/100 et 1/1000 de la concentration mère (10 g/L) sont préparées et filtrées sur 0,22 µm.
- Les échantillons peuvent être analysés directement par CEAHP ou congelés à 20°C.
- 25 µL sont injectés sur les colonnes thermostatées à 25°C avec un débit d'éluant de 1 mL/min.
- Avant injection, les colonnes sont équilibrées pendant 15 min avec du NaOH 18 Mm.
- Ensuite les échantillons sont élués isocraquement pendant 30 min avec du NaOH 18 Mm.
- Suivi par un gradient linéaire variant 0 à 1 M d'acétate de sodium dans du NaOH 200 mM pendant 20 min (élution des acides uroniques) .
- Finir par 100% d'acétate de sodium 1M dans du NaOH 200mM pendant 20 min. Le système est ensuite rincé 15 min par du NaOH 200 mM. (Benaoun , 2017)

III. 2. 2. La chromatographie en phase gazeuse CPG :

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse sensible et Polyvalente, à cause de sa haute résolution dans la séparation des mélanges complexes, et sa capacité à coupler à différents détecteurs permet d'apprécier qualitativement et

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

Quantitativement la composition de différents extraits glucidiques. (RUIZ, 2005 ; Boual , 2014)

Principe :

Elle est appliquée pour les substances volatiles. Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N₂). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

Le principe de la détermination de la composition monosaccharidique par CPG repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation , Ensuite, mettez-les monosaccharides libérés sous l'analyse en CPG . Cela se fait selon les protocoles ci-dessous.

➤ Méthanolyse :

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL de méthanol chlorhydrique 1M (Instant methanolic HCl, Alltech) à l'échantillon polysaccharidique anhydre. Après 24h à 80°C dans un tube scellé (SVL), la méthanolyse est stoppée par évaporation de l'hydrolysate sous un flux d'argon.

Cette étape a fait l'objet d'une optimisation pour nos produits. Dans le cadre de cette étude, après refroidissement du tube réactionnel, on neutralise le réactif d'hydrolyse par du carbonate d'argent en excès jusqu'à ce que l'effervescence due au dégagement de CO₂ soit terminée. La phase liquide est séparée du solide blanc (chlorure d'argent) et vert (excès de carbonate d'argent) par filtration sur laine de verre ; elle est alors séchée sous un flux d'argon.

Pour les échantillons de sciures brutes ou résidus d'extraction, la phase méthanolique est délipidée par trois lavages successifs à l'heptane (3 x 1 mL). Elle est à nouveau évaporée sous flux d'argon. (Moine , 2005)

➤ **Triméthysilylation:**

Les méthylglycosides sont ensuite triméthysilylés par 100 µL de BSTFA (N,O-bis(triméthysilyl)-trifluoroacétamide) à 1% de TMCS (triméthylchlorosilane) dans la pyridine (100 µL), à l'obscurité pendant 2h, à température ambiante. Ces échantillons sont alors directement injectés en CPG. (Moine , 2005)

➤ **Analyse des dérivés méthylglycosides O-triméthysilylés en CPG:**

Les méthylglycosides triméthysilylés sont identifiés par CPG, par comparaison avec des échantillons étalons à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR 2100 équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm x 60 m) OPTIMA®-1-Accent 0,25 µM (Macherey-Nagel) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; le gaz vecteur est l'azote sous une pression de 75 kPa. La température de l'injecteur est fixée à 260 °C. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210 °C à raison de 2 °C/min, avec un pallier de 5 min à 190 °C, puis de 210 à 260 °C à raison de 5 °C/min. Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction. (Hachem , 2014)

III. 2. 3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La HPLC est une méthode à haute fréquence permettant de détecter la composition des monosaccharides dans les polysaccharides. Tout d'abord, le polysaccharide est hydrolysé en monosaccharides et les monosaccharides sont ensuite traités chimiquement. ensuite les monosaccharides sont chimiquement aussi dérivés , par exemple : un groupe fluorescent est introduit pour augmenter la sensibilité de la détection. Le réactif dérivé couramment utilisé est le 1-phényl-3-méthyl- 5-pyrazolone (PMP) . (Peters , 2016 ; Ren & al , 2019)

Principe :

La séparation est le passage d'un liquide à haute pression (phase mobile) contenant l'échantillon au travers d'une colonne (phase stationnaire). La polarité de la colonne ainsi que le type de solvants ont un impact sur la séparation des molécules dû à l'environnement chimique de l'ensemble. L'éluant utilisé peut être une combinaison miscible et variée de

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

solvants (eau, alcools, acétonitrile, dichlorométhane, acide acétique...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit gradient ou élution graduée en opposition au mode isocratique, pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse. En sortie de colonne, chaque constituants est révélé par un détecteur. L'instrumentation de l'HPLC se compose de plusieurs éléments: une pompe, un injecteur, une colonne et un détecteur. Pour ce qui est des détecteurs, il en existe notamment deux très utilisés le détecteur à barrette de diode (PDA) et la spectrométrie de masse (SM). Durant ses dernières années, l'utilisation du détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD pour Evaporative Light Scattering Detector) a permis l'analyse de composés non volatiles absorbant ou pas en UV. Le flux de solvant est nébulisé et les gouttelettes formées dans le nébuliseur sont entraînées par le flux de gaz. Les gouttelettes sont alors évaporées pour enlever la phase mobile. Les composés non volatiles présent dans la vapeur de solvant, sont portés par le flux de gaz dans la région de détection. Dans cette zone, un faisceau de lumière croise la vapeur de particules, et la lumière diffusée par les particules est mesurée. (Mounguengui, 2008)

Mode opératoire:

Le système était composé d'un système de distribution de solvant quaternaire, d'un passeur en ligne, d'un échantillonneur automatique, d'un régulateur de température de colonne et d'un détecteur ultraviolet couplé à une station de travail analytique. Les dérivés (échantillons) ont été séparés sur une colonne Agilent Eclipse XDB-C18 (5mm, 250 mm \times 4,6 mm i.d.; Agilent Technologies). La phase mobile était composée de deux éluants (A et B). L'éluant A était un mélange de tampon d'acétate d'ammonium 0,1M et l'éluant B était de l'acétonitrile. Pour le dégazage et la stérilisation, les deux éluants ont été filtrés à travers des filtres à membrane en propylène hydrophile à pores de 0,2 μ m. La phase mobile a été délivrée à un débit de 0,5 mL/min et la température de la colonne a été fixée à 30°C. La séparation chromatographique de plusieurs dérivés et l'étude de la performance quantitative de la procédure ont été réalisées dans des conditions d'élution. Plusieurs conditions de pH, de débit, et de rapport de phase mobile ont été étudiées en comparant la résolution et le temps de rétention des PMPesugars. Les chromatogrammes ont été contrôlés à 245 nm et le volume d'injection de l'échantillon était de 10 μ L. Toutes les expériences ont été réalisées au moins en triplicata. (Bai *et al*, 2015)

III. 3. Analyse structurale.

Beaucoup de procédés sont utilisés pour l'étude de la structure primaire des polysaccharides.

III. 3. 1. Analyse par méthylation.

La méthylation consiste à substituer par des méthoxyles tous les groupes hydroxyles des polysaccharides et des composés organiques. Les méthodes d'analyse de la méthylation comprennent la méthode au sulfate de diméthyle, la méthode Hakomori (1964) et la méthode Ciucanu (1984).

La méthode de référence est celle de Hakomori (1964) qui utilise l'hydrure de sodium et le DMSO pour obtenir la base de méthylation, le méthylsulphinyl carbanion sodium ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-Na}^+$) qui catalyse l'ionisation des groupes hydroxyl nécessaire à la réaction de l'iodure de méthyle, l'agent de méthylation.

La méthodes de Ciucanu (1984) qui ajoute de la soude en poudre et l'iodure de méthyl aux polysaccharides dissous dans le DMSO. Cette dernière méthode donne un minimum de dégradation pour les polysaccharides à acides uroniques, si l'iodure de méthyle est ajouté avant la base. (Solo Kwan, 1992 ; Ren & al , 2019)

III. 3. 1. 1. La méthode de Hakomori (1964).

- Un échantillon de 5 mg environ des extraits est mis en solution dans 1 ml du DMSO et agité pendant 16 h à température ambiante.

- On ajoute ensuite 1 ml d'une solution d'anion diméthylesulfonium préparée au préalable 2.5 g d'hydrure de sodium à 60% dans l'huile sont lavés 3 fois dans l'éther de pétrole, puis 3 fois dans l'éther éthylique de façon à éliminer toute trace d'huile.

- L'éther est évaporé sous un flux d'azote et le solide obtenu est séché dans une étuve à 60°C.

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- L'hydrure de sodium est ensuite dissous dans 25 ml de DMSO puis remis à étuve à 60°C pendant 3 à 4h).

- L'anion fortement basique permet d'ioniser les fonctions alcool portées par le polysaccharide étudié qui est ensuite méthylé par l'ajout progressif d'un volume de 1ml d'iodure de méthyle (ICH₃) sous agitation continue (0.25ml tous les 15min), sous azote et à l'obscurité, Après 2h d'incubation, le mélange réactionnel contenant le dérivé méthylé est dilué dans un volume d'eau distillée, dialysé puis lyophilisé.

- Le résidu lyophilisé est méthylé une deuxième fois selon le même protocole mais en réduisant cette fois-ci les quantités de réactif : 0.75ml de DMSO et 0.5ml d'anion.

- Les dérivés méthylés sont hydrolysés à l'aide de 0.8ml d'acide formique à 90 % pendant 1h à 100° C, puis concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (en prenant garde de ne pas dépasser 30° C car les produits sont volatils).

- Le produit obtenu est dissous dans 1ml d'acide trifluoroacétique 2N, puis placé à 100°C pendant 3h.

- Cette étape permet d'hydrolyser toutes les liaisons osidiques et s'accompagne d'une déméthylation de la fonction hémiacétal correspondant à l'extrémité réductrice de la chaîne polysaccharidique.

- Les sucres méthylés sont ensuite convertis en alditols acétates.

III. 3. 1. 2. La méthode Ciucanu (1984).

- En ajoutant du diméthylsulfoxyde, de l'hydroxyde de sodium en poudre et de l'iodure de méthyle directement à un échantillon aqueux .

- Après hydrolyse, le groupe hydroxyle du monosaccharide méthylé a été libéré et acétylé.

- Le dérivé méthylique résultant de chaque monosaccharide a été analysé par GC-MS.

- Le plus important dans ce processus est de s'assurer de l'exhaustivité de la méthylation, qui est détectable par spectroscopie infrarouge .

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

- Si le polysaccharide contient de l'acide uronique, une réduction est nécessaire avant la méthylation.

- Actuellement, un processus relativement simple pour évaluer la liaison des monosaccharides par méthylation consiste à méthyler d'abord les polysaccharides, puis à récupérer le produit par dialyse et lyophilisation, hydrolyser avec de l'acide trifluoroacétique, et acétyler après réduction au borohydrure pour produire des monosaccharides partiellement méthylés.

- Dérivés de monosaccharides partiellement méthylés tels que l'acétate aldonique méthylé (PMAA).

- Les dérivés sont ensuite analysés par GC-MS, et les spectres sont comparés à ceux de la base de données spectrales du Carbohydrate Research Centre Spectral Database-PMAA pour déterminer la composition et la connectivité .

III. 3. 2. Hydrolyse enzymatique.

Après avoir déterminé la composition des monosaccharides et les positions de fixation d'un polysaccharide sont déterminées, une hydrolyse enzymatique est effectuée à l'aide d'une enzyme appropriée. Cette méthodes est plus efficaces celles qui font appel aux enzymes spécifiques qui vont permettre l'obtention d'unités de répétition plus facilement analysables.

Des enzymatique spécifique de nature microorganismes notamment les bactéries et les champignons, sont effectuée pour générer des petits fragments. Généralement ces enzymes Ils ont une activité endo- et exoenzymes qui non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales. (Moine , 2005 ; Ren & al , 2019)

III. 3. 3. Hydrolyse acide.

L'hydrolyse acide consiste en une réaction chimique utilisant des catalyseurs acides comme l'acide chlorhydrique, sulfurique, phosphorique, nitrique ou formique, les acides chlorhydrique et sulfurique. L'hydrolyse en faisant varier selon la nature et la concentration de l'acide, la durée et la température de la réaction d'hydrolyse, pour une même quantité de

Chapitre II : Les méthodes et les techniques d'extraction et caractérisation des polysaccharides

polysaccharide, dans le but de déterminer les conditions optimales de libération d'oligosaccharides de taille intermédiaire. (Moine , 2005)

On note que deux types d'hydrolyse acide existent : l'hydrolyse acide diluée et l'hydrolyse acide concentrée (Negro, 1991).

III. 3. 4. L'autohydrolyse.

C'est une méthode d'hydrolyse douce, catalysée par les fonctions carboxyliques et sulfates portées par les acides uroniques qui entrent dans la composition du polysaccharide, L'autohydrolyse des polysaccharides consiste donc en leur hydrolyse par leurs propres groupements acides. Cette méthode a été développée pour l'étude des polysaccharides sulfatés et de phycocolloïdes anioniques.

La sélectivité de cette réaction d'autohydrolyse est basée sur la différence de stabilité des liaisons glycosidiques mises en jeu, mais elle dépend également de la distribution des groupements acides autour de ces liaisons glycosidiques, catalysant l'hydrolyse, l'autohydrolyse nécessite au préalable de convertir les polysaccharides en leur forme acide par simple passage sur résine échangeuse d'ions. Les protocoles se déroulent ensuite dans des conditions de température et de pression déterminées selon la nature du polysaccharide. Classiquement, les conditions retenues vont de la température ambiante et à pression atmosphérique jusqu'à des températures de 190°C à 13 bars . (Peters , 2016 ; Moine , 2005)

III. 3. 4. les méthodes spectroscopiques.

III.3.4.1.La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

C'est une technique d'analyse permettant de ioniser un échantillon solide préalablement dispersé dans une grande quantité de matrice en l'irradiant par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. Elle permet d'obtenir des informations précises concernant les masses moléculaires des biopolymères polaires. Ces masses peuvent varier de plusieurs centaines à plusieurs centaines de milliers de Da. Le spectre obtenu se caractérise par l'absence totale de fragmentation. A côté de l'ion moléculaire formé on peut observer la présence d'ions porteurs de deux ou trois charges positives. Outre sa grande sensibilité, cette technique permet d'analyser des molécules pures ou en mélange. (Moine , 2005)

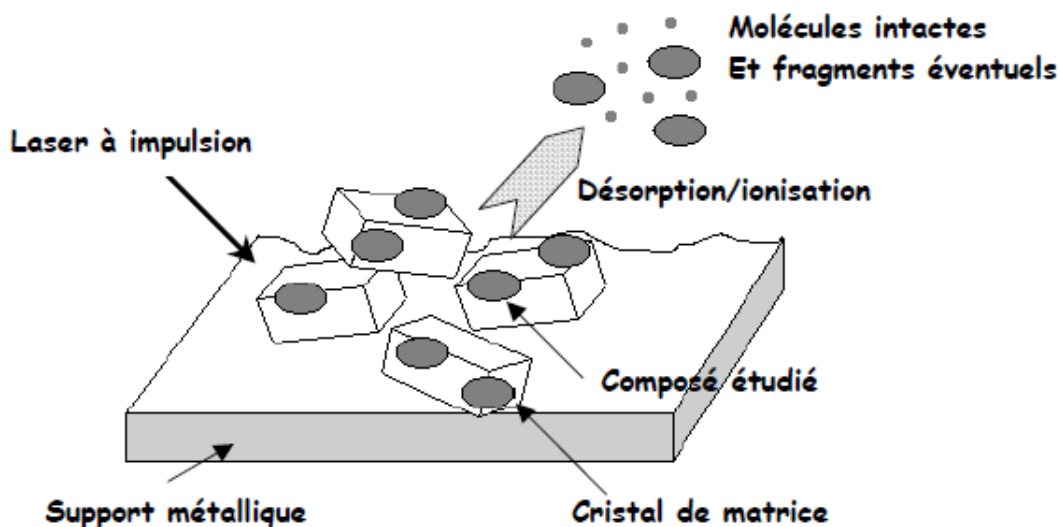


Figure 23: Principe de la technique MALDI (Moine , 2005)

III.3.4. 2. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN

Principe:

La spectroscopie RMN est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation RF et retourneront à leur état initial de moindre niveau d'énergie. L'analyse structurale de polysaccharides peut être réalisée par RMN.

Les spectroscopies ^1H et ^{13}C sont d'ailleurs couramment utilisées pour la détermination des structures primaires et des conformations de glycanes, tel que la composition en monosaccharides, les configurations anomériques, les substituent aglycones, les types de liaisons glycosidiques et les branchements associés. Le carbone et l'hydrogène donnent des signaux spécifiques à des fréquences de résonances très caractéristiques et la forme de chaque signal est spécifique d'un environnement chimique particulier. De manière générale, de nombreux spectres ^1H (empreintes) en ^{13}C sont décrits dans la littérature et peuvent servir de comparaison pour l'évaluation des déplacements chimiques. (Benaoun , 2017)

III. 3. 4. 2. a. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN

¹³C.

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil de caractérisation complémentaire à la spectroscopie IR, qui permet d'avoir une information structurale au niveau moléculaire. Les spectres du RMN ¹³C à l'état solide avec polarisation croisée (CP) et rotation à l'angle magique (MAS) ont été enregistrés à température ambiante (299K), sur un appareil Bruker Avance, fonctionnant à une fréquence de 75,48 MHz. (Kouadri, 2018)

Mode opératoire :

Les échantillons ont été placés dans un rotor MAS en zirconium de 4 mm de diamètre, tournant à une vitesse de 10 kHz. Les spectres ont été enregistrés avec un temps de contact de 1 ms. Les spectres ont été enregistrés avec un temps d'acquisition (AQ) de 15 ms et tous les spectres ont été obtenus avec un temps d'attente entre deux passages de 10 secondes. Les spectres de (CP/MAS) de RMN ¹³C ont été traités avec le logiciel TOPSPIN 3.2.

III. 3. 4. 2. b. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H).

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H) a été utilisée pour caractériser les biopolymères d'origine végétale, isolés ou en interaction avec d'autres macromolécules, au sein de complexes composites. L'objectif de cette étude est de déterminer la nature des atomes présents, leur nombre et leur enchaînement et ainsi de connaître la structure totale d'une molécule organique. (Kouadri, 2018)

Mode opératoire :

Les analyses RMN ¹H du proton ont été réalisées avec un appareil Bruker DRX-300 (ULTRASHIELD). Les spectres sont enregistrés à une fréquence de 300 MHz et à température ambiante et correspondent à une accumulation d'au moins 1600 scans. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, et une solution d'acide sulfurique-d₂ (D₂SO₄/D₂O) utilisée comme solvant. (Kouadri, 2018)

III. 3. 4. 2.c. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN 2D.

De plus, les techniques 2D homo- et hétéronucléaires sont très souvent utiles pour clarifier des assignements de pics (sur des spectres 1D) hasardeux mais aussi affiner la description des liaisons glycosidiques et des motifs de répétition. On peut aussi noter que des méthodes telles que l'ozonolyse, l'hydrogénolyse, les hydrolyses, les dégradations chimiques et d'autres méthodologies de clivage permettent de faciliter significativement l'élucidation structurale de polysaccharides. **(Benaoun , 2017)**

Chapitre III :
Les activités
Biologique et les
applications des
polysaccharides

I. Introduction

Les applications des polysaccharides imprègnent presque toutes les facettes de notre vie, telles que les soins de santé, l'industrie alimentaire et la science des matériaux (**Shaoping et al., 2017**).

Les polysaccharides sont largement présents dans les plantes, les animaux, les micro-organismes et les algues. Ils sont des bio-macromolécules majeures et essentielles avec des activités antioxydants et anti-tumorales ainsi que autres avantages pour la santé (**Shaoping et al., 2017**).

Ils ont des fonctions biologiques importantes dans les activités vitales des voies de signalisation, des connexions cellulaires et de la reconnaissance de molécules dans le système immunitaire de l'hôte (**Shaoping et al. 2017**).

Ainsi grâce à leurs propriétés interactives et régulatrices, les polysaccharides participent au contrôle de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration) mais également de l'activité de nombreuses enzymes (**Abekhti et Ben ahmed, 2019**).

II. Les activités Biologique

Les polysaccharides ne sont pas seulement des ressources énergétiques et/ou structurales, mais jouent également un rôle biologique important dans de nombreuses activités de la vie. De nombreuses bio-activités des polysaccharides sont confirmées in vivo et in vitro, telles que leur rôle comme antidiabétiques, anticancéreux et immunomodulateurs, comme anti-inflammatoires, et dans l'activité hypolipidémique et hypoglycémiant (**Shaoping et al ., 2017**).

II.1. Polysaccharides à activité immuno-modulatrice

L'immunomodulation est défini comme l'action des substances qui sont capables d'interagir avec le système immunitaire par la stimulation ou l'inhibition des divers acteurs, ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutique (**Chouana, 2017**). Les polysaccharides sont considérés comme des antigènes classiques.

II.1.1. Cas des polysaccharides d'*Angelica sinensis*.

Angelica sinensis est une plante médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, les polysaccharides *Angelica sinensis* (Ag) Ont un certain nombre d'activités pharmacologiques, par exemple, une fraction de polysaccharide isolés à partir de racine a un effet immunomodulateur puissant, ce qui facilite la régulation de l'expression des cytokines Th1 et Th2 associées et la croissance des macrophages péritonéaux de souris (**Djabali et al ., 2016**).

Les polysaccharides extraits des racines d'*Angelica sinensis* renferment des polysaccharides acides et neutres. La fraction acide est constituée principalement de 25 % d'acide galacturonique, 0,44 % de mannose, 1% de rhamnose, 10,52% de glucose, 7,52% de galactose et 8,19 % d'arabinose (**Djabali et al ., 2016**).

Par l'induction de l'expression du gène iNOS, les polysaccharides acides stimulent les macrophages à produire l'oxyde nitrique (NO) (effet immunomodulateur).

En outre, l'augmentation de l'activation de l'enzyme lysosomal, et la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12), IL-2, et le pourcentage des cellules TCD4+, avec l'augmentation de la sécrétion de facteur de nécrose tumoral (TNF- α) par les macrophages, grâce à le traitement de ces dernières avec des différentes concentrations des polysaccharides acides (**Djabali et al .,2016**).

D'autre part, le traitement des macrophages avec le polysaccharide acide d'*Angelica sinensis* diminue la sécrétion d'IL-4 et réduit les cellules de TCD8+ (**Djabali et al ., 2016**).

II.1.2. Cas des polysaccharides de *Dendrobium officinale*.

Dendrobium officinale est originaire d'Asie du Sud-est et a été utilisé comme plante médicinale en Chine et dans d'autres pays voisins. Le médicament qui en est extrait est obtenu à partir des cannes lorsqu'elles sont bouillies et transformées en thé. Il existe des capacités de lutte contre le cancer et les antibiotiques qui ont été découvertes, et utilisé aussi pour le traitement de l'hépatite, l'asthme et les troubles immunologiques (**Djabali et al ; 2016**).

L'extrait de polysaccharides de *Dendrobium officinale* forme des effets immunomodulateurs nécessaires sur la réponse immunitaire innée médiées par les lymphocytes de la rate, les cellules NK et les macrophages (**Djabali et al ., 2016**).

II.2. Polysaccharides à activité anti complément.

Le système du complément se définit comme un ensemble de protéines de nature membranaire ou plasmatique présente généralement dans le sang sous leurs formes inactives jouant un rôle primordial dans les mécanismes de défense immunitaire (constituant l'immunité non spécifique du corps). Il intervient dans la défense de l'organisme (facilite la phagocytose et lyse certaines cellules) et Il stimule l'inflammation (Benjamin, 2016).

Il comprend les protéines C1 à C9, les facteurs B, D et P ainsi que quelques protéines régulatrices. La protéine centrale de la cascade d'activation protéique est la protéine C3 et peut être activée de deux façons.

D'une part, elle peut être activée selon la voie classique par la liaison des anticorps aux antigènes puis à la fixation de ce complexe au facteur C1q ce qui entraîne une cascade d'activation protéique. D'autre part, elle peut être activée par la voie alternative par l'interaction des facteurs B à une protéine C3 (Djabali *et al.* , 2016).

II.2.1. Cas des polysaccharides de *Cola cordifolia*.

Cola cordifolia est un grand arbre que l'on trouve dans les savanes d'Afrique de l'Ouest du Sénégal au Mali. La plante est utilisée en médecine traditionnelle au Mali, au Sénégal et en Gambie. L'écorce et les feuilles sont les parties les plus largement utilisées de la plante pour la guérison des blessures, la douleur, la fièvre et la diarrhée (Austarheim *et al.* , 2012).

L'écorce de *cola cordifolia* est traitée avec l'eau chaude pour préparer une décoction, qui contient une variété de faibles poids moléculaire et de poids macromoléculaire des composés (Djabali *et al.* ; 2016).

Les polysaccharides (pectines) extraits de l'écorce de *Cola cordifolia* sont CC1 70%, CC1P1 50%, CC1P2 20%, CC2 20% et CC3 10% (Djabali *et al.* , 2016).

La détermination de capacité du complément pour l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges de mouton sensibilisés par des anticorps de lapin c'est la méthode par laquelle il est mesuré l'activité de fixation du complément humaine. CC1P1 a montré une activité anti-complément très élevée, pour fixé le complément (Djabali *et al.* , 2016).

Les rapports pondéraux pour la composition monosaccharidique de CC1P1 sont trace d'arabinose, 32% de rhamnose, 35% d'acide galacturonique, 2% de galactose et 31% de galactose (Austarheim *et a.* , 2012).

Le CC1P1 est un polymère qui est constitué par une séquence répétitive de avec un poids moléculaire 135 kDa. Il est proposé comme un type relativement uniforme de la pectine inhabituelle à cause de la présence de Gal α -lié (**Austarheim et al ., 2012**).

II.3. Activité antivirale des polysaccharides.

Les maladies infectieuses virales mettent la santé humaine gravement en danger.

Dans la recherche d'efficacité antiviraux médicaments, les chercheurs a découvert que les polysaccharides ont une haute activité antivirale. Les polysaccharides, en tant que composant antiviral efficace avec une faible toxicité, ont un large éventail d'applications médicales (**Abekhti et ben ahmed, 2019**).

II.3.1. Cas des polysaccharides d'*Azadirachta indica*.

Azadirachta indica (neem), a été largement utilisé traditionnellement par la population indienne comme un remède de diverses maladies. C'est une source naturelle important des dérivés pour de nouveaux médicaments antiviraux (**Djabali et al ., 2016**).

Les chercheurs étudient l'activité de deux polysaccharides isolés à partir des feuilles d'*Azadirachta indica* (P1, P2) et leurs dérivés chimiques sulfaté (P1S, P2S) contre le poliovirus de type 1 (PV1) (**Djabali et al ., 2016**).

L'inhibition de la phase initiale de la réplication virale de PV-1 par les polysaccharides obtenus à partir d'*Azadirachta indica*. Après l'expérience et le teste de toutes les concentrations, les chercheurs remarquent que les polysaccharides d'origine ont montré un meilleur effet virucide que leurs dérivés sulfatés (**Abekhti et Ben ahmed, 2019**).

II.4. Activité antioxydant des polysaccharides.

Une définition biologiquement pertinente des antioxydants est « substances synthétiques ou naturelles empêchant ou retardant la dégradation par l'oxygène de l'air lorsqu'elles sont ajoutées aux produits ». Les antioxydants sont généralement des enzymes ou d'autres substances organiques qui peuvent contrecarrer l'influence néfaste de l'oxydation dans les tissus animaux en biochimie et en médecine (**Shaoping et al. 2017**).

II.4.1. Cas des polysaccharides de *Cereus triangularis*.

Cereus triangularis est une plante trouvée à la région Nord de Madagascar (Djabali *et al.* ; 2016).

Les portions de polysaccharides de *Cereus triangularis* cladodes ont des propriétés anti oxydantes (Djabali *et al.* , 2016).

Cladodes: Un cladode est un rameau spécialisé qui a l'apparence et la fonction d'une feuille. Ils contiennent l'arabinogalactane de haut poids moléculaire avec un rapport Ara/Gal de 0.39.

Cette famille d'arabinogalactane pourrait être utilisée comme une nouvelle source d'agents antioxydants naturels pour les industries alimentaires et pharmaceutiques, parce que les analyses RMN a montré que la structure de cet arabinogalactane pourrait être constituée d'une chaîne principale de (4→1) β- D-galactopyranosyle où certaines unités peuvent être ramifiées en position 3 avec les résidus L-arabinofuranosyle, et les résultats indiquent que cette forme de mucilage de *cladodes de Cereus triangularis* a des activités antioxydants (Djabali *et al.* , 2016).

Il y a méthodes ont été mises en place pour évaluer son efficacité à piéger des radicaux différents, comme la méthode utilisant le radical libre DPPH des polysaccharides antioxydants (diphényl-picrylhydrazyle) (Abekhti et Ben ahmed, 2019). Et cet effet de piégeage des radicaux DPPH a été corrélé à leur capacité de donneur d'hydrogène, ainsi que cette activité anti radicalaire de polysaccharides des cladodes de C (Djabali *et al.* ,2016).

II.5. Polysaccharides à activité antimicrobien.

L'inflammation est un processus par lequel le corps humain essaie de contrer les agents nocifs potentiels, y compris les virus, bactéries et autres agents pathogènes envahissants (Shaoping Nie *et al.* ; 2017). Cette réaction est souvent bénéfique, mais elle peut parfois endommager les cellules et les tissus (Abekhti et Ben ahmed, 2019).

Les macrophages sont importants dans l'initiation, le maintien et la résolution de l'inflammation, et ils ont trois fonctions principales dans l'inflammation : l'immunomodulation, phagocytose et présentation antigénique (Shaoping *et al.* , 2017).

II.5.1. Cas des polysaccharides des *Astragales*.

La médecine traditionnelle chinoise utilise l'*Astragale* comme un traitement pour des néphrites, du diabète, et du cancer de l'utérus. Parmi les constituants actifs déclarés comprennent les polysaccharides (et notamment les galactomannanes) (Chouana, 2017).

Li *et al* (2007) ont noté l'effet anti-inflammatoire chez les rats Wistar mâles en réponse à la glomérulonéphrite induite par l'albumine sérique bovine (C-BSA). La glomérulonéphrite est une affection rénale progressive touchant les glomérules du rein.

Lorsque les glomérules rénaux sont enflammés on assiste à une accumulation de liquide et de toxines dans l'organisme (Chouana, 2017).

La glomérulonéphrite peut entraîner une insuffisance rénale chronique (**Chouana, 2017**).

L'effet de l'APS sur la glomérulonéphrite a été évalué par cytométrie de flux en utilisant le facteur de transcription nucléaire- κ B (NF- κ B) comme marqueur (**Li *et al.*, 2007**).

IL-2, l'IL-6 et le TNF- α ont été déterminés par la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Le C-BSA augmente les niveaux de toutes les cytokines et diminue les concentrations plasmatiques d'IL-2, IL-6 et TNF- α . Pendant ce temps, l'APS a considérablement réduit la protéinurie et les changements morphologiques induits par le C-BSA, indiquant que l'APS pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour la glomérulonéphrite, et pour l'arthrite (**Li *et al.*, 2007**).

Le traitement avec l'APS peut réduire l'accumulation cellulaire, le gonflement des articulations et les concentrations sériques de TNF-1 et IL-1 de manière dépendante chez les rats atteints d'arthrite. L'APS a également montré des effets thérapeutiques dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes. Ainsi que l'APS possède un effet inhibiteur sur l'inflammation induite par les LPS bactériens et du palmitate (**Chouana, 2017**).

II.6. Polysaccharides à activité gastroprotective.

Un déséquilibre entre les facteurs agressifs et défensifs, ou trop d'acide et de pepsine, endommage la muqueuse de l'estomac et provoque des ulcères, en plus d'autres causes. Ce qui rend la muqueuse de l'estomac sensible même au niveau normal d'acide gastrique (Baggio *et al.*, 2014).

Un ulcère gastroduodéal de l'estomac est appelé ulcère gastrique, du duodénum, un ulcère duodéal; et de l'œsophage. Les ulcères surviennent lorsque la paroi de ces organes est corrodée par les sucs digestifs acides sécrétés par les cellules de l'estomac. L'ulcère gastroduodéal est courant et touche des millions de personnes Chaque année (Baggio *et al.* , 2014).

II.6.1. Cas des polysaccharides de *Chenopodium quinoa*.

Quinoa est une pseudocéréale D'origine andine d'Amérique de sud, et elle a un intérêt croissant en raison de sa qualité nutritionnelle supérieure et de ne pas avoir de gluten. Ainsi, le *quinoa* est un ingrédient de remplacement dans le régime sans gluten et peut être utilisé par des personnes qui souffrent de la maladie cœliaque (Djabali *et al.* ; 2016).

Les polysaccharides des parois cellulaires de graines de *quinoa* ont été étudiés. Ils ont été extraits successivement avec de l'eau et avec une solution aqueuse 10% de KOH (Baggio *et al.* , 2014).

Ce polysaccharide est composé d'un arabinane. Cette arabinan α (1 \rightarrow 5) lié avec L-arabinofuranosyl (Baggio *et al.* , 2014).

Un groupe de ces polysaccharides (arabinane et polysaccharides pectiques arabinane riche) a montré une activité gastroprotectrice sur les lésions gastriques aiguës induites par l'éthanol chez le rat (Baggio *et al.* , 2014).

Le polysaccharide probablement interfère avec le mécanisme ulcérogène dan le cas des ulcères gastriques induits par l'éthanol absolu, donc il montrant une propriété cytoprotectrice (Baggio *et al.* ; 2014).

La protection de la muqueuse gastrique pourrait être due à la capacité du polysaccharide à augmenter la synthèse du mucus et/ou sa capacité à se lier à la muqueuse de surface et à exercer une couche protectrice. De plus, la barrière muqueuse est un facteur de protection important de la muqueuse gastrique contre les attaques aiguës, empêchant la pénétration de l'agent nécrosant (Baggio *et al.* , 2014).

III. Les applications des polysaccharides.

Selon Hachem (2014), la biomasse représente une importante source renouvelable de polymères qui peuvent être utilisés de diverses manières. L'utilisation de ces ressources reste très faible par rapport aux produits de l'industrie pétrolière. La cellulose, l'amidon,

l'hémicellulose et la pectine restent les principaux polysaccharides d'origine végétale utilisés dans divers secteurs tels que les industries alimentaires et pharmaceutiques.

III.1. Applications industrielles.

Avec la demande mondiale croissante en matière plastique, l'épuisement des ressources pétrolières, et les préoccupations environnementales, les matières plastiques biodégradables se positionnent parmi les meilleures alternatives. Les polysaccharides, en particulier les xylanes peuvent être utilisés comme substrats de base pour l'élaboration de films plastiques potentiellement biodégradables d'origine végétale (**Hachem, 2014**).

Dans le domaine de la vie quotidienne, le secteur de l'emballage est un autre créneau important pour le marché des polymères biodégradables.

Ces derniers apportent une solution aux problèmes de déchets, protection des produits, et ils offrent aux emballages d'autres fonctions grâce à leurs propriétés intrinsèques. Par exemple, leur perméabilité à la vapeur d'eau intéressante pour emballer les produits frais comme les fruits et les légumes (**Rabetafika et al ., 2006**).

Les polymères à base d'amidon et les polymères à base de cellulose, permettent de couvrir une large gamme d'applications dans le secteur emballage. Ces biopolymères connaissent actuellement un développement industriel pour la fabrication des emballages (**Rabetafika et al ., 2006**).

III.1. 1. Films barrières :

Les nanomatériaux cellulosiques sont constitués de microfibrilles, seules ou liées en groupes. Elles peuvent avoir une utilisation potentielle dans divers types de films barrières.

Il est clair que de telles applications intéressent les industries des produits papetiers et de l'emballage. Ainsi que la fabrication de films comestibles qui peuvent agir comme une couche protectrice sur la nourriture elle-même. (**Hubbe et al., 2008**)

III.1. 2. Gabarit pour les céramiques avec des nano-pores uniformes :

Un type étrange de nanocomposite peut se produire lorsque des nano-cristaux cellulosiques sont incorporés dans le mélange dans la préparation d'une céramique. (**Hubbe et al., 2008**)

III.1. 3. Application optique OLED :

L'utilisation de nanocomposites cellulosiques destinés aux substrats OLED, l'extraction de nano-fibres uniformes de 15 nm de largeur à partir de poudre de bois a été obtenue par traitement de broyage.

Avec le module d'élasticité de la résine matricielle, puis évalué l'application potentielle de ces échantillons dans des substrats d'affichage. (Okahisa et al., 2009)



Figure 24: OLED, the organic light-emitting diode. (Okahisa et al., 2009)

III.2. Applications alimentaires et nutritionnelles.

Les fibres alimentaires sont des polysaccharides qui restent intacts lors de la digestion, c'est-à-dire ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines, mais peuvent faciliter le transit intestinal ou avoir des effets bénéfiques sur la santé (Kuate Kanga, 2019).

De plus, leur apport réduit considérablement l'accumulation des lipides dans le foie et le taux de cholestérol dans le sang (Hachem, 2014).

Les hémicellulose tous comme les pectines, sont utilisées comme additifs alimentaires, épaississants, émulsifiants, agent gélifiants, adhésifs et adsorbants (Hachem, 2014).

III.3. Applications pharmaceutiques.

Les pectines forment des suspensions visqueuses, grâce à leur capacité à se dissoudre dans l'eau. En conséquence, elles ralenties le taux d'absorption intestinale de nombreux nutriments, y compris des oses (Hachem, 2014).

La cellulose et l'hémicellulose sont des fibres insolubles qui jouent un rôle dans la protection, et la stimulation de la fonction normale du côlon et la réduction du risque de cancer du côlon (Hachem, 2014).

Les xylanes suscitent un intérêt croissant dans ce domaine. Ils ont des propriétés et des activités biologiques divers tels que : anti-oxydantes, gastro-protectives... (Hachem, 2014).

III.3. Applications médicales :

Dong et Roman, (2007) ont préparé des nano-cristaux de celluloses fluorescentes à utiliser comme indicateurs en nano-médecine.

Plusieurs chercheurs ont évoqué l'utilisation de nano-éléments cellulosiques comme échafaudages sur lesquels les tissus ou les os peuvent se développer plus facilement.

De plus, la communauté biomédicale a commencé à exploiter les qualités hydrophiles de la cellulose pour développer des hydrogels. Les hydrogels se sont avérés être des matériaux appropriés pour soutenir les applications médicales et pharmaceutiques telles que l'administration de médicaments, les échafaudages tissulaires, les actionneurs/capteurs et les valves. (**Hubbe et al., 2008**)

Conclusion

Les polysaccharides appartiennent à l'une des biomacromolécules importantes riches en ressources naturelles, avec une structure complexe et diverses activités fonctionnelles. Dans la paroi végétale la présence de ces macromolécules comme des constituants majeure dans celle ci, rend la paroi hydrosoluble et gélifiante. Ces deux propriété chimique et mécanique à la foi, grâce une complexité structurale former par ces biomolécules. Des liens criés entre les microfibrilles cristallines cellulosiques et les hémicelluloses grâce des liaisons non-cavalent, d'autre lien de la même nature crié aussi entre les hémicelluloses et la pectine, avec un établissement de la lignine dans la paroi secondaire. Tout ces actions contribue a la création de ce réseaux rigide qui couverte la cellule végétale.

Dans les dernières années les scientifiques et les chercheurs sont bien intéressé par les polysaccharides grâce à leur importance comme source biodégradable et renouvelable, dans ce cadre de nombreuses études intéressantes ont été faites de la pare des chercheurs et les scientifique. Où les méthodes d'études sont bien détaillées et ils incluent, des protocoles et des opérations physique, chimique concernant les technique d'extraction comme une premier phase fractionnelle qui nous permettre à ciblée et sélectionnée le polysaccharide qui nous intéresse à caractérisée dans notre étude. D'autre pare des techniques chromatographique, spectroscopique et des méthodes de dosage colorimétrique sont mis, pour la détermination de composition et l'analyse structurale de la molécule extraite.

Finalement, de nombreuses activités vitales des polysaccharides des végétaux supérieures, il a été confirmé *in vivo et in vitro*, car son rôle antidiabétique, médicaments anticancéreux et immunomodulateurs, anti-inflammatoires, hypolipémiants et hypoglycémiant. Activité hypolipidémique et hypoglycémiant. Autrement, ces polysaccharides représentent une biomasse importante comme source biodégradable et renouvelable et diversement valorisés, exploités dans des secteurs variés tels que les industries alimentaires et nutritionnelles ou médicale et pharmaceutique.

Conclusion

La liste des références

- 1- Audigie, C. & Zonszain, F. (1991). *Biochimie structurale*. Doin éditeur paris.
- 2- Abekhti Ch. Ben Ahmed R. (2019). *Activités biologiques des polysaccharides hydrosolubles de deux plantes spontanées dusahara algérien*. Mémoire. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED, Algérie.
- 3- Astarheim I. Mahamane H. Sanogo R. Togola A. Khaledabadi M. Vestrheim A. Inngjerdingen K. Michaelsen T. Diallo D. Paulsen B. (2012). *Anti-ulcer polysaccharide from Cola cordifolia bark and leaves*. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 221–227.
- 4- Baggio C.H, Daniele Maria-Ferreira, Luisa Mota da Silva, Daniel Augusto Gasparin BuenoMendes, Daniela de Ameida Cabrini, Adamara Machado Nascimento, Marcello Iacomini, Thales Ricardo Cipriani Adair Roberto Soares Santos, MariaFernanda de Paula Werner, 2013 *Rhamnogalacturonanfrom Acmeilla oleracea (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcéra Healing Propretés in Rats*. *Journal. One vol (9):1-8*.
- 5- Boual, Z. 2014. *Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa Sahara Septentrional Est algérienne : Activité biologique*. Thèse de doctorat. Université kasdi merbah Ouargla, Algérie. p159
- 6- Benaoun, F. 2017. *Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de Plantago notata Lagasca (Plantaginaceae) et Urginea noctiflora Batt. Trab Liliaceae*. Doctoral dissertation, Clermont Auvergne.
- 7- Boudraa, I., & Benali, S. E. (2017). *Etude comparative entre deux méthodes d'extraction de la pectine de l'écorce de deux variétés d'orange (Thomson et Sanguine)*. Mémoire de fin de cycle, Université de Jijel, Algérie. p59

La liste des références

- 8- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- 9- Benaoun, F. 2017. *Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de Plantago notata Lagasca (Plantaginaceae) et Urginea noctiflora Batt. Trab (Liliaceae)*. Doctoral dissertation, Clermont Auvergne.
- 10- Bahrani, S. A. (2012). *Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques: Contribution à l'étude des transferts couplés chaleur-masse*. Doctoral dissertation, Université de La Rochelle.
- 11- Buléon, A., Colonna, P. & Leloup, V. 1990 Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *IAA*. juin 1990, 515–532.
- 12- Cutillas-Iturralde A., Peña M., Zarra I. & Lorences E., 1998. Xyloglucan from persimmon fruit cell walls. *Phytochemistry*, 48(4), 607-610.
- 13- Chouana T. (2017). *Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'Astragalus gombo bunge*. Thèse. l'Université Kasdi Merbah d'Ouargla, algérie.
- 14- DELESCAILLE, M. C. (2005). *Clonage et séquençage de protéines pariétales de Cichorium intybus par criblage immunologique d'une banque d'expression ZAP*. Mémoire . University de Namur. Bruxelles
- 15- Djabali I. Ababsa H. Kaibi F. Les activités biologiques des Polysaccharides. Mémoire. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.
- 16- Fonty, G., & Forano, É. 1999. Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers Agricultures*, 8(1), 21-35.
- 17- Godin, B., Agneessens, R., Gofflot, S., Lamaudière, S., Sinnaeve, G., Gerin, P. A., & Delcarte, J. (2011). les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Base*. Revue bibliographique sur. Belgique. 165-182

La liste des références

- 18- Giger, S. (1985). Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. In *Annales de zootechnie* .Vol. 34, No. 1, pp. 85-122.
- 19- Hakomori S., 1964. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *Journal of Biochemistry* 55: 205-208.
- 20- Hijazi, M. 2011. *Caractérisation structurale et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez Arabidopsis thaliana* .Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- 21- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- 22- Hubbe M.A., Rojas, Lucia, L.A. et Sain M. (2008). "Cellulosic nanocomposites: A review". *Bioresources*. Vol. 3, no. 3, p. 929-980.
- 23- Izydorczyk M., Macri L. & MacGregor A., 1998. Structure and physiochemical properties of barley non-starch polysaccharides - II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydr. Polym*, 35, 259-269. Jung H. J., 1997.
- 24- Irshad, M. 2008. *Dynamique des protéines pariétales au cours de l'élongation cellulaire dans des hypocotyles étiolés d'Arabidopsis thaliana: approches protéomique et transcriptomique* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- 25- Hachem, K (2014). *Extraction, dosage, analyse biochimique et structurale des polysaccharides pariétaux de l'Arganier Argania spinosa (L). Valorisation dans la biosorption du Plomb et du Cadmium*. Doctoral dissertation, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran.
- 26- Kar, F., &Arslan, N. (1999).Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate polymers*, 40(4), 277-284.

La liste des références

- 27- Kouadri, I. 2018. Recherche de polysaccharide valorisable dans la biomasse végétale : optimisation des procédés d'extraction et caractérisation physico-chimique. Thèse de doctorat. Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie. Français .p131
- 28- Kuate Kanga, B. (2019). Caractérisation et formulation de nouveaux ingrédients alimentaires à base de complexes de protéines végétales et de polysaccharides.
- 29- Le Goff A., Renard C., Bonnin E. & Thibault J.-F., 2001. Extraction, purification and chemical characterisation xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydr. Polym.*, 45, 325-334
- 30- Li S., Zhang Y., Zhao J. Jan (2007). Preparation and Suppressive Effect of Astragalus Polysaccharide in Glomerulonephritis Rats. *International Immunopharmacology*, volume 7, no. 1, pp. 23–28.
- 31- Moine, C. (2005). *Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hemicelluloses du bois: Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes* Doctoral dissertation, Limoges.
- 32- MONSIGNY M., PETIT C. et ROCHE A. C., 1988- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. *Analytical biochemistry*, vol. 175: 525-530.
- 33- Nie, S., Cui, S. W., & Xie, M. (2017). Bioactive polysaccharides.
- 34- Nguyen-Kim, H. (2015). *Recherche de la fonction de protéines riches en hydroxyproline dans les parois végétales* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- 35- Okahisa, Y., Yoshida, A., Miyaguehi, S. et Yano, H. (2009). "Optically transparent wood-cellulose nanocomposite as a base substrate for flexible organic light emitting diode displays". *Composite Sei. Teehnol.* Vol. 69, no. 11-12, p. 1958-1961.
- 36- Pozo, C. (1993). Application de la chromatographie d'exclusion stérique a la séparation de produits de dégradation du solvant du retraitement des

La liste des références

- combustibles nucléaires. RAPPORT CEA-R-5647, Centre d'Etudes de Fontenay-aux-Roses. France.
- 37- Petera, B. (2016). *Extraction et caractérisations (structurale et physico-chimique) de polysaccharides hydrosolubles issus de cladoces de Cereus triangularis*. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II. Français. P142.
- 38- Peng, C.C.; Kong, J.; You, L.J.; Ma, F.L. Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of lentinan polysaccharides by response surface methodology and its antioxidant activity. *Mod. Food Sci. Technol.* 2011, 27, 452–456.
- 39- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1), 109-121.
- 40- Petera, B. (2016). *Extraction et caractérisations (structurale et physico-chimique) de polysaccharides hydrosolubles issus de cladoces de Cereus triangularis* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- 41- Rezzoug, S. A., Maache-Rezzoug, Z., & Allaf, K. (2007, Octobre). Etude de la disponibilité de la pectine extraite à partir d'écorces d'oranges suite à un prétraitement thermomécanique. In 11ème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés-SFGP 2007, Vol. 96.
- 42- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W., & Del Rio Flores, A. (2019). The preparation and structure analysis methods of natural polysaccharides of plants and fungi: A review of recent development. *Molecules*, 24(17), 3122.
- 43- RUIZ G., 2005- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 36-38.
- 44- Roig, F. (2011). *Transitions et dynamique relaxationnelle de polymères issus de la paroi végétale* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- 45- Rennie, E. A., & Scheller, H. V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 26, 100-107.
- 46- Rouabah, K. et Boulkandoul, B. (2015). Des polysaccharides extraits des végétaux et le système immunitaire. mémoire du Diplôme de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, algérie.

La liste des références

- 47- Rabetafika, H. N., Paquot, M., & Dubois, P. (2006). Les polymeres issus du vegetal: materiaux a proprietes specifiques pour des applications cibles en industrie plastique. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(3), 185-196.
- 48- Seddiki, M. & Boual, Z. & Philippe Michaud, P. 21et 22 Novembre 2017, Séminaire International Polysaccharides de plantes de milieux arides (POLYSAC 2017) EXTRACTION ET CARACTÉRISATION PARTIELLE DES POLYSACCHARIDES HYDROSOLUBLES DE FEUILLES DE L'ESPÈCE . Ouargla. February 2020. P 44-52.
- 49- Solo Kwan, J. (1992). *Caractérisation structurale des glucides extracellulaires produits par la suspension cellulaire de silène (silène alba (Miller) EHL Krause)* (Doctoral dissertation, Lille 1).
- 50- Sun R., Lawther M. & Banks W., 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Ind. Crops Prod.*, 4, 127-145.
- 51- Voet, D. (2005). *Biochimie/D. traduction de la 3e édition américaine par Guy Rousseau et Lionel Domenjoud.* P366
- 52- Vannucci L, Krizan J, Sima P, Stakheev D, Caja F, Rajsiglova L, Horak V, Saieh M 2013 .Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans. *Int J Oncol* 43: 357-364
- 53- Wertz, J. L. 2010. La lignine. *Rapport de synthèse, Document ValBiom-Gembloux AgroBio Tech Novembre 2010.*
- 54- Yamada, H. (1996). Contribution of pectins on health care. *Progress in Biotechnology*, 14, 173-190.
- 55- Negro, M. (1991). *Degradacion Enzimatica de la Biomasa de Onopordum nervosum bois.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.

La liste des références

Résumé

Résumé

La paroi des cellules végétales est considérée aujourd'hui comme un organe à part entière, de structure complexe variant en fonction des espèces, de l'âge et des tissus. Elle est composée de polymères dont la structure et d'autant plus les voies de biosynthèse sont parmi les plus complexes connues dans la nature. De par sa position, la paroi fait le lien entre le milieu extérieur et le plasmalemme. C'est une structure rigide micro fibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation vont lui conférer son aspect dynamique et rigide. En effet, elle doit être « modelable » au rythme de la croissance chez les cellules jeunes, tout en restant « ferme » afin d'assurer son rôle de barrière protectrice et permettre la cohésion des cellules. Elle doit s'opposer aux chocs osmotiques, à la dessiccation, aux rayons ultraviolets tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire. Ces exigences à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi cellulaire végétale.

C'est pourquoi nous souhaitons que ce travail constitue une référence académique sur les polysaccharides des végétaux supérieurs. D'une part de fournir les connaissances de base et les méthodologies utilisées pour étudier ces bio-polymères, d'autre part de mettre l'accent sur la compréhension de leurs structures et d'apporter des exemples détaillés pour illustrer leurs techniques de caractérisation ainsi que leurs différentes activités biologiques.

Mots clés : Polysaccharides, extraction, caractérisation, structure, activités biologiques.

Résumé

SUMMARY

The plant cell wall is now considered to be an organelle in its own right, with a complex structure that varies according to species, age and tissue. It is composed of polymers whose structure and biosynthetic pathways are among the most complex known in nature. Because of its position, the wall is the link between the external environment and the plasmalemma. It is a rigid micro-fibrillar structure coated with a hydrosoluble and gelifying matrix. Different levels of organisation give it its dynamic and rigid appearance. In fact, it must be 'mouldable' at the rate of growth in young cells, while remaining 'firm' in order to ensure its role as a protective barrier and allow the cohesion of cells. It must resist osmotic shocks, desiccation and ultraviolet rays while allowing intercellular exchanges and the passage of substances necessary for cell metabolism. These requirements, which are both antagonistic and complementary, are at the origin of the complexity of the plant cell wall.

This is why we hope that this work will constitute an academic reference on the polysaccharides of higher plants. On the one hand, to provide the basic knowledge and methodologies used to study these bio-polymers, on the other hand to focus on the understanding of their structures and to provide detailed examples to illustrate their characterization techniques as well as their different biological activities.

Key words: Polysaccharides, extraction, characterisation, structure, biological activities.

الملخص

يُعتبر جدار الخلية النباتية الآن عضوية ، ذو بنية معقدة تختلف باختلاف النوع و العمر و الأنسجة. وهي تتكون من متعددات التراكيب الكيميائية ذات البنية و التركيبية الحيوية من بين أعقد التراكيب في الطبيعة. و من جهة تموقعها فإن هذه العضية تعتبر بمثابة الوسيط بين الوسط الخارجي و البلازما . وهي عبارة عن بنية صلبة ليفية دقيقة مغلقة بواسطة مصفوفة هلامية قابلة للذوبان في الماء . في الواقع ، يجب أن تكون "قابلة للتشكل و إعادة التشكل " لمجابهة معدل النمو في الخلايا الفتية ، بينما تظل "ثابتة" من أجل ضمان دورها كحاجز وقائي والسماح بتماسك الخلايا. كما أنها تتمتع بخصائص اعتراض الصدمات التناضحية والجفاف والأشعة فوق البنفسجية مع السماح بالتبادل بين الخلايا ومرور المواد اللازمة لعملية الأيض الغذائي للخلايا. هذه المتطلبات ، المتضادة والمتكاملة ، هي أصل تعقيد جدار الخلية النباتية.

هذا هو السبب في سعينا بأن يكون هذا العمل مرجعًا أكاديميًا حول متعدد السكريات لدى النباتات ، من ناحية توفير المعرفة الأساسية والمنهجيات المستخدمة لدراسة هذه التراكيب الكيميائية الحيوية المتعددة ، و من ناحية أخرى للتركيز على فهم هياكلها وتقديم أمثلة مفصلة لتوضيح تقنيات توصيفها وكذلك استغلال أنشطتها البيولوجية المختلفة.

الكلمات المفتاحية: متعدد السكريات ، الاستخلاص ، التوصيف ، البنية ، الأنشطة البيولوجية.