



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et santé*

Intitulé :

Extraction et caractérisation partielle des lectines de *Ricinus communis*

Présenté et soutenu par : SAOULA BESMA

Le : 28-06-2016

AFIF RADIA

Jury d'évaluation :

Président du jury : KHELIFI D.

(Pr- UFM Constantine)

Rapporteur : ZITOUNI A.

(Mc- UFM Constantine)

Examineur : NECIB Y.

(Pr- UFM Constantine)

Année universitaire

2015 – 2016

Remerciements

Nos remerciements vont d'abord à Dieu pour nous avoir donné la force et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Monsieur **ZITOUNI .A** Maitre de conférence au département de Biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire de l' Université des Frères Mentouri de Constantine pour avoir dirigé ce travail, pour toute la compréhension qu'il a montré, la disponibilité et la patience dont il a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, pour sa générosité scientifique ,pour sa gentillesse, ses conseils précieux et les encouragements qu'il nous a prodigué tout au long de ce mémoire.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions Monsieur **KHELIFI .D** Professeur à l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi au membre de notre jury de mémoire, Monsieur **NECIB.Y** professeur au département de Biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université des Frères Mentouri de Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez participé au jury de ce mémoire.*

Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tous ceux qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

MERCI



Dédicace

Dieu tout Puissant merci pour le pouvoir et le courage que vous m'a donné pour compléter ce travail.

A mon père :

J'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension et soutien. Tes prières et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Trouve à travers ce modeste travail, récompense de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.

A ma mère :

Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit. C'est toi qui disais qu'on ne remercie pas ses parents. Seulement, je ne trouve pas aujourd'hui un moyen d'éviter de te remercier pour tout ce que tu as fait pour nous. Ton souci Primordial a toujours été la réussite de tes enfants. Que tes sacrifices, des peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Ce travail est également le fruit de ton amour, tes bénédictions et surtout ta bonne éducation.

A mes chers frères : Amina, Khadîdja, Ali.

A mon petit cousin : Mostapha.

A mon adorable cousine : Chahrazed.

Sans oublier ma grand-mère pour se précieuse prières.

A mes amis (es), particulièrement : Amira, Asma, Radia, Romaiassa, Assia, Kawther, Manel, Iméne, Raouf, samir, Oussama, Zaki, Mohamed, Fares,

Et enfin à mon encadreur monsieur « Abdelbaki Zitouni » qui a toujours été là pour nous.

Et à ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

A vous tous merci.

Saoula Besma

Dédicace

*Je remercie tout d'abord **Allah** qui m'a donné la santé et le courage pour terminer ce mémoire.*

A ma très chère mère Halima

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mon père Ahmed

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon étude.

***A mon marie plus chère de mon cœur Rezki**
qui m'a beaucoup soutenu et supporté.*

A mes frères et sœurs

Hamoudi, Chabane, Badrdine, Hanane, Nadia, Hayet.

A mon petit cousin : Abd El Moumin

A toute ma famille.

A mes amis (es)

Loubna, Dounia, Besma, Nour, Safia.

*Et enfin à mon encadreur monsieur « **Abdelbaki Zitouni** » a toujours été là pour nous.*

A vous tous merci.

Afif Radia

Sommaire

Sommaire

Résumé

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Introduction général

Chapitre I : les lectines

I. Généralités sur les lectines.

I.1	Définition.....	1
I.2	Historique.....	1
I.3	Classification des lectines.....	3
I.3.1	Lectines végétales.....	3
I.3.2	Lectines animales	6
I.3.3	Lectines des micro-organismes.....	6
I.4	Structures.....	7
I.4.1	Lectines simples.....	7
I.4.2	Lectines mosaïque.....	8
I.4.3	Assemblages macromoléculaires.....	8
I.4.4	La structure tridimensionnelle.....	8

I.5	Spécificités.....	8
I.6	Les propriétés biologiques des lectines.....	10
I.6.1	Liaison avec les sucres.....	10
I.6.2	L'activités mitogène.....	10
I.6.3	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	11
I.6.4	Actions antivirales.....	11
I.6.5	Autres propriétés.....	11
I.7	L'agglutination des cellules.....	11
I.8	Fonctions de lectines.....	12
I.8.1	Fonctions de lectines chez l'homme.....	12
I.8.2	Fonctions de lectines chez les plantes.....	12
I.9	Utilisation des lectines.....	13
I.9.1	Dans le domaine biomédical.....	13
I.9.2	Dans le domaine agronomique.....	14

Chapitre II : Etude générale sur le ricin

I. Caractéristique botanique de la plante *Ricinus communis*

I.1	Généralités.....	15
I.2	Nomenclature.....	15
I.3	Etymologies.....	15
I.4	Description.....	15
I.5	Localisation.....	17
I.6	structure chimique.....	17
I.7	Classification scientifique.....	18
I.8	Utilisations médicinales.....	19

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériels	21
I.1. Matériel végétale.....	21
I.2. Matériel Biologique.....	21
II. Méthodes	21
II.1 L'extraction des lectines par la solution tampon.....	21
II.2 Dosage des protéines.....	24
II.3 Le Test d'hémagglutination.....	24
II.4 Le teste des limites d'hémagglutination.....	25
II.5 Précipitation au sulfate d'ammonium.....	25
II.6 La Chromatographie sur colonne de Sephadex G10.....	25
II.7 L'effet de pH sur l'hémagglutination.....	26
II.8 L'effet de température sur l'hémagglutination.....	26
II.9 Test d'inhibition d'agglutination par des sucres simples.....	26

Chapitre IV : résultats et discussion

1. Dosage de protéines.....	27
2. Les concentrations des protéines	28
3. Le test d'hémagglutination.....	28
4. Les limites d'hémagglutination.....	31
5. La chromatographie sur colonne de Sephadex G10.....	32

6. Le test d'héماغglutination des fractions.....	35
7. L'effet de pH sur l'héماغglutination.....	38
8. L'effet de la température sur l'héماغglutination.....	40
9. Le test d'inhibition d'héماغglutination par les saccharides.....	41
 Conclusion générale et perspective.....	 45
Références bibliographiques.....	47
 Annexes.....	 56

Résumé

Résumé :

Les lectines sont des glycoprotéines qui peuvent être d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale.

Le but de cette recherche consiste en une caractérisation partielle des lectines extraites à partir des graines de ricin (*Ricinus communis*).

Dans notre étude, nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines en mettant en évidence leur activité hémagglutinante.

Cette activité hémagglutinante de *Ricinus communis* est stable dans la gamme de pH allant de 3 à 9.

Le traitement thermique des lectines de *Ricinus communis* a été révélé une thermorésistante atteignant 100°C pour leur inactivation.

Le test d'inhibition réalisé avec différents monosaccharides montre qu'il y'a une spécificité pour le glucose, galactose, saccharose, arabinose, lactose et le ribose.

Mots clés : Lectines, glycoprotéines, *Ricinus communis*, activité hémagglutinante, monosaccharide.

Résumé

Abstract:

Lectins are proteins or glycoproteins of animal, plant, bacterial, and viral origins.

The purpose of this research work is a partial characterization of the lectin extracted from castor bean (*Ricinus communis*).

In our study, we began by extracting first lectins highlight their hemagglutination activity.

The hemagglutinating activity of the fractions of *Ricinus communis* was stable in the pH range 3-9.

The heat treatment lectins from *Ricinus communis* were revealed a heat resistance up to 100 °C for inactivation.

The inhibition test with different monosaccharides shows that there is specificity for glucose, galactose, sucrose, arabinose, lactose and ribose.

Keywords : Lectins, glycoproteins, *Ricinus communis*, hemagglutinating activity, monosaccharides.

Résumé

ملخص:

اللكتينات هي بروتينات أو بروتينات سكرية ذات مصدر: حيواني، نباتي، بكتيري وفيروسي. الهدف من هذا البحث هو دراسة الخصائص الجزئية للكتينات الموجودة في بذور *Ricinus communis*. في هذه الدراسة تم استخلاص اولا اللكتينات وذلك عن طريق ابراز الفعالية التراصية لهم. نشاط ترانس مستخلص عينات *Ricinus communis* بقي مستقرا في نطاق درجة الحموضة 3 – 9 pH. ان المعالجة الحرارية للكتينات الخروج *Ricinus communis* كشفت ان هذه الاخيرة مقاومة للحرارة التي قد تصل الى 100°م وهذا كافي لتنشيط قدرتها التراصية. تطبيق اختبار التنشيط مع مختلف السكريات الاحادية اظهر أن هناك خصوصية لل: Galactose، Glucose ، Ribose، Lactose، Arabinose، Saccharose

الكلمات المفتاحية: اللكتينات، اللكتينات السكرية، *Ricinus communis*، التراص، السكريات الاحادية.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

(NH₄)₂SO₄: Sulfate d'ammonium.

A : Absorbance.

Ca²⁺ : Calcium.

Con A : Concanaline A lectine.

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent assay.

ELLA : Enzyme-linked lectin assay.

F : Fraction.

Fuc: Fucose.

Gal: Galactose.

GalNAc: N-acétyl galactosamine.

GlcNAc: N-acétyl glucosamine.

Glu : Glucose.

HIV-1: Human Immunodeficiency Virus 1.

KCl: Chlorure de potassium.

kDa: Kilo Dalton.

KH₂PO₄: Phosphate mono Potassique.

Man: Mannose.

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium.

Na₂HPO₄ : Phosphate disodique.

NaCl : Chlore de Sodium.

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique.

PBS : Phosphate Buffer Saline

pH : Potentiel Hydro isoélectrique.

RCA : Ricinus Communis Agglutinine

RIPs : Proteines Inhibiteur de Ribosomes

RTA: Ribosome-Inactivating A-chain

RTB: Ribosome-Inactivating galactose binding B-chain

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavalia maritima</i> complexée avec le tréhalose.....	4
Figure 2 : La classification structurale des lectines des plantes.....	5
Figure 3 : Représentation graphique d'un monomère de ConA de <i>canavaliensiformis</i> en complexe avec le trimannoside.....	7
Figure 4 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie <i>Escherichia coli</i>	8
Figure 5 : Plante de ricin.....	16
Figure 6 : Graines de ricin.....	16
Figure 7 : Structure de la ricine.....	18
Figure 8 : Ricinus communis.....	19
Figure 9 : Schéma d'extraction des lectines à partir des graines de ricin.....	23
Figure 10 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions d'homogénat en fonction du volume d'élution.....	32
Figure 11 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions du culot' du 1er essai en fonction du volume d'élution.....	33
Figure 12 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions du culot' du 2ème essai en fonction du volume d'élution.....	33
Figure 13 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions du surnageant1 du 1er essai en fonction du volume d'élution.....	34
Figure 14 : Courbe représentant le profil des concentrations des protéines en fonction des fractions.....	37

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Historique de découverte des Lectines.....	2
Tableau 2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines.....	3
Tableau 3 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines.....	10
Tableau 4 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical.....	14
Tableau 5 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines.....	27
Tableau 6 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques.....	27
Tableau 7 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines.....	27
Tableau 8 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques.....	27
Tableau 9 : Concentrations des protéines dans chaque échantillon.....	28
Tableau 10 : Concentrations des protéines dans chaque échantillon.....	28
Tableau 11 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.....	29
Tableau 12 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.....	30
Tableau 13 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.....	31
Tableau 14 : L'agglutination des hématies du lapin avec les fractions.....	35
Tableau 15 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines et 260 nm Pour les acides nucléiques	36
Tableau 16 : Les concentrations des protéines de chaque fraction après la chromatographie.....	36
Tableau 17 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction.....	39
Tableau 18 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des fractions.....	40
Tableau 19 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples.....	43

Liste des photos

Liste des photos

Photo 1 : Les graines de <i>Ricinus communis</i>	22
Photo 2 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.....	29
Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.....	31
Photo 4 : L'effet d'activité hémagglutinante sur les fractions.....	35
Photo 5 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des fractions.....	38
Photo 6 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des fractions.....	40
Photo 7 : L'effet des sucres simples sur l'activité hémagglutinante des fractions.....	42

Introduction

INTRODUCTION

Introduction :

Les lectines sont des substances de nature protéique d'origine non- immunitaire, qui se lient de façon réversible aux sucres, Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon 1998**). La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte de l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation (**Rüdiger, 1993 ; Goldstein et al., 1980**).

Elles possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment : l'agglutination des cellules, l'activité mitogène, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antivirales et les effets immunitaires. Ces diverses propriétés sont à la base de l'utilisation des lectines dans le domaine biomédical (**MEITE et al., 2006**)

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les branches du règne vivant, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux (**Goldstein, 1978**).

La présence des lectines a été rapportée dans plusieurs variétés de plantes. Elles sont rencontrées dans de nombreux légumes secs (**Yagi et al. 2002 ; Rudiger 2001**). Au Cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées.

INTRODUCTION

Objectif :

- Objectif général :

Notre travail consiste en une caractérisation partielle des lectines extraites à partir des graines de ricin (*Ricinus communis*).

Le protocole que nous avons choisi de suivre est le suivant :

- Extraire les lectines selon une procédure que nous décrirons par la suite.
- Réaliser des tests d'hémagglutination sur l'extrait afin de confirmer leur activité et leur présence.
- Réaliser une chromatographie sur colonne de Séphadex G10 à des fins de dessalage et aussi augmenter le taux de purification de l'homogénat.
- Déterminer de nouveau l'activité hémmagglutinante des différentes fractions de l'éluât après dessalage et purification.
- Réaliser ensuite des tests physico-chimiques pour mieux apprécier la qualité de ces lectines.

Toute cette démarche qui a fait appel à autant de méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation de cette lectine sera appuyée des données bibliographiques qui sont représentées dans le premier volet de ce mémoire, avec une présentation générale sur les lectines, leurs structures et les différents rôles qu'on leur attribue. Le second volet décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation de nos résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans le troisième volet. Une conclusion générale et des perspectives seront enfin données.

Chapitre I :

« Généralités sur les lectines »

I.1 Définition :

A l'origine le terme lectine faisait référence à la propriété de certaines protéines se liant à des glucides, d'agglutiner les hématies humaines (**berk ,1993**). L'utilisation de ce terme pour désigner des protéines responsables d'une agglutination a conduit à son remplacement par la notion d'agglutinine.

Le mot lectine dérive du verbe latin *légere* qui veut dire « sélectionner » ou choisir, (**Liener et al., 1986 ; Boyd and Shapleigh 1954 ; Sharon and Lis 2004**).

Les lectines ont été définies comme des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, végétale ou animale qui reconnaissent certains mono ou oligosaccharides. Il ne s'agit pas d'enzymes ni d'anticorps, car les lectines ne présentent pas d'activité catalytique et ne sont pas impliquées dans la réponse immunitaire classique. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (**Goldstein et al, 1980**). Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination des cellules diverses (**Liener et al., 1986**).

Les lectines végétales sont actuellement les seules qui soient couramment utilisées pour caractériser ou fractionner des glycoconjugués d'origines diverses (**Goldstein et Hayes, 1978 ; Sharon et Lis, 1989**). Très souvent, ces lectines sont classées en fonction du monosaccharide capable d'inhiber la réaction d'agglutination induite par la lectine.

Les lectines sont relativement petites, leur masse moléculaire étant comprise entre 50 et 120KDa .Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous unités identiques. (**Ghopkins et Evrard, 2003**).

L'abondance de ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

I.2 Historique :

A la fin du XIXème siècle, plusieurs études mettent en évidence l'existence de molécules ayant les capacités d'agglutiner les érythrocytes, d'où leur nom d'hémagglutinines (**P.H Stillmark en 1888**).

En 1940, environ 40ans après la découverte des groupes sanguins A, B et O par Karl Landsteiner de l'université de Vienne, William C. Boyd de l'université de Boston et Karl O.Renkonen de l'université d'Helsinki démontrent la spécificité de ces hémagglutinines pour les différents groupes sanguins humains.

La première de ces molécules extraite du ricin (*Ricinus communis*) a été appelée ricine (**Sharon and Lis 2004**).

En 1960, P.C. Nowell a étudié l'effet de la phytohémagglutinine PHA (*Phaseolus vulgaris*) sur des lymphocytes normaux humains.

En 1965, Agrawal et Golstein découvrent la chromatographie d'affinité pour la purification des lectines. Elles sont aujourd'hui largement utilisées dans différents domaines de la biologie, notamment pour le typage des groupes sanguins, la stimulation mitogénique des lymphocytes ou encore le marquage histochimique de cellules cancéreuses. Le tableau 1 montre l'historique de découverte des lectines.

Tableau 1 : Historique de découverte des Lectines (**Ramata, 2010**)

ANNEE	AUTEURS	DECOUVERTES
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i> .
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> . Toxicité de la graine de <i>Croton tiglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques.
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine.
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la chaleur.
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité hémagglutinante dans les plantes non Toxiques.
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes a hémagglutinines.
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins.
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a hémagglutinines.
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples. Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin.
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectine.
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines.

I.3 Classification des lectines :

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants. Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines.

La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont 6 d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 familles d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1 famille d'algues (**tableau2**).

Tableau 2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (**Karoline S., 2006**)

Origine	Exemples de lectines	Native	Complexé	Total
Plant	Con A Ricine	106	201	307
Bactéries	PA-IL de pseudomonas toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin Helix pomatia agglutinin	80	152	232
Virus	Hémagglutinin de virus	43	25	68
Champignons	Lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9
Total		285	487	772

I.3.1 Lectines végétales :

Dans les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermaphytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (**Grant, 1991 ; Renkonen., 1948 ;**).

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées en 1972 (**Edelman *et al*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**) (**Figure1**)



Figure 1 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (**Delatorre et al, 2006**).

(Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert et les ligands par des bâtonnets)

Selon la classification de **Peumans et Van Damme (1995)**, quatre types majeurs de lectines sont présentés chez les plantes :

1- Mérolectines :

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides (exemple : heveine, protéines d'orchidées).

Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules. (**PEUMANS W.I. et V. DAMME J.M. ; 1995**)

2- Les hololectines :

Les hololectines sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire qu'ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi-identiques ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules de la majorité des lectines de plantes connues (**PEUMANS W.J. et V.DAMME J.M. ; 1995**).

3- les chimérolectines :

Les chimérolectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique. Ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-RIP Ribosom inactivating Proteine inactivant les ribosomes comme la ricine) (**PEUMANS W.J. et V.DAMME J.M., 1995**).

4- Les superlectines :

Les superlectines sont des oligomères poly-spécifiques constituées de plus de quatre monomères, elles sont considérées comme un groupe spécial de chimérolectines composées de deux domaines différents structuralement et fonctionnellement (**Van Damme et al. 1998**).

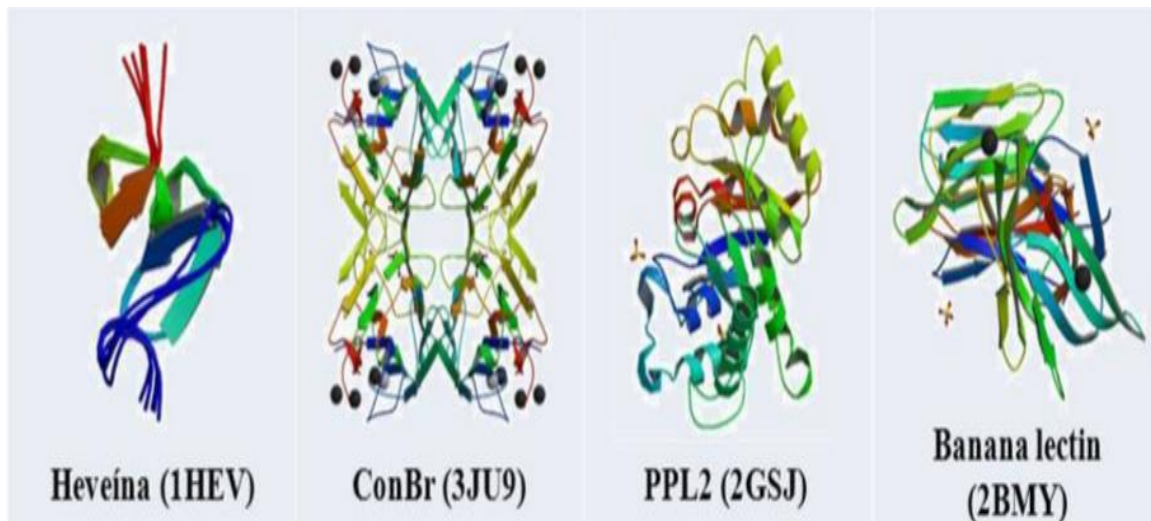


Figure 2 : La classification structurale des lectines des plantes (**Van Damme et al. 1998**).

I.3.2 Lectines animales :

Les lectines animales sont des protéines qui se lient aux glucides exprimées dans une variété de tissus. Ils sont excrétés sous forme de protéines membranaires (**Bianchet et al, 2009**).

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les *galectines*, les lectines de *type C* et les *siglecs*.

On peut les regrouper dans deux principaux groupes :

+ Les lectines intracellulaires :

Les lectines intracellulaires sont composées de quatre groupes ; les calnexines, les lectines de type M, P et L. ces lectines jouent des rôles essentiels dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (**Chabrol et al., 2012**)

+ Les lectines extracellulaires :

Les lectines extracellulaires comprenant toutes les autres familles, comme les lectines de type C et R, ainsi que les galectines. Ces lectines sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance des pathologies (**Chabrol et al., 2012**).

Les structures de *galectines* sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le β -galactose et plus précisément pour le lactose (β Gal1-4Glc) et le N-acétyl lactosamine (β Gal1-4GlcNAc) (**Leffler, et al. 2004**).

Les lectines de Type C : nommées de type C car elles nécessitent la présence de Ca^{2+} pour leur activité. Elles sont toutes caractérisées par un site de reconnaissance situé dans un domaine extracellulaire...

I.3.3 Lectines des micro-organismes :

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imberty and Varrot 2008, Sharon 1996**).

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriales (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (**Imberty et al, 2005**)

I.4 Structures des lectines :

Selon leur topologie, on classe les lectines en trois grandes classes :

I.4.1 Lectines simples :

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques). Elles sont généralement de masse moléculaire de 40KDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Lenka, 2006)

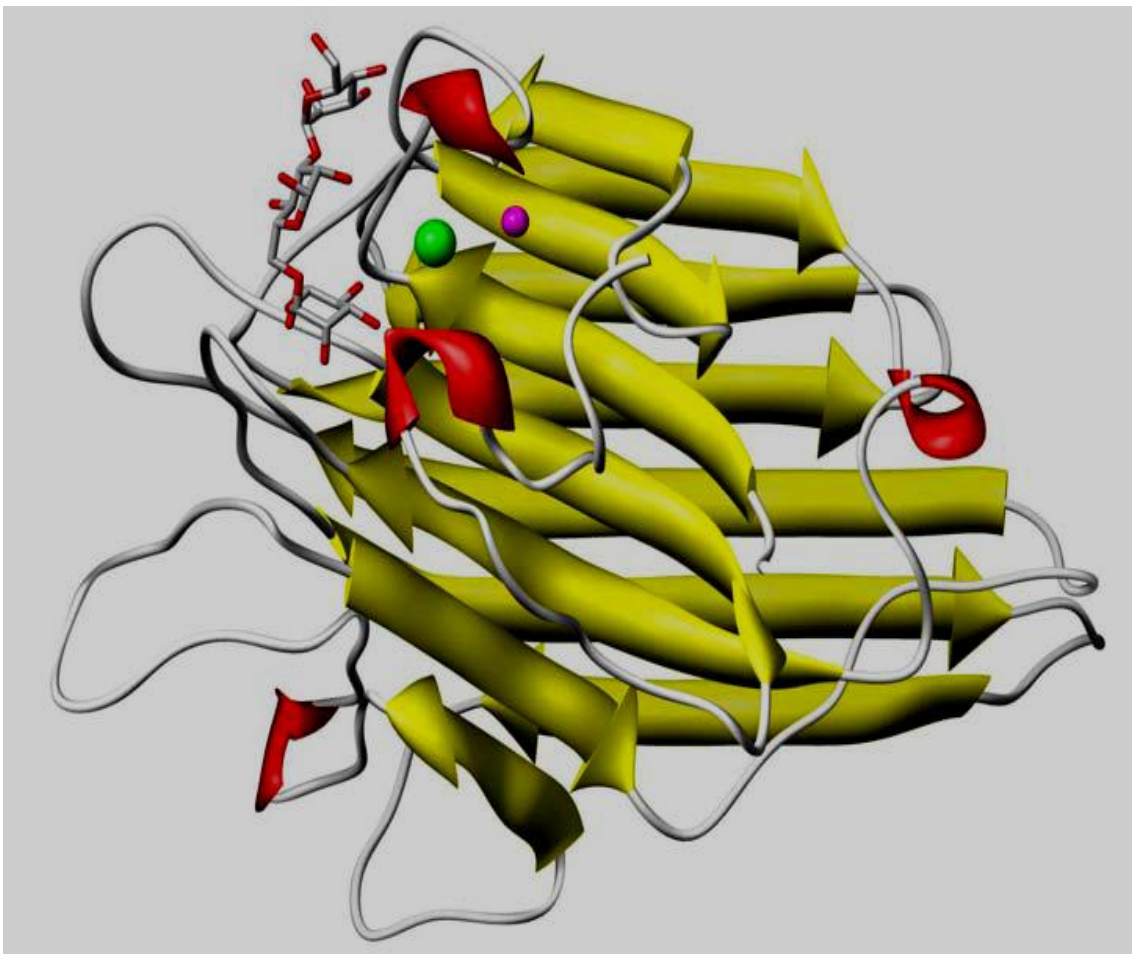


Figure 3 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de canavaliensiformis en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006).

La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations.

I.4.2 Lectines mosaïque :

Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexes composée de plusieurs type de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (**Lenka et al. 2006**).

I.4.3 Assemblages macromoléculaires :

Ces types sont le plus souvent chez les bactéries au niveau des fibrilles. Elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm appelés fimbriae ou pili La plus grande partie d'un filament fimbriae est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae. (**Lenka et al., 2006**).

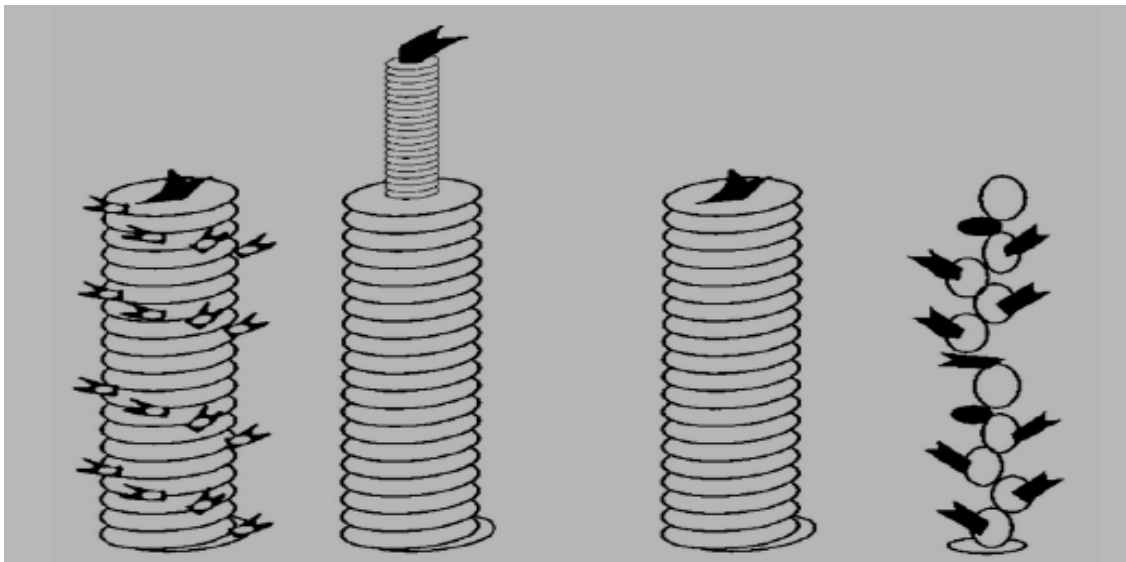


Figure 4 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli*. (**Lis and Sharon, 1998**)

I.4.4 La structure tridimensionnelle :

La structure tridimensionnelle des lectines est composée des feuillets β contactées par un nœud formé de chaînes antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (**Sharon et Lis, 1998**).

I.5 Spécificité :

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à

leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon et al. 2003**).

L'affinité des lectines pour les monosaccharides est généralement assez faible (KDa de l'ordre de 1mM) en comparaison avec leur affinité pour les oligosaccharides (de l'ordre du μ M). (**Dam et Brewer, 2002 ; Bianchet et al. 2009**).

Les lectines sont classées en cinq groupes différents selon le monosaccharide pour lequel elles présentent la plus forte affinité :

- le mannose (Man)
- le galactose (Gal)/ N-acétyl galactosamine (GalNAc)
- le glucose (Glu)/le N-acétyl glucosamine (GlcNAc)
- le fucose (Fuc)
- l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétyl neuraminique)

Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires (**Lis et Sharon, 1998**).

Certaines lectines possèdent deux ou plusieurs sites de fixation. On peut classer les lectines en trois catégories selon la nature de leur domaine de reconnaissance glucidique :

- Type P reconnaissant le mannose 6-phosphate.
- Type S reconnaissant le β -galactoside.
- Type C reconnaissants divers sucres par une liaison impliquant le Ca^{+2} (**Kamoun, 2003**).

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. Certaines lectines peuvent reconnaître le mannose et le fucose telles que DC-SIGN de mammifère (**van Liempt, et al. 2006**).

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park, et coll. 2008**). Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire.

Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee 1995**), Le tableau 03 représente la spécificité osidique de certaines plantes contenant les lectines.

Tableau 3 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (**Renato et col, 1991**)

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adenia digitata</i>	Gal
<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man > Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man > Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissus sessilifolia</i>	GlcNAc >Fuc >Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc

I.6 Propriétés biologiques des lectines :

Les lectines sont des molécules qui possèdent plusieurs propriétés biologiques.

I.6.1 Liaison avec les sucres :

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (**Myoshim. et Al, 1982**).

I.6.2 L'activités mitogène :

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne

s'exerce que sur les lymphocytes T (**Babosa, 2001 ; Falasca 1989 ; Nachbar et coll., 1980**)

I.6.3 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses :

Les travaux de Valentiner et coll. (2003) suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme *in vitro*. Banwell et coll. (1983), ils montrent que les lectines des graines d'Haricot rouge provoquent l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses.

I.6.4 Actions antivirales :

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wang et coll, 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolious* (**Lopez 2003**).

I.6.5 Autres propriétés :

Les lectines expriment diverses autres activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbar et coll. 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy 1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni 1988**).

I.7 L'agglutination des cellules :

Beaucoup de lectines sont déjà décrites dans la littérature scientifique. Des nombreuses lectines sont capables de se fixer aux cellules sanguines et provoquer leur agglutination. On parle alors de phyto-agglutination et plusieurs d'entre - elles le font avec une spécificité de groupe. C'est pourquoi celles-ci sont utilisées comme réactif de groupage ; c'est le cas de la lectine de *dolichos biflorus* qui agglutine spécifiquement les hématies A1. (**BIRD., 1951**)

L'agglutination cellulaire est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon) pour qu'elle puisse se produire. Les lectines monovalentes ont un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998**).

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**GOLDSTEIN, et al. 1980 ; RUDIGER, 1993**) il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. Ce test repose sur l'observation de

l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse et sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimale de lectine montrant une agglutination évidente. Les érythrocytes de plusieurs mammifères sont parmi les plus utilisées (humain, lapin, mouton, porc, etc...).

I.8 Fonctions de lectines :

I.8.1 Fonctions de lectines chez l'homme :

- ❖ Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ses organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon 1998**). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical.
- ❖ les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi 2004**).
- ❖ Elles sont utilisées en pratique clinique pour distinguer les types du sang (A, B et O), exemple : la lectine d'haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) se lie à N-acétyl-D-galactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A (**Goker et al., 2008**).
- ❖ Lectine extraire à partir de *S. littoralis* a des activités antimicrobiennes (**SEUFI. et al., 2012**)
- ❖ Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar et al, 2005**).

I.8.2 Fonctions de lectines chez les plantes :

- ❖ Les premiers travaux sur les lectines sont principalement dirigés vers les protéines des graines, mais leur distribution ne se limite pas seulement à cet organe de réserve. Des lectines sont détectées aussi bien dans les feuilles, que dans les tiges ou les racines. (**SAUVION., 1995**)
- ❖ Des nombreuses fonctions ont été proposées pour les lectines végétales tel que la protection contre les pathogènes et les insectes, le transport et le stockage des glucides et la reconnaissance cellulaire (dans la cellule, entre les cellules ou entre organismes). (**PUSTZAI., 1991**)
- ❖ Elles ont été également considérées comme des protéines de réserve ou comme des régulateurs de croissance. (**PUSTZAI., 1991**)

I.9 utilisation des lectines :

Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

I.9.1 Dans le domaine biomédical :

La découverte majeure de certains états physiologique et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules fut possible grâce à l'utilisation des lectines (**Raquel et Benevides, 2011**).

En Hématologie :

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Sharpleigh 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

Immunologie :

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**).

Les lectines mitogènes sont employées pour détecter les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

Biologie cellulaire :

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (**Jaffe, 1980**).

Cancérologie :

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques, puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot et al., 2004**).

En raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteurs pour diriger les drogues et les produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses (**Kenoth, 2001**).

Tableau 4 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical
(Murdockl .L Shade R.E, 2002)

<i>Propriétés :</i>	<i>Applications :</i>
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	-typage du sang -identification de nouveaux groupes Sanguins
Agglutination cellulaire	-recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations. -phagocytose et motilité. -Diminution de la croissance des cellules Tumorales.
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	-isolement, purification et études structurales des glucides, -purification des glycoconjugués (enzymes, hormones). -modèles pour la réaction antigène anticorps (test ELISA, etc.)
Liaison aux sucres	-études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. -structure et fonctionnement des membranes

I.9.2 Dans le domaine agronomique :

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (Murdock *et* Shade, 2002).

Chapitre II :

« Etude générale sur le ricin »

I. Caractéristique botanique de la plante *Ricinus communis* :

I-1 Généralités :

Le nom générique *Ricinus* signifie «tique» en latin : la graine est ainsi nommée parce qu'elle a des marques et une bosse qui la fait ressembler à certaines tiques (Ramprasad et Bandopadhyay, 2010).

Ricinus Communis L fait partie de la famille des Euphorbiacées comportant 8100 espèces, cette plante est le seul représentant du genre *Ricinus* qui est un arbre à grandes feuilles palmées (Witchard, 1997 ; Paul et Tanigoshi, 1999 ; Malathi et al., 2006 ; Ledent et Mairesse, 2008).

I-2 Nomenclature :

Anglais : Castor plant, castor oil plant, Palma Christi (Borch-Jensen, 1997 ; Lorenzo ET Lynne, 1998 ; Despott et Mario, 2004 ; Grace, 2007 ; Volkshard et Nogueira, 2007 ; Leo et al. 2009).

France : Ricin (Maroyi, 2007).

I-3 Etymologie :

Il est originaire d'Afrique tropical, il s'est répandu un peu partout dans le monde, là où le climat le permettait. On le retrouve aussi sous des climats subtropicaux, mais également sous les climats tempérés.

Ricinus communis est présente dans tout le continent Africain, de la côté atlantique à la mer rouge et de la Tunisie à l'Afrique du Sud ainsi que dans les îles de l'océan Indien (Maroyi, 2007). Plus de 95% de la culture de *Ricinus* dans le monde est concentrée en Inde, la Chine et le Brésil (Sailaja et al. 2008).

I-4 Description :

Le ricin se présente sous la forme d'une plante herbacée ou arborescente, annuelle ou vivace suivant les conditions climatiques de la région, pouvant atteindre 7 m et plus.

Il possède deux parties :

a) **Une partie aérienne** : possédant

- **Feuilles** : grandes feuilles palmatilobées avec 7 à 9 lobes, glabres, profonds, dentés, lancéolés.

- **Une tige** : dressée, robuste, rameuse avec des branches à nœuds visibles et cicatrices annulaires, généralement glauques, parfois vertes ou rouges, un peu fistuleux, bien unie, ronde, lisse, ramifiée seulement dans le haut (**Couplan et Styner, 2000**)
 - **Les fleurs** : sont regroupées en cyathes, les fleurs femelles en haut ont seulement trois folioles au calice, et au-dessous de petites écailles ; un ovaire globuleux hérissé, surmonte de trois pistils longs, rouges, hispides (**Maroyi, 2007**), les fleurs mâles en bas. C'est donc une espèce monoïque. La floraison a lieu en été.
 - **Fruits** : capsule à 3 coques hérissées, chacune contenant une graine ovale, marbrée, à caroncule saillante et albumen riche en huile, Les capsules renferment généralement 3 graines de couleur marron clair, marron rouge ou gris tachète de blanc (**Coopman et al. 2009**)
 - **Graines** : sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc. A l'intérieur de la graine se trouve une amande oléagineuse qui est très toxique (**Little et Wadsworth, 1974**).
- b) **Une partie souterraine** : possédant une racine pivotante puissante a racines latérales marquées.



Figure 5 : Plante de ricin



Figure 6 : Graines de ricin

I-5 Localisation :

Le Ricin et RCA (*Ricinus Communis* Agglutinine) sont stockés dans les corps protéiques dans les cellules de l'endosperme de maturation des graines de *Ricinus* (Lord et al., 1994).

I-6 Structure chimique :

La ricine est une glycoprotéine qui inhibe par inactivation des ribosomes la synthèse protéique intracellulaire. Du fait des propriétés enzymatiques de cette toxine, on pense qu'une seule molécule de ricine peut, après translocation dans le cytosol, tuer la cellule.

La fève de ricin contient deux toxines puissantes ricine et *Ricinus communis* agglutinine (RCA). Ce sont des glycoprotéines présentes dans les corps protéiques du tissu endosperme (Tully et Al., 1976).

Le nom ricin, donné à cette albumine par Stillmark en 1888, est une protéine hétérodimérique de 64 KDa, légèrement plus petite que l'albumine (Garland et Bailey, 2006), constituée de 1% à 5% des protéines totales des graines de *Ricinus communis* L (Franz et Nancy, 1997 ; O'Connell et al., 2002 ; Korcheva et al., 2007). Et est composé de deux sous-unités de chaîne A et la chaîne B reliés par une liaison disulfure unique.

La chaîne A (ribosome-inactivating A-chain ou RTA) est une protéine inactivant les ribosomes (Lord et al. 1994) et est composée de 267 résidus d'acides aminés de 32 KDa. La chaîne B est une lectine spécifique pour le résidu galactose (galactose binding B-chain ou RTB) de 34 KDa avec 262 acides aminés (Lorenzo et Lynne, 1998 ; Lombard et al., 2001; Kenigsberg et al., 2008 ; Garber, 2008; Cheema et al., 2010).

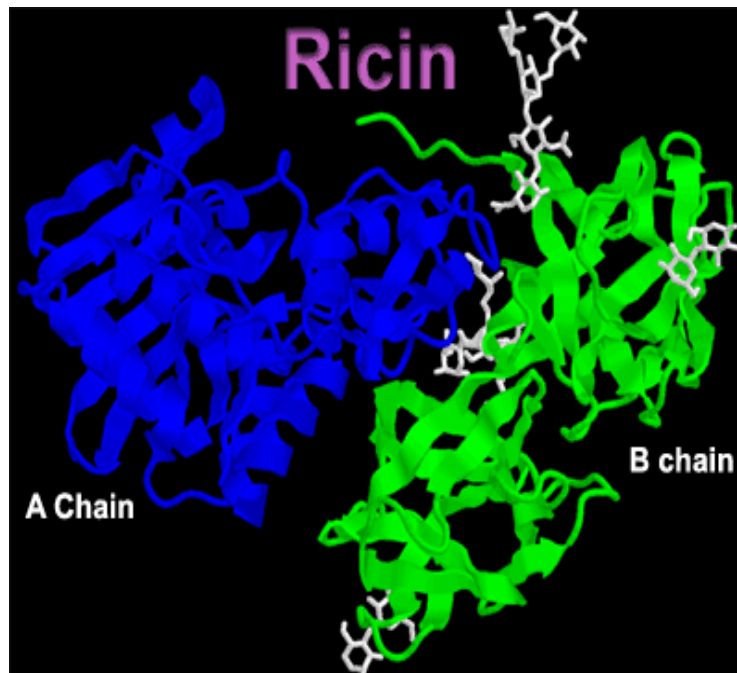


Figure 7 : Structure de la ricine (Montfort et al .,1987).

I-7 Classification scientifique :

- ❖ **Règne** : Plantea
- ❖ **Embranchement** : Spermaphyte (plante à graine) (Lagnika, 2005)
- ❖ **Sous-embranchement** : Angiosperme (Magnoliophyta : Plantes à fleurs)
- ❖ **Classe** : Magnoliopsida
- ❖ **Sous-classe** : Rosidae
- ❖ **Ordre** : Euphorbiales
- ❖ **Famille** : Euphorbiaceae
- ❖ **Genre** : Ricinus (Anjani, 2005 ; Aslania et al., 2007; N'guessan et al ., 2009).
- ❖ **Espèce** : *Ricinus Communis L*



Figure 8 : *Ricinus communis* [1]

I-8 Utilisations médicales :

Le Ricinus, a été employé dans la médecine égyptienne et grecque classique et son utilisation a été décrite par Sursauta et Ayurveda (deux anciens médecines Hindous).

Dans la médecine traditionnelle indienne, les feuilles, les racines et l'huile extraite des graines de cette plante ont été employés pour le traitement de l'inflammation et dans des affections du foie (effet hepatoprotecteur), laxatifs et diurétiques. Les racines sont utiles dans le traitement du diabète" effet hypoglycémiant" (**Poonam et al. 2008 ; Rao et al. 2010**) et antibactérien. (**Ilavarasan et al. 2006**).

Les graines de *Ricinus communis* L ont été employée dans différentes parties du monde comme cathartique, un émétique et pour le traitement de la lèpre et de la syphilis. Certaines femmes en Inde et Corée ont pris les graines de ricin, comme moyens contraceptifs. Il a été rapporté en Algérie, que certaines femmes ont pris des graines de ricin plongées dans du sang chaud d'un lapin pour empêcher ne pas tomber enceinte. Aussi, il a été rapporté, qu'il n'y aura aucune grossesse pour au moins 9 mois, si une femme prend une graine après la naissance d'un enfant (**Abdulazim et al ., 1998**) .

Le caractère glycoprotéique de la toxine et ses capacités de poison cellulaire ont permis d'envisager son utilisation couplée à des anticorps monoclonaux pour créer ainsi une immunotoxine dirigée spécifiquement sur un antigène. Cette "torpille biologique"

permettrait d'atteindre les cellules cancéreuses métastasées ou de pénétrer l'intérieur des tumeurs solides inopérables. Des protocoles thérapeutiques complexes associant cette immunotoxine (de ricine) avec des médicaments cytostatiques ou des radio-isotopes sont envisagés.

Chapitre III :

« Matériels et méthodes »

Matériel et méthodes :**I. Matériel :****I.1. Matériel végétal :****+ Récolte des graines :**

Les graines de *Ricinus communis* étudiées ont été récoltées de la région de Massinissa à Constantine au mois de Février 2016.

+ conservation :

Les graines sont conservés au frais et à l'abri de l'humidité.

+ Broyage :

Les graines ont été broyées dans un mortier-pilon jusqu'à l'obtention d'une pâte.

I.2. Matériel Biologique :

Les hématies utilisées sont issues de sang du lapin pour réaliser les tests d'hémmaglutination.

II. Méthodes :**II.1 L'extraction des lectines par la solution tampon :**

45g de pâte de graines de *Ricinus* sont dissous dans 100ml du tampon PBS (10mM, pH 7,2), et l'ensemble est encore broyé, réparti sur deux tubes, puis laissés pendant 24h à température ambiante. Les suspensions obtenues sont ensuite centrifugés à 6000 tour/minute pendant 45 minutes. Les deux surnageant obtenus S1+S2 ont été récupérés et conservés à température ambiante, En parallèle les deux culots récupérés C1+C2 ont été mélangés avec 40ml du PBS. Une quantité de 6,56 g de sulfate d'ammonium, a été ajouté au dernier mélange pour obtenir de saturation à 30 % et soumis à une agitation réalisée par un agitateur magnétique pendant 1heure, et une deuxième centrifugation à 6000 tour /minute pendant 45 minutes.

Le nouveau culot (C') est conservé à température ambiante, et le surnageant (S') a été mélangé avec 15.124 g de sulfate d'ammonium de façon à obtenir 65 % de saturation. La solution obtenue est aussi soumise à une agitation magnétique pendant 1heure puis re-centrifugé à 6000 tour /minute pendant 45 minutes. A la fin on obtient le surnageant (S'') et le culot (C'').



Photo 1 : Les graines de *Ricinus communis*.

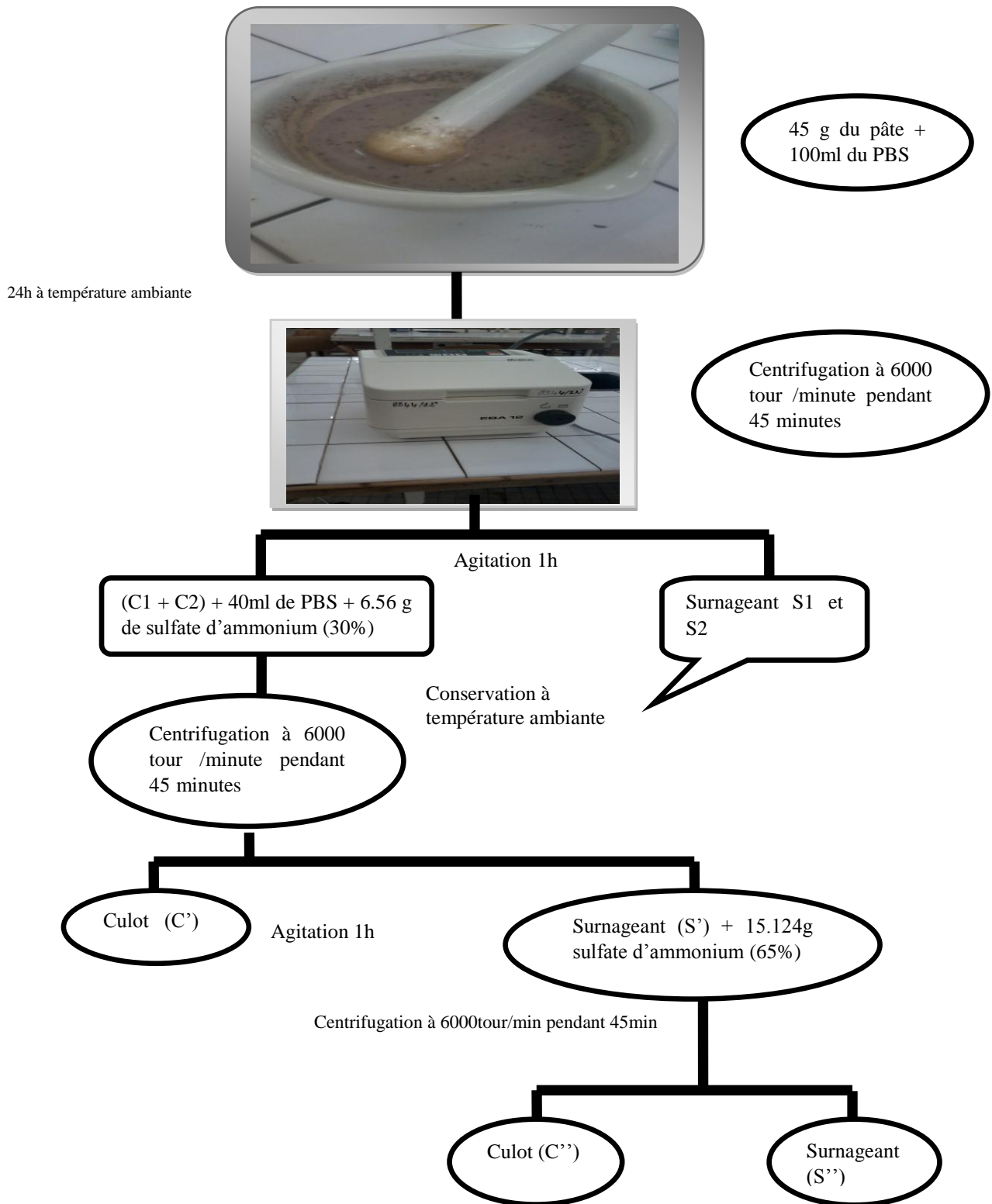


Figure 9 : Schéma d'extraction des lectines à partir des graines de ricin.

II.2 Dosage des protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Warburg et Christian(1941) qui ont étudié les propriétés spectrales des macromolécules et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à 280 nm, pour les protéines et à 260 nm, pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

II.3 Le Test d'hémagglutination :

Ces tests sont réalisés à différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein 1980 ; Rüdiger 1993**). Cette technique a été effectuée pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les extraits. Ce test est basé sur l'observation de l'agglutination, et donc de la précipitation des érythrocytes en présence de lectine. Il a eu lieu sur des hématies de lapin.

Après le test d'hémagglutination, seuls les extraits positifs ont été retenus pour la suite de notre étude.

✚ Collecte des hématies :

Les hématies de lapin ont été obtenues à l'animalerie de l'université des frères Mentouri de Constantine.

✚ Préparation des hématies 3% :

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de **Higuichi et al (1989)**, de la manière suivante :

✚ Lavage des hématies :

Une quantité de sang a été posée dans un tube hépariné, puis centrifugé à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est dissous dans une solution physiologique (NaCl 0,9%) et à nouveau centrifugé. Cette opération de lavage a été reprise trois fois dans les mêmes conditions.

✚ Dilution des hématies :

Après le troisième lavage des globules rouges, ces dernières sont diluées dans du chlorure de Sodium 0,9% (NaCl), soit 1,5 ml des hématies dans un 48,5 ml NaCl afin d'obtenir une solution d'hématies à 3%.

II.4 Le test des limites d'hémagglutination :

Dans une première étape, 50 µl de solution tampon phosphate ont été déposés dans chaque puits de la microplaque, ensuite un volume de 50 µl d'extrait a été ajouté au premier puits, puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants. On fera en sorte de jeter 50 µl du mélange à partir du dernier puits pour respecter les taux de dilutions de chacun d'eux.

Un volume de 50 µl des hématies a été ajouté dans chaque puits. La lecture d'activité hémagglutinante a été réalisée à l'œil nu, après 1h d'incubation à une température ambiante.

II.5 Précipitation au sulfate d'ammonium :

Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Cette quantité est celle nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de sulfate d'ammonium suffisante pour saturer cette solution à la température et au pH où on travaille. C'est pourquoi il s'agit bien du pourcentage de saturation (non pas du pourcentage de concentration en tant que tel).

II.6 La Chromatographie sur colonne de Sephadex G10 :

- **Préparation de la colonne :**

0.5g de sephadex G10 ont été mis en suspension dans 12.5 ml de tampon phosphate (10 mM, pH 7,2), Le mélange est mis en incubation pendant 3heures à température ambiante, puis coulé dans une colonne (1 cm × 10 cm) et laisser se reposer pendant 24h.

Le gel séphadex G10 (domaine de fractionnement : ≤ 700Da) qui forme la phase fixe de la séparation, est utilisé dans notre travail en tant que colonne de dessalage à la place d'une dialyse. On aurait pu également utilisé du G25.

- **La séparation des lectines à partir des extraits :**

Après la stabilisation et lavage du gel avec le tampon (PBS à 10 mM, pH 7,2), les échantillons ont été versés lentement et en petites quantités dans la colonne, puis des fractions de 2ml chacune sont recueillies après élution avec du tampon (PBS à 10 mM, pH 7,2), avec un débit d'environ 0,5ml/min.

Les fractions ainsi récupérés ont toutes subies un test d'hémagglutination sur les hématies du lapin.

- **La spectrophotométrie à UV et dosage des protéines :**

Les fractions issues de la chromatographie sur colonne sont placées dans le Spectrophotomètre à UV afin de mesurer l'absorbance à longueur d'onde 280 nm et à 260 nm. Une courbe reliant l'absorbance en fonction de volume d'éluion pour chaque situation (homogénat, culot' du 1er essai, culot' du 2ème essai et le surnageant1) sera réalisée.

II.7 L'effet de pH sur l'hémagglutination :

L'effet du pH, de la température et celui de différents sucres sur l'activité de notre lectines sera observé sur les dix fractions possédant une forte agglutination.

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante a été déterminé par la mise en œuvre du pouvoir hémagglutinant de la lectine en utilisant des tampons à différent valeurs de pH en allant de 1 à 12. Chaque tampon a été mélangé avec les dix fractions Après 24 h le test d'hémagglutination est effectuée sur ces fractions.

II.8 L'effet de température sur l'hémagglutination :

Dix tubes à essai, contenant chacun une quantité des fractions ont été incubés à des températures différentes (40, 60, 80, 100 °C) dans un bain marie pendant une heure de temps. Après le temps requis, la fraction chauffée a été refroidie à la température ambiante, suivie d'un test d'hémagglutination.

II.9 Test d'inhibition d'agglutination par des sucres simples :

La spécificité des lectines aux glucides a été étudiée par la capacité d'une série des saccharides à inhiber l'agglutination des hématies de lapin.

Dans un puits d'une microplaque, 50µl de solution de sucre (glucose, galactose, arabinose, fructose, lactose, saccharose, xylose et ribose) (100 mg/ml), sont ajoutées à 50µl de chaque fraction, le mélange est incubé pendant 1h à température ambiante, 50 µl des hématies de lapin 3% ont été rajoutées, la lecture a été effectuée après 1h à température ambiante à l'œil nu.

Chapitre IV :

« Résultats et discussion »

Les résultats obtenus sont les suivants :

1. Dosage de protéines :

Nous avons procédé à deux essais :

Le 1er essai :

Tableau 5 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines.

tubes	S1	S2	C'	S''	C''	homogénat
$\lambda=280\text{nm}$	0.385	0.525	0.274	0.290	0.326	0.506

Tableau 6 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques.

tubes	S1	S2	C'	S''	C''	homogénat
$\lambda=260\text{nm}$	0.417	0.535	0.315	0.300	0.321	0.484

Le 2ème essai :

Tableau 7 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines.

tubes	S1	S2	C'	S''	C''	homogénat
$\lambda=280\text{nm}$	0.264	0.404	0.323	0.204	0.383	0.506

Tableau 8 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques.

tubes	S1	S2	C'	S''	C''	homogénat
$\lambda=260\text{nm}$	0.271	0.439	0.325	0.215	0.365	0.484

λ : longueur d'onde

S1 : Surnageant 1

S2 : Surnageant 2

C' : Culot '

S'' : Surnageant''

C'' : Culot''

2. Les concentrations des protéines sont les suivants :

Les concentrations ont été calculées d'après la formule de Warburg et Christian (1941) :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

Le 1er essai :

Tableau 9 : Concentrations des protéines dans chaque échantillon.

Tube :	S1	S2	C'	S''	C''
Concentration (mg/ml) :	14	20.35	9.25	11.05	13.1

Parmi les fractions du 1er essai, on observe que la majorité des protéines sont réparties entre le surnageant (S1 et S2), et dans une moindre mesure dans le culot' et le surnageant''.

Le 2ème essai :

Tableau 10 : Concentrations des protéines dans chaque échantillon.

Tube :	S1	S2	C'	S''	C''
Concentration (mg/ml) :	10.2	14.65	13.8	7.6	15.8

S1: Surnageant 1.

S2: Surnageant 2.

C': Culot '.

S'': Surnageant''.

C'': Culot''.

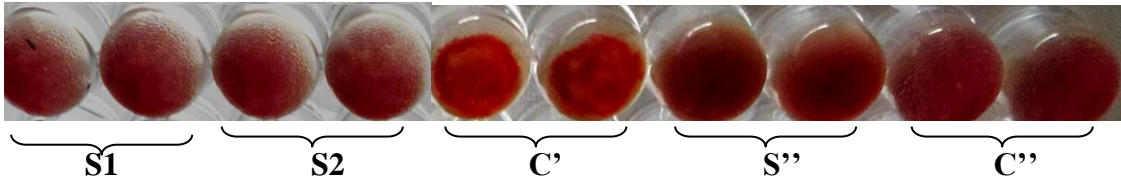
Parmi les fractions du 2ème essai, on observe que la majorité des protéines sont réparties entre le surnageant 2, le culot', et le culot'', et dans une moindre mesure dans le surnageant (S1, S'').

3. Le test d'hémagglutination :

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec des globules rouges. Si une solution des hématies est placée dans un puits, la sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'ajout d'une lectine permet la formation d'un

réseau entre les hématies et les lectines, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène, ceci correspond au phénomène d'héماغglutination.

Le 1er essai :



Le 2ème essai :

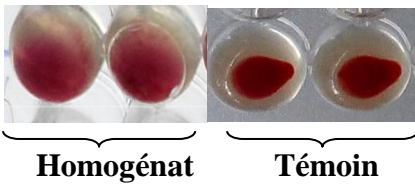
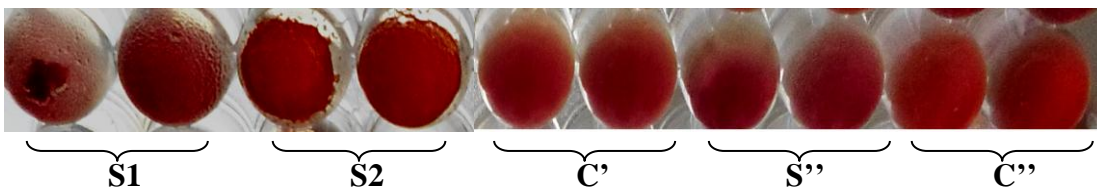


Photo 2 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.

Le 1er essai :

Tableau 11 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.

Echantillons	Activité Héماغglutinante
S1	++++
S2	+++
C'	++++
S''	+
C''	+++
Homogénat	++++
Témoin	-

++++ : Très forte agglutination.

+++ : Forte agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'Agglutination.

L'homogénat, le surnageant1 et le culot' montrent une très forte agglutination vis-à-vis des hématies de lapin, tandis que le surnageant 2 et le culot'' possèdent une forte agglutination, cependant le surnageant'' montre une faible agglutination ; cette agglutination a été observée à l'œil nu ce qui prouve que la *Ricinus communis* contient des lectines. Ces résultats ont été similaires à ceux des lectines extraites des graines de la plante *syzygium aromaticum* qui ont montré également une très forte agglutination lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes de lapin (Necib *et al*, 2014). Un autre exemple de lectine des graines d'*Amaranthus leucocarpus* fut décrit par Edgar zenteno-galindo(1986) présente une activité hémagglutinante très semblable aux lectines étudiées dans ce travail.

Le 2ème essai :

Tableau 12 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.

Echantillons	Activité Hémagglutinante
S1	+++
S2	+
C'	++++
S''	+++
C''	+
Témoin	-

++++ : Très forte agglutination.

+++ : Forte agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'Agglutination.

Le culot' montre une très forte agglutination vis-à-vis des hématies de lapin, tandis que le surnageant1 et le surnageant'' possèdent une forte agglutination, cependant le surnageant2 et le culot'' montre une faible agglutination ; cette agglutination a été observée à l'œil nu ce qui prouve que la *Ricinus communis* contient des lectines. Ces résultats sont similaires à ceux de lectine extraite du cactus *Machaeroereus eruca* qui ont montré également une très

forte agglutination lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes de lapin. (Edgar zenteno-galindo., 1986).

4. Les limites d'hémagglutination :

La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination.

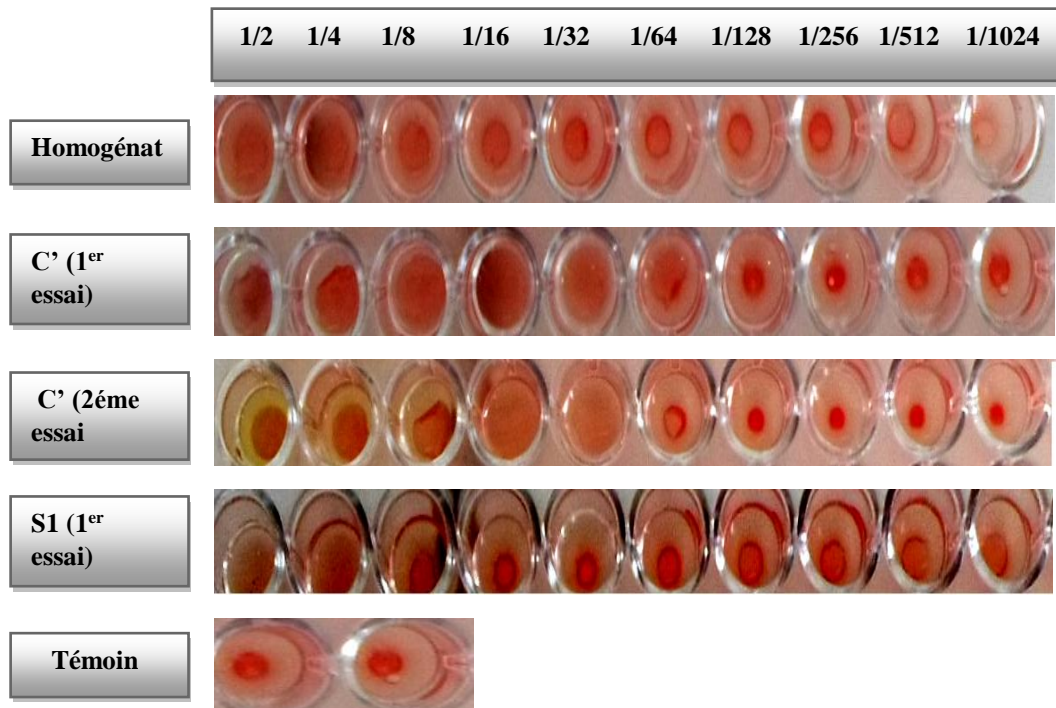


Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.

Tableau 13 : L'agglutination des hématies du lapin avec les échantillons.

Dilution \ extrait	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Homogénat	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
C' (1^{er} essai)	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
C' (2^{ème} essai)	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
S1 (1^{er} essai)	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Forte agglutination.

++ : Moyenne agglutination.

- : Absence d'agglutination.

L'activité hémagglutinante des échantillons d'homogénat et de surnageant1 est visible jusqu'à la troisième dilution (1/8), tandis que les deux culots révèlent une hémagglutination meilleure et visible jusqu'à la cinquième dilution (1/32) et qui correspondent à une concentration nettement plus faible. Ceci met en évidence un pouvoir hémagglutinant de nos lectines assez appréciable, mais tout de même moins important que d'autres lectines comme par exemple celles de l'Aloé-véra qui ont montré une très forte agglutination allant jusqu'au 7^{ème} puits (1/128) (Zitouni *et al*, 2015).

5. La Chromatographie sur colonne de Sephadex G10 :

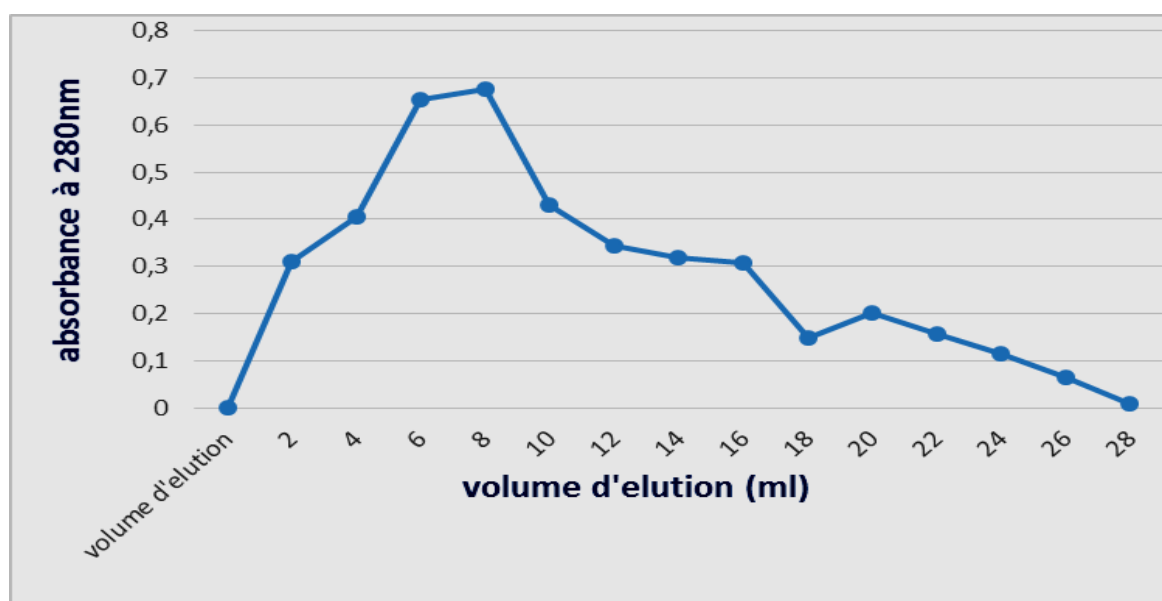


Figure 10 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions d'homogénat en fonction du volume d'élution.

Le volume de rétention : 2ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

La longueur d'onde : $\lambda = 280\text{nm}$.

La figure 10 met en évidence de l'homogénat après son passage à travers la colonne de la chromatographie. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm est observée dans la fraction n°4 qui se situe entre 8 et 10ml.

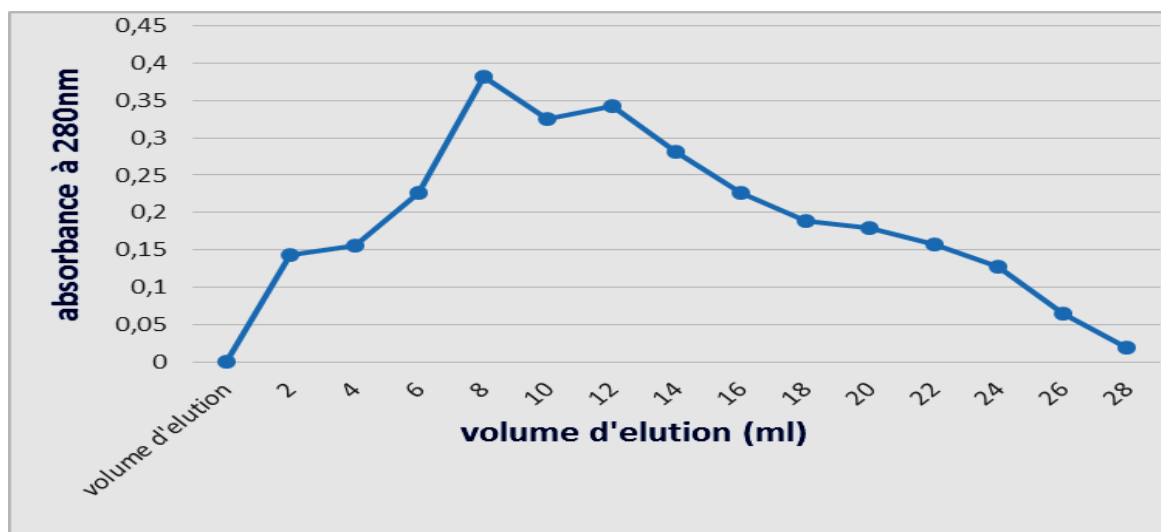


Figure 11 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions de culot' du 1er essai en fonction du volume d'élution.

Le volume de rétention : 2ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

La longueur d'onde : $\lambda = 280\text{nm}$

La figure 11 met en évidence du culot après son passage à travers la colonne de la chromatographie. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm se trouve dans la fraction n°4 puis 6.

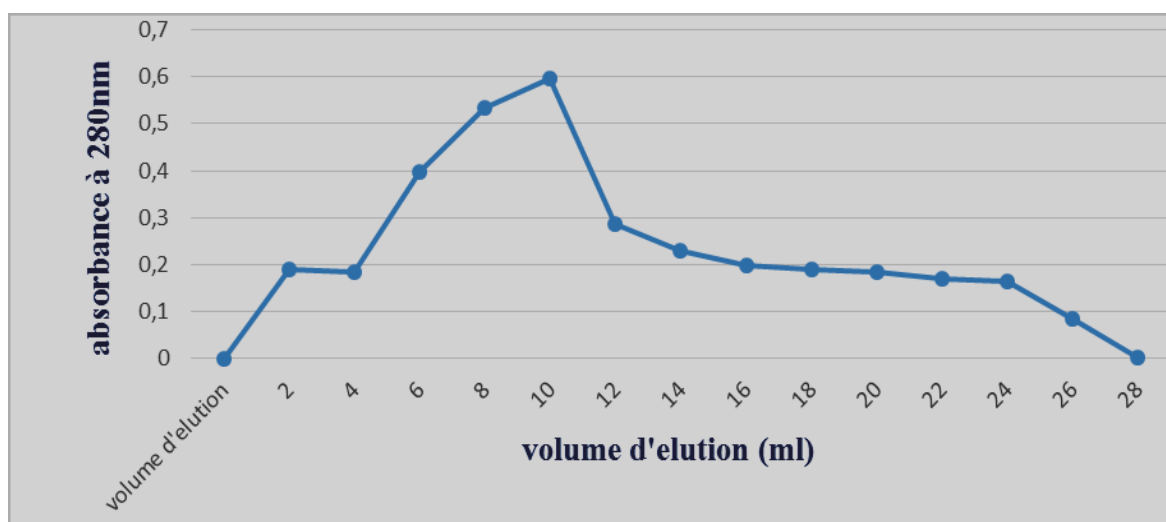


Figure 12 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions de culot' du 2ème essai en fonction du volume d'élution.

Le volume de rétention : 2ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

La longueur d'onde : $\lambda = 280\text{nm}$.

La figure 12 met en évidence du culot' après son passage à travers la colonne de la chromatographie. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm est observée dans la fraction n°5.

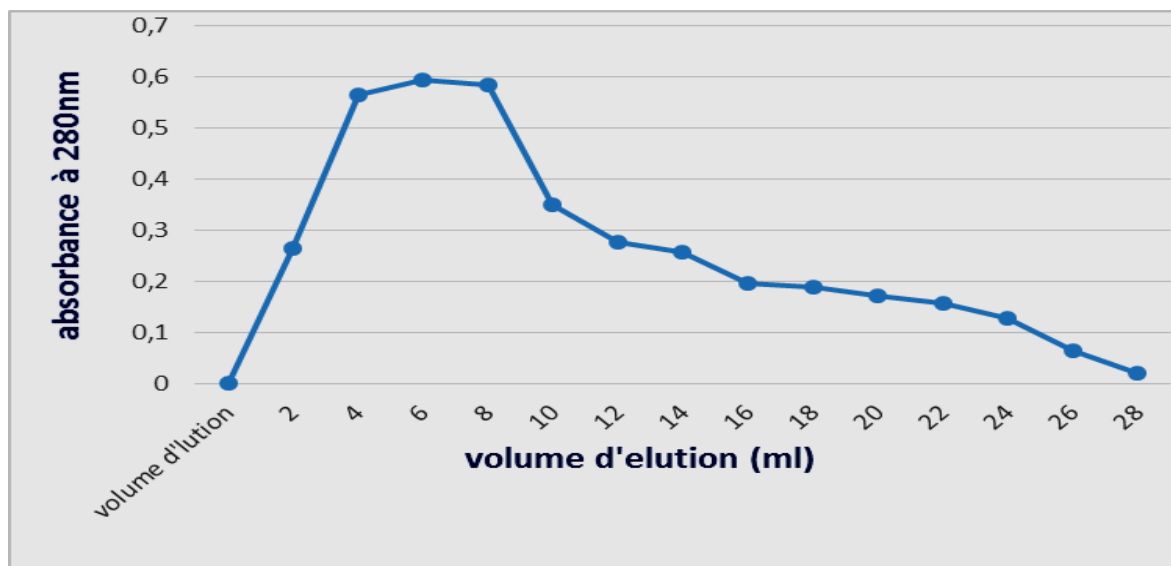


Figure 13 : Courbe représentant le profil d'élution des fractions du surnageant 1 du 1er essai en fonction du volume d'élution.

Le volume de rétention : 2ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

La longueur d'onde : $\lambda = 280\text{nm}$

La figure 13 met en évidence le profil d'élution des fractions du surnageant après son passage à travers la colonne de la chromatographie. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm se trouve dans les fractions de 2 à 4.

Les résultats de séparation en utilisant le séphadex G 10, montrent un bon fractionnement des échantillons. Ceux concernant l'homogénat, le culot' du 1er essai, le culot' du 2ème essai et le surnageant 1 permettent l'obtention d'un seul pic. Des résultats similaires ont été observés chez les lectines de *Morus nigra* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 75 (Bahi et al. 2015), par contre l'extrait de *concanavaline A* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 200 a donné deux pics (Agrawal et Golstein., 1965).

- ❖ Afin de vérifier si toutes les fractions recueillies après chromatographie sur sephadex G10, qui correspondent aux valeurs relatives à ces pics et qui sont au nombre de 12 pour chaque échantillons sont des lectines, un test d'hémagglutination s'impose.
- ❖ Ces mêmes fractions feront également l'objet de tests montrant l'effet du pH, de la température et de l'inhibition par des sucres simples afin d'apprécier la spécificité des lectines vis-à-vis des monosaccharides.

6. Le test d'hémagglutination des fractions :

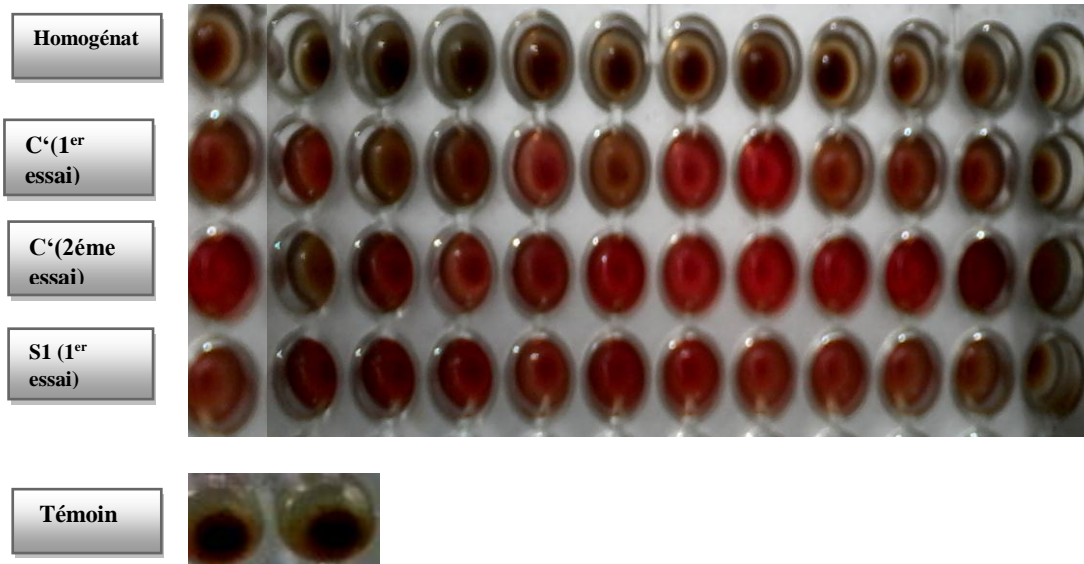


Photo 4 : L'effet d'activité hémagglutinante sur les fractions.

Tableau 14 : L'agglutination des hématies du lapin avec les fractions :

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Echantillon												
Homogénat	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
C' (1er essai)	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	++	++
C' (2ème essai)	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
S1 (1er essai)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
témoin	-	-										

++ : Moyenne agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination

- Parmi les 12 fractions d'homogénat, Les fractions F1, F2, F3, F4, F5, F8, F9 et F11 ont montré des faibles agglutinations vis-à-vis des hématies de lapin. Alors que F6, F7, F10 et F12 ne présentent aucune hémagglutination.

- Les fractions F11 et F12 de culot' du 1^{er} essai montrent une moyenne agglutination ; tandis que F1, F2, F4, F5, F8, F9 et F10 montrent une faible agglutination. Par contre les autres fractions ne possèdent aucune activité hémagglutinante.
- Les fractions F1, F11 et F12 de culot' du 2^{ème} essai montrent une moyenne agglutination ; tandis que F10 montre une faible agglutination. Par contre les autres fractions ne possèdent aucune activité hémagglutinante.
- Dans le cas des fractions de surnageant1 du premier essai, F1, F2, F3, F4, F10, F11 et F12 montrent une moyenne agglutination, alors que les autres ne présentent aucune hémagglutination.

Les résultats concernant les dix nouvelles fractions obtenues après élution avec le tampon PBS (PH =7.2), sont représentés dans le tableau 14, et illustré par la courbe de la figure 14.

Tableau 15 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines et 260 nm pour les acides nucléiques.

Fraction	H1	H2	H3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
260 nm	0.572	0.223	0.196	0.193	0.289	0.227	0.223	0.200	0.479	0.202
280 nm	0.497	0.216	0.175	0.708	0.297	0.209	0.207	0.199	0.435	0.194

Tableau 16 : les concentrations des protéines de chaque fraction après la chromatographie.

Fraction :	H1	H2	H3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Concentrations mg/ml	16.8	8.25	6.15	47.55	12.05	7.55	7.55	7.8	15.5	7.35

H1 : L'ensemble des fractions F1 à F5 de l'homogénat après la chromatographie.

H2 : L'ensemble des fractions F8 et F9 de l'homogénat après la chromatographie.

H3 : La fraction F11 de l'homogénat après la chromatographie.

E1 : L'ensemble des fractions F1 et F2 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E2 : L'ensemble des fractions F4 et F5 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E3 : L'ensemble des fractions F8 à F12 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E4 : La fraction F1 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E5 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E6 : L'ensemble des fractions F1 à F4 de surnagent 1 après la chromatographie.

E7 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de surnageant 1 après la chromatographie.

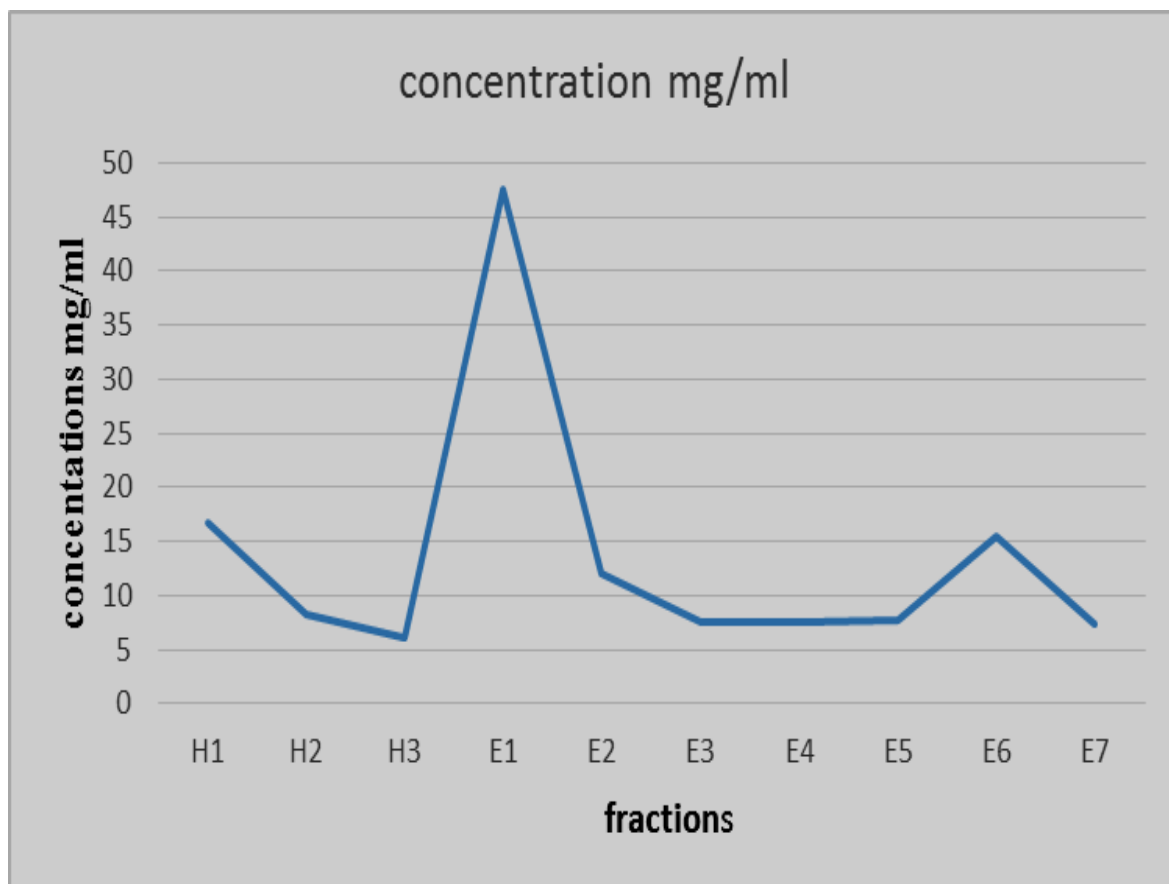


Figure 14 : Courbe représentant le profil des concentrations des protéines en fonction des fractions.

La figure 14 met en évidence les concentrations des fractions après son passage à travers la colonne de la chromatographie. Les valeurs maximales des concentrations se trouvent dans les fractions d'E1 (47.55mg/ml) et E6 (15.5mg/ml).

L'analyse de la courbe de la figure 14, peut à priori nous permettre d'avancer que nos différents extraits renferment deux types de lectines réparties entre le culot 1 du 1^{er} essai et le surnageant1 du même essai. Ce résultat doit être approfondi et étoffé par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin d'évaluer leur poids moléculaire et éventuellement le nombre de sous unités.

7. L'effet de pH sur l'hémagglutination :

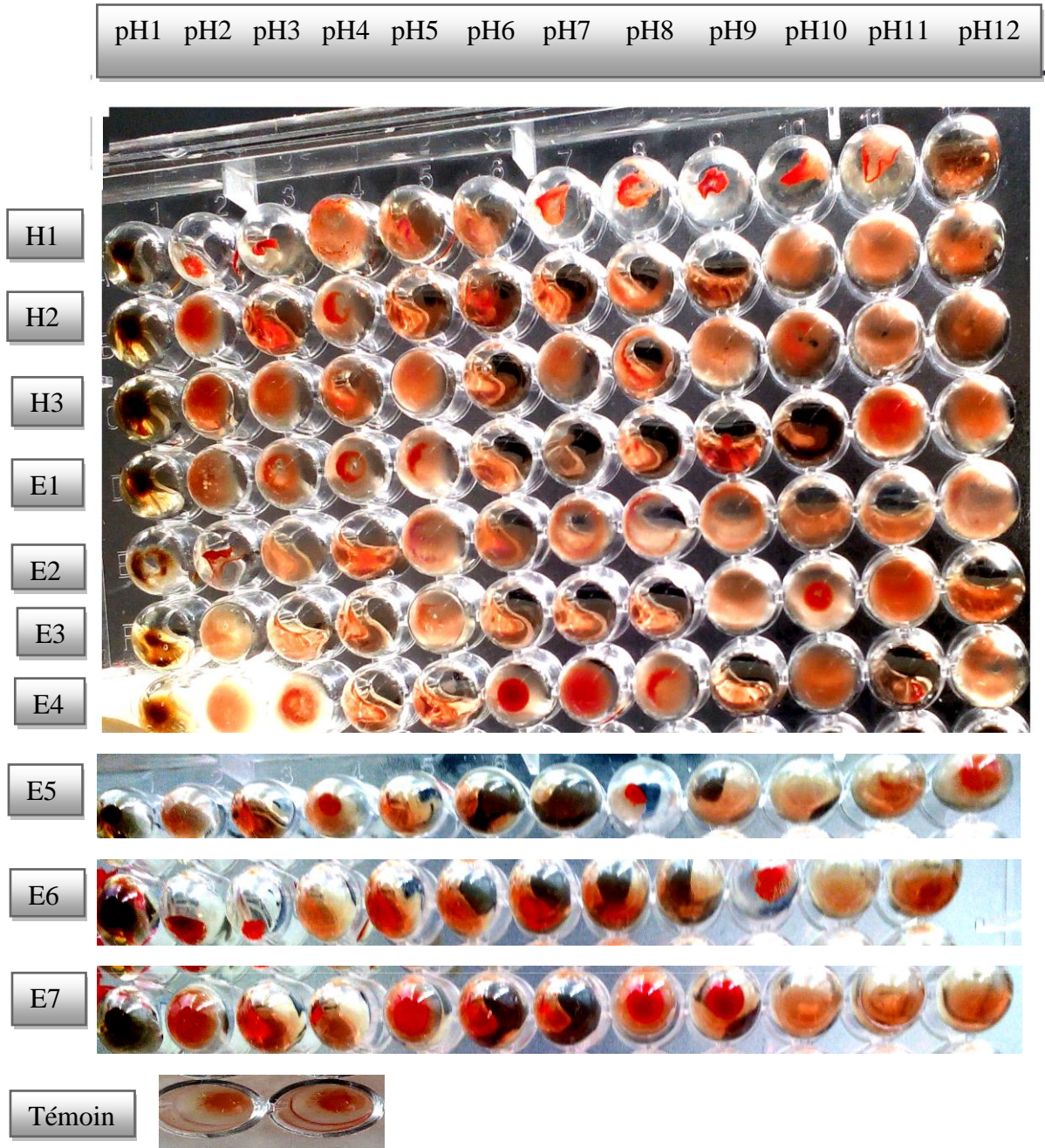


Photo 5 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des fractions

Tableau 17 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction.

PH \ FRACTIONS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H1	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
H2	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++		-	-	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E7	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-

+++ : Forte agglutination.

- : Absence d'Agglutination.

H1 : L'ensemble des fractions F1 à F5 de l'homogénat après la chromatographie.

H2 : L'ensemble des fractions F8 et F9 de l'homogénat après la chromatographie.

H3 : La fraction F11 de l'homogénat après la chromatographie.

E1 : L'ensemble des fractions F1 et F2 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E2 : L'ensemble des fractions F4 et F5 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E3 : L'ensemble des fractions F8 à F12 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E4 : La fraction F1 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E5 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie

E6 : L'ensemble des fractions F1 à F4 de surnageant 1 après la chromatographie.

E7 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de surnageant 1 après la chromatographie.

❖ Les fractions H2, E1 et E7 révèlent une activité d'agglutination stable dans un intervalle allant de [3 à 8], avec une perte totale d'activité hémagglutinante à pH 1 à 2 et pH 9 à 12, ce résultat comparé à ceux de **Shaista *et al.*, (2014)** qui ont montré que la lectine d'*Euphorbia helioscopia* perd son activité hémagglutinante plus rapidement à pH bas et reste active dans un intervalle de pH de 6-8.

Les fractions H1 et E4 ont été remarquablement stables dans la gamme du pH de 7 à 9, par contre de [1 à 6] et [10 à 12] l'agglutination est nulle, contrairement aux autres lectines comme celle de **Sun *et al* (2011)** qui est montré que la lectine d'haricot (*Arachis hypogoea*) est stable à pH compris entre 5 et 11. Les autres fractions ne possèdent aucune activité hémagglutinante.

8. L'effet de la température sur l'hémagglutination :

Les résultats obtenus après l'exposition de nos fractions à différentes températures sont présentés dans le tableau 18.

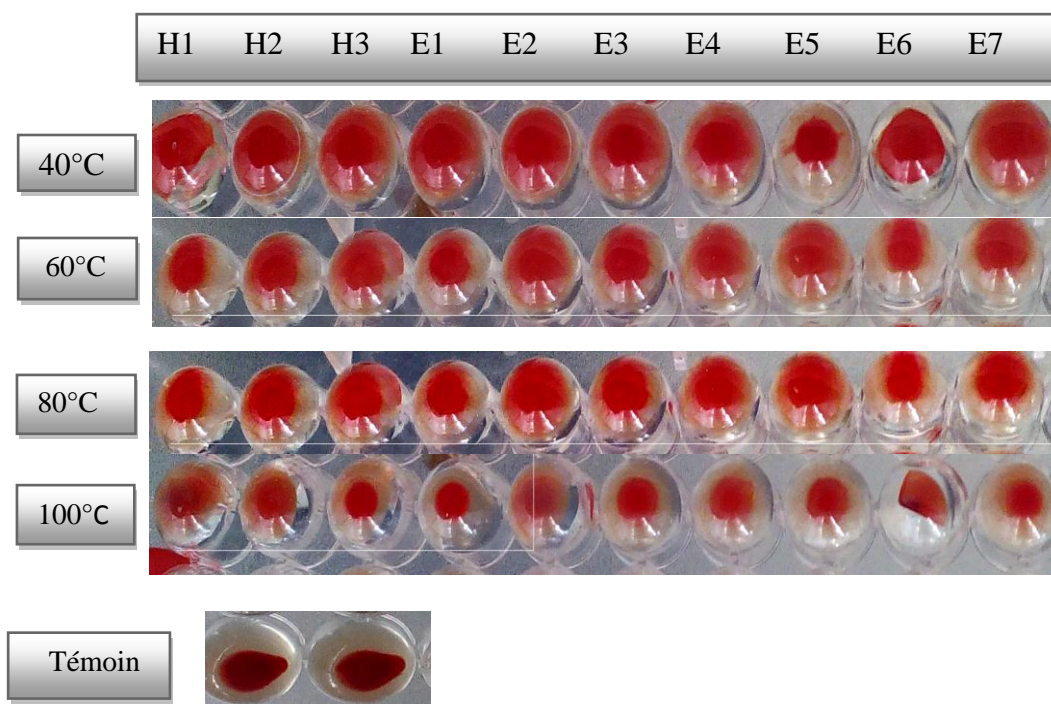


Photo 6 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des fractions

Tableau 18 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des fractions.

	H1	H2	H3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
40°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
60°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
80°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100°C	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Forte agglutination

- : Absence d'agglutination.

H1 : L'ensemble des fractions F1 à F5 de l'homogénat après la chromatographie.

H2 : L'ensemble des fractions F8 et F9 de l'homogénat après la chromatographie.

H3 : La fraction F11 de l'homogénat après la chromatographie.

E1 : L'ensemble des fractions F1 et F2 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E2 : L'ensemble des fractions F4 et F5 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E3 : L'ensemble des fractions F8 à F12 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E4 : La fraction F1 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E5 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E6 : L'ensemble des fractions F1 à F4 de surnageant 1 après la chromatographie.

E7 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de surnageant 1 après la chromatographie.

❖ Lors de leur exposition à différentes températures de 40°C, 60°C et 80°C durant 1h, les fractions gardent toujours leur activité d'agglutination, avec une perte partielle d'activité à 100°C.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de température sur les lectines :

Cao et al (2010) ont montré que la lectine *Musca domestica* est stable jusqu'à 65°C pendant 60min.

Suseelan et al (1997) ont montré que la lectine de *Vigna mungo* est stable à 50°C pendant 60min.

9. Le test d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides :

Le test d'inhibition a été réalisé afin de terminer la spécificité des lectines présentes au niveau des échantillons en utilisant les sucres simples.

L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer les sucres ajoutés plutôt que celui se trouvant dans les hématies.

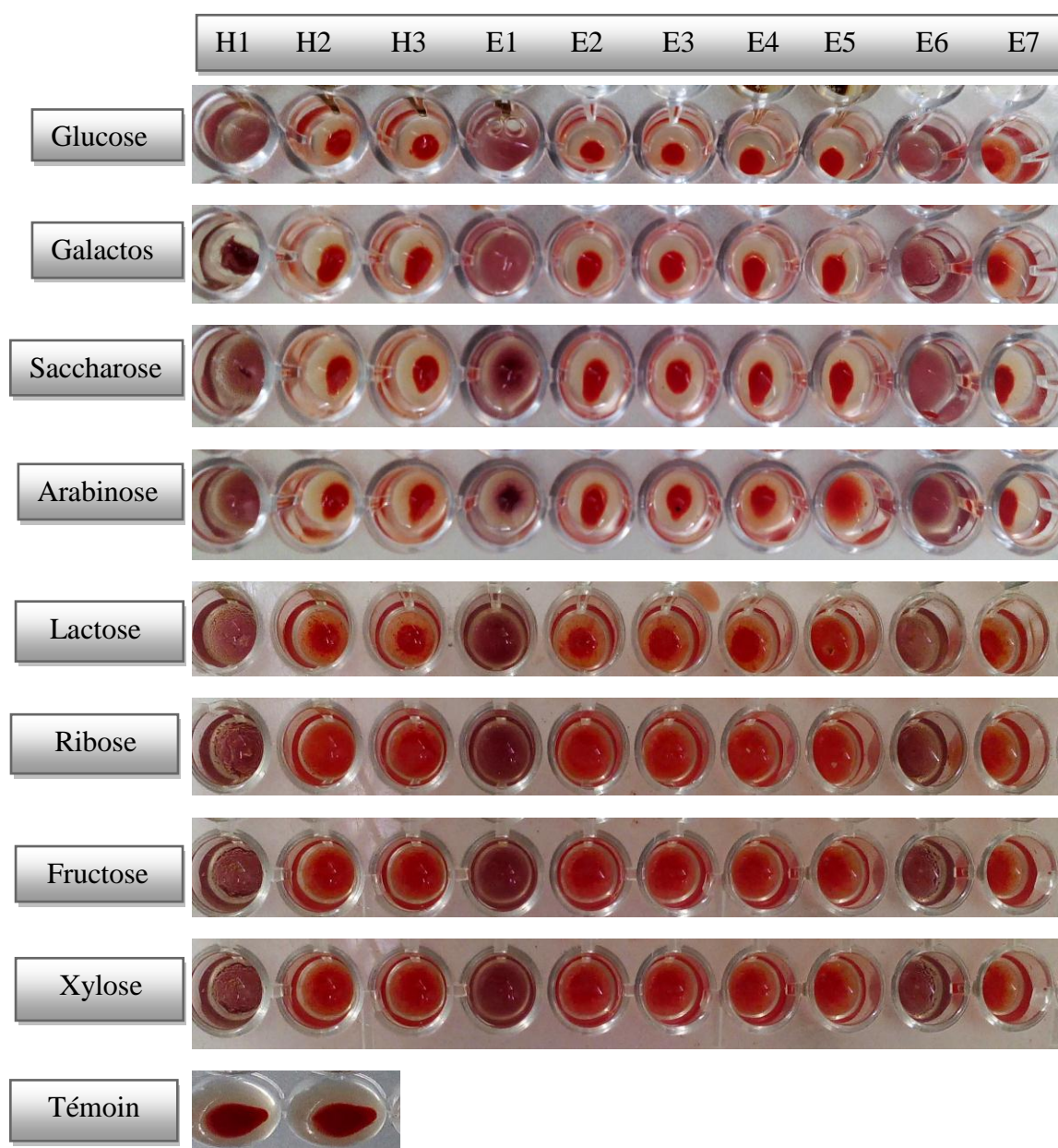


Photo 7 : L'effet des sucres simples sur l'activité hémagglutinante des fractions

Les résultats obtenus ont été décrit dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples.

	H1	H2	H3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Glucose	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Galactose	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Saccharose	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Arabinose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ribose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

+ : Hémagglutination.

- : Absence d'hémagglutination.

H1 : L'ensemble des fractions F1 à F5 de l'homogénat après la chromatographie.

H2 : L'ensemble des fractions F8 et F9 de l'homogénat après la chromatographie.

H3 : La fraction F11 de l'homogénat après la chromatographie.

E1 : L'ensemble des fractions F1 et F2 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E2 : L'ensemble des fractions F4 et F5 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E3 : L'ensemble des fractions F8 à F12 de culot' du 1^{er} essai après la chromatographie.

E4 : La fraction F1 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E5 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de culot' du 2^{ème} essai après la chromatographie.

E6 : L'ensemble des fractions F1 à F4 de surnageant 1 après la chromatographie.

E7 : L'ensemble des fractions F10 à F12 de surnageant 1 après la chromatographie.

Les fractions H1 et E6 ne présentent aucune spécificité pour les saccharides testés en raison de l'hémagglutination observée en présence de tous nos monosaccharides.

La fraction E5 montré une hémagglutination en présence d'arabinose, de ribose et de fructose.

La fraction E7 montré une hémagglutination en présence de glucose, de ribose, de fructose et de xylose.

Le fructose et le xylose non aucun effet sur le pouvoir hémagglutinant de toutes nos lectines (*Ricinus communis*).

Ce type d'inhibition est d  à l'occupation du site ou des sites de reconnaissances par un ou plus de ces saccharides, Ces résultats sont similaires avec les lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (Valadez *et al.* 2011), des racines d'*Astragalus monghlicus* qui présentent une spécificité pour le D-galactose et le lactose (Lam *et Ng*, 2011).



Conclusion et Perspective

Conclusion et perspectives

Conclusion :

Dans le cadre de ces travaux de recherche nous nous sommes intéressés à la caractérisation partielle des lectines contenues dans les graines de ricin.

-Nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines en mettant en évidence leur forte activité hémagglutinante principalement dans l'homogénat, le surnageant 1, le culot' du premier essai et le culot' du deuxième essai.

-Les extraits de *Ricinus communis* sont stables dans la gamme de pH situés entre 3 à 9.

- L'effet du traitement thermique indique que les lectines de nos graines de *Ricinus communis* sont thermorésistants.

- Le test d'inhibition réalisé avec différents monosaccharides (glucose, galactose, saccharose, arabinose, lactose, ribose, fructose et xylose) montre que les lectines de *Ricinus communis* relatives aux fractions H2 et H3 (homogénat), E1, E2 et E3 (culot' du premier essai), E4(culot' du deuxième essai) présentent une absence d'hémagglutination franche en présence des sucres glucose, galactose, saccharose, arabinose, lactose et ribose, ce qui implique une spécificité évidente pour ces derniers sucres. (**Lorenzo et Lynne, 1998 ; Lombard et al., 2001; Kenigsberg et al., 2008 ; Garber, 2008; Cheema et al., 2010**).

On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides. Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Galactose se lient aussi au N-acétylgalactosamine. (**Sharon 2003**).

Un test mettant en évidence les limites d'hémagglutination en présence de ces sucres aurait été souhaitable pour déterminer la meilleure affinité de nos lectines vis-à-vis de ces sucres en question. Ce test est d'autant plus important car au cours des ces vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées. Elles sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. (**Yagi et al. 2002 ; Rudiger 2001**).

Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee 1995**).

Conclusion et perspectives

Perspectives :

Les perspectives de notre travail sont nombreuses et variées, et la poursuite des recherches sur ces lectines implique au préalable l'utilisation de techniques et méthodes capables de fournir une très bonne purification et caractérisation de ces glycoprotéines.

Tous ces paramètres pourraient mieux nous orienter pour l'évaluation du potentiel biologique et thérapeutique de ces lectines. Ce type d'étude et d'approche, encore marginal, gagnerait à être généralisé aux autres plantes de la flore de notre grand pays, jusqu'alors peu étudiés.



Références Bibliographiques

Référence bibliographique

Abdulazim, S.S., Salah, O. A.T., Munir, N. G. M., Shomaf. S. (1998).The Abortifacient effects of Castor Bean Extract and Ricin-A Chain in Rabbits. *Contraception*. 58: 193–197.

Agrawal et Golstein. (1965) la liaison spécifique de la concavaline A à des gels de dextrane réticulé. 24c

Alencar N.M ., Cavlcante C. F ., Vasconcelos M. P., Leite K.B., Aragao K. S., Assreuy A. M., Nogueira N. A., Cavada B. S., Vale M. R. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J PharmaPharmacol* **57**:919-922.

Anjani, K. (2005). Purple-coloured castor (*Ricinus communis* L.)-A rare multiple resistant morphotype. *Curr. sci.* 88(2) : 215-216.

Aslania , M.R ., Malekib ,M ., Mohria, M ., Sharifia,K ., Najjar,V. N ., Afshari ,E.(2007). Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon*. 49: 400–406.

ASSREURY A.M.S (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation*, 6, 201-210.

BABOSA T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95 (5), 673-678.

BANWELL J.G. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology*,, 84, 506-515

Berk (1993) technologie de production de farine alimentaire et de produit protéiques .FAO : 14

Bianchet M. A, Ahmed H., Vasta G. R, Amzel L.M. (2009) Structural aspects of lectin-ligand interaction In Vasta G0 R., Amzel L. M. *Animal lectins: a functional view*. TAYLOR&FRANCIS. LLC: 13-14.

Bird,g.(1951), plant and other agglutinins in the study or human red corpuscles in extract of *dolichosbiflorus*. *cunsci*, 20-29 bound to slex and psgl-1. *Cell*, 103, 467-479.

Borch-Jensen, C., Benny Jensen., Mathiasen, K., J.rgen, M. (1997). Analysis of Seed Oil from *Ricinus communis* and *Dimorphoteca pluvialis* by Gas and Supercritical Fluid Chromatography. *JAOCS*. 74(3): 277-284

Boyd, W. C. and E. Shapleigh (1954). "Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins)." *Science* 119(3091): 419.

Référence bibliographique

Cao X., Sun Y., Wang C., Zeng B. (2010) Purification and characterization of a new D-galactose specific lectin from the housefly, *Musca domestica*, and its antiproliferative Effect on human K562 and MCF-7 tumorcells. *Journal of Insect Science* **10(79)** :1-12

CHABROL. E., FIESCHI. F., GIRARD. E. (2012) caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langérine. Chimie et sciences du vivant. Université de grenoble., Pp : 63-64.

Cheema, N. M., Muhammad, A., Ghulam, Q., Malik, A. R. (2010). Characterization of castor bean genotypes under various environments using SDS6PAGE of total storage proteins. *Pak. J. Bot.* 42(3): 1797-1805.

Coopman, V., Marc, D. L., Cordonnier, J., Werner, J. (2009). Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.).*Forensic Sci. Internatl.*189:e13–e20.

Couplan, F., Styner, E. (1994). Guides des plantes sauvages : comestibles et toxiques (1994), Paris, pp : 367-368.

Dam TK and Brewer CF. (2002) Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry.*Chem. Rev.* (102): 387-429.

Delatorre P et al. (2006). Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J Struct Biol*, (154) 280-286.

Despott, E., Mario, J. C. (2004). A Case of Accidental Ricin Poisoning. *Malta Med.*16 (4) :39-41.

Edelman G.M, Cunningham B.A, Reeke G.N, Becker J.W, Waxdal M.J and Wang J.L. (1972) the covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* (69):2580-2584.

Edgar zenteno-galindo(1986) Études sur les lectines du cactus *machaerocereus eruca* et des graines d'*amaranthus leucocarpus* : caractérisation physicochimique et spécificité. **175.**

FALASCA A.I. (1989). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *Febs Lett.*, 246(1-2) 159 -162.

Franz, D. R., Nancy, K. J. (1997). Ricin Toxin. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, (Washington, DC: Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center), Chapter 32: 631-642.

Référence bibliographique

Garber, E. A. E. (2008). Toxicity and Detection of Ricin and Abrin in Beverages. *J. Fd Protect.* 71(9):1875–1883.

Garland, T., Bailey, E. M. (2006) Toxins of concern to animals and people. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 25(31):341-351.

Ghopkins W, evrard C-M.(2003). Physiologie végétale. DE BOECK, 1ère édition: 104-105.

Goker H., Haznedaroglu I.C., Ercetin S., et al. (2008) Haemostatic actions of the folcloric medicinal plant extract ankaferd blood stoper. *Jint. Med. Res* 36: 163-170.

GOLDSTEIN, I. J. & HAYES, C. E., (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plant and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35:127 340.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.

GOMES J.C (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. *Agent Action*, 41, 132-135

Grace, Q. C., Charlotta, T., Xiaohua, H., Tasha, N., Thomas, A. M., Laudencia-Chingcuanco.D. (2007). Expression Profiles of Genes Involved in Fatty Acid and Triacylglycerol Synthesis in Castor Bean (*Ricinus communis* L). *JAOCS Lipids*. 42 : 263–274

GRANT. G. (1991) Lectins. In toxic substances in crop plants.ed.by the royal Society oh Chemistry,. P: 339.

GUILLOT. J., GUERRY. M., KONSKA. G., CALDEFIE-CHEZET. F., DE LATOUR.M., PENAUT-LLORCA. F (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, 91: 141-158.

Hardman, K.D. and Ainsworth, C.F. (1972). Structure of concanavalin A at 2.4 a resolution. *Biochemistry*, (11) 4910-4919.

Hirabayashi, J. (2004) Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.*, 21, 35-40.

Ilavarasan, R., Moni, Subramanian, M., Venkataraman (2006).Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* root extract.*J. Ethnopharmacol.* 103: 478–480.

Référence bibliographique

Imberty, a. and varrot, a. (2008) microbial recognition of human cell surface.

Imberty, a., wimmerova, m., mitchell, e.p. and gilboa-garber, n. (2004) structures of the lectins from *pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan immobilized phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. j interactions by isothermal titration calorimetry. chem. rev., 102, 387-429. Interface. Science, 299, 405-408 its membrane poreformation mechanism. j. biol. chem., 279, 37133-37141.

IMBERTY. A., MITCHELL. E. P., WIMMEROVÁ. (2005) M. Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 525-534.

JAFFE W.G (1980). hemagglutinins (Lectins). In toxic constituents of plant foodstuffs. New –York, Academic Press, P: 502.

Kamoun P.(2003) .Oses et Polysaccharides In *Biochimie et Biologie Moléculaire.* Médecin-Sciences/Flammaration : 62.

Karoline S.A., (2008) : études structure –fonction de lectines (Disc I et Disc II) de *Dictyostelium discoideum*. Thèse pour l’obtention du Diplôme de docteur de l’université Joseph Fourier. Université Grenoble 1- Joseph Fourier.

Kenigsberg , J. D., Agnès, B., Eric A.E. G (2008). Rapid detection of ricin in cosmetics and elimination of artifacts associated with wheat lectin. *J. Immunol Meth.* 336: 251–254.

KENOTH. R (2001). Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichsanthes cucumerina* seed lectin. *Eur. J. Biochem,* 268: 5541-5549.

Korcheva, V., Wong, j., Meghan, Li., David, B. J., Mihail, S. I., Bruce, M(2007).Role of apoptotic signaling pathways in regulation of inflammatory responses to ricin in primary murine macrophages. *Mol. Immunol.* 44: 2761-2771.

KULKARNI G.V (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell.Research,* 245,170-178.

Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes beninoises. Thèse doctorat .Université Louis Pasteur, Strasbourg.

LAM. S. K., NG. T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol,* 89: 45-55.

Référence bibliographique

LEE, Y.C. and LEE, R.T. (1995) Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.

LEFFLER H. CARLSSON S.HEDLUND M.QIAN Y.et POIRIER F.(2004).introduction to galectins *Glycoconj.*19,433-440.

Lendent, C., Mairesse, M. (2008).Rural allergy. *Rev. Franç. Allergol. Immunol. Clin.*48 (2):109-110.

LENKA. S., IMBERTY. A., JAROSLAVE. K. (2006) modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire. Université de Grenoble I. France.*, Pp 56-58.

Leo, W. D. V. R., Vancutsem, J., Jan Sten, J. (2009).A survey on the presence of Undesirable botanical substances in feed in the European Union. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*13(S):33-38.

LIENER, I. E.; SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J., (1986). The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, Orlando, FL. pp: 600.

Lis H., Sharon N. (1998) Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev* 98: 673-674.

Little, E.L., Wadsworth, F.H. (1974). Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Agriculture Handbook*. 449. U.S. Depart. Agricul. Forest. Serv. Washington,DC. 2.

Lombard, S., Helmy, M. E., Piéroni, G.(2001). Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J.* 358: 773- 781.

LOPEZ S (2003). Anti-humain immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta medica*,69 (2), 109-112

Lord, Michael J., L. M. Roberts, and J. D. Robertus. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 8: 201-208.

Lorenzo, F., Lynne, M. R. (1998) the enemy within: ricin and plant cells. *Experim. Bot.* 49 (326):1473–1480.

Malathi, B., Ramesh, S., Venkateswara, K. R., Dashavantha, V. R. (2006).

Agrobacterium-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). *Euphytica*. 147: 441–449.

Maroyi, A., (2007). *Ricinus communis* L. In : van der Vossen, H.A.M. & Mkamilo, G.S. (Editeurs). PROTA 14 : Vegetable oils/Oleagineux. PROTA, Wageningen, Pays Bas.

Référence bibliographique

Montfort, W ., Jesus, E. V., Arthur, F. M ., Stephen, R. E ., Betsy Katzing., Earl, R., Nuyhen, H. X., R on Hamlin., Robertus, J.D. (1987).The Three-dimensional Structure of Ricin at 2.8 Ao. *Biolog. chemist.* 262(11):5398-5403.

MURDOCK. L. L., SHADE. R. E (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectects. *J. Agric. Food. Chem.,* 50 (22) : 6605-661.

Myoshim. Et Al (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. vitaminol,* 28, 255-264.

NACHBAR M.S., OPPENHEIM J.D (1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 33, 2238 -2345.

Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H and Boulahrouf K. (2014).Comparative Study of a new lactin extrated from roots of plants: *Cyperus rotundus, Pistacia lentiscus and Ruta Graveolens.* Volume 4, Issue 1, 1720-1733

N'guessan, K., Kouassi Konan, E ., Kouadio, K. (2009).Ethnobotanical Study of Plants Used to Treat Diabetes, in *Traditional Medicine,* by Abbey and Krobou People of Agboville (Cote-d'Ivoire). *Amer Sci Res.* 4: 45-58.

O'Connell, K.P., Menuey, B.C.,Foster,D.(2002). Issues in preparedness for biologic terrorism: a perspective for critical care nursing. *AACN Clin.* 13: 452-69.

Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008) Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.,* 37, 1579-1591.

Paul, C.J. Van, R., Lynell, K. T. (1999) .The contribution of extrafloral nectar to survival and reproduction of the predatory mite *Iphiseius degenerans* on *Ricinus communis*. *Exper. Appl. Acarol.* 23: 281–296.

Peumans W.J., Van Damme J.M. (1995)-lectine as plant defense proteins. *PlantPhysiol.,* 109,347-352.

Poonam, S., Prachi, A., Krishna Murali, Y., Vibha, T.(2008) .Antidiabetic activity of 50% ethanolic extract of *Ricinus communis* and its purified fractions. *Fd Chem. Toxicol.* 46: 3458–3466.

Pusztai .a. (1991),plantlectins chemistry and pharmacology of natural products cambridge (gbr) .cambridge University press 253.

Référence bibliographique

Qin pan, hongming pan, haizhou lou, yinghua xu and lutian (2013) inhibition of the angiogenesis and growth of aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. *Recognition. microb. Infect.*

RABIA. H. (2014) Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 27(6): 1805-1810.

RAMATA. N. (2010) Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines d'*Abrus precatorius L.* la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako,. Pp: 8-24.

Ramprasad, R., Bandopadhyay, R. (2010) .Future of *Ricinus communis* after completion of the draft genome sequence .*Curr. sci.* 99(10): 1316-1318.

Rao, M. U., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Jaganmohan Reddy, K., Madhusudhana Chetty, C. (2010). Herbal Medicines for Diabetes Mellitus: A Review. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2(3) : 1883-1892.

RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G. (2011) Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel*. *Biologie Structurale et Nanobiologie.* France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, p: 11.

RENATO DE A, MOREIRA (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Suppl. II, 211-218.*

RRENKONEN K. O. (1948). Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, 26: 66.

RUDIGER, H. and GABIUS, H.J., (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J*, 18, 589-613.

RUDIGER.H (1993). Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology.* Springer, Berlin,. Pp: 31-46.

Sailaja, M., Tarakeswari, M., Sujatha, M. (2008). Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis L.*) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell. Rep.* 27: 1509–1519.

SAUVION., (1995) effets et modes d'actions de deux lectines à mannose sur le puceron du pois. *Acyrtosiphonpisum (harris)*. Potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégies de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. *64 (9),45-47*

Référence bibliographique

Seufi al, galal fh ET hafez ee. (2012). caractérisation of multisugar-binding ctype lectin (splilec) from a bacterial-challenged cotton leafworm, *spodopteralittoralis*. *journal.pone*, 7(8), 0042795

SHAISTA. R., SAKEENA. Q., ISHFAK. H. W., SHOWKAT. A. G., AKBAR. M., RABIA. H. (2014). Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 27(6): 1805-1810

SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.

SHARON, N., and HALIMA, LIS. (2003) Lectins. Kluwer Academic Publishers.

SHARON, N., LIS, H. (1989). Lectins. Chapman and Hall, London.

SHARON. N. (1996) Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 408: 1-8.

SHARON. N., LIS. H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53-62.

Stillmark. H, (1888), Uber Ricin, ein giftiges ferment aus dem samen vons *Ricinus communis* L. und einengen anderen Eupharbiaceen, inaugural dissertation, Dorpart,.

Sun J., Yong Q-l., Bi J., Zhang C-S., Yu L-N., Zhu F (2011). Purification and Identification of a natural lectin from the the seed of Peanut *Arachis hypogaea*. *The open Materials Sciences Journal*. 5: 78-82.

Suseelan K. N., Bhatia C. R., Mitra R. (1997) Purification and characterization of two major lectins from *Vingo mungo* (blackgram). *J. Biosci* 22: 439-455.

Tully, R. E. & Beevers, H. (1976). *Plant Physiol.* 58, 710-716.

V ALADEZ. V. C., GUZMAN. P. A., JAVIER SOTO. C. F., ÁLVAREZ. M. G., MORALES. G. J., MADRIGAL. S. E., JOSE ROBERTO VILLAGOMEZ. I. J. R., ZUÑIGA. P. C., JOSE GUTIERREZ. S. J., BECERRIL. F. M. (2011à. Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules.*, 16: 2561-2582.

VALENTINER U. et al (2003). The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.*, , 23 (2B), 1197-1206

Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rougé P (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 575-692

Référence bibliographique

Van Liempt, E., et al. (2006) Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett*, 580, 6123-6131.

Volkshard, S., Nogueira, D.S. (2007) .Castor oil as a fuel: Facts, Perspectives and Risks. *Engenhari Agricultur.* 15(2):168-172.

WANG H., NG T.G. (1998) - Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*, , 253, 143- 146

Warburg ET Christian W, (1941). Isolierung-und Kristallisation des garungsferments Enolase. *Biochem.Z.*, 310,384-421.

Witchard, M. (1997). Paclobutrazol Is Phloem Mobile in Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L). *J. Plant Grow. Regul.* 16: 215–217.

YAGI, F., TIWAYA, T. HARAGUCHI and I.J. GOLDSTEIN, (2002). The Lectin from leaves of Japanese cycad. *Cycas revolute* Thumb. (Gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *Eur. J. Biochem.*, 269: 4335-4341.

Zitouni A, Bahi A, Necib Y. (2015) Immunomodulatory Activity of Lectins Extracted from *Terfezia bouderei*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 50:285-287.

ZUÑIGA. P. C., JOSE GUTIERREZ. S. J., BECERRIL. F. M. (2011) Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules.* 16: 2561-2582.

[1]: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ac/Ricinus_communis.

Annexe

Annexe

Annexe 01 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (10 mM pH =7,2).

Le produit chimique :	La concentration :	Quantité :
L'eau distillée	-	1 litre
Na ₂ HPo ₄	10mM	1.44g/l
KH ₂ HPO ₄	2mM	0.24g/l
NaCl	137mM	8g/l
KCL	2.7mM	0.2g/l

Annexe 02 : Préparation de NaCL (chlore de sodium à 0,9%).

NaCL	L'eau distillée
0.9g	100ml

Annexe 03 : La préparation des monosaccharides.

Le sucre	L'eau distillée
100 mg	1 ml

**Thème : Extraction et caractérisation partielle des lectines de
*Ricinus communis***

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie moléculaire et santé

Les lectines sont des glycoprotéines qui peuvent être d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale.

Le but de cette recherche consiste en une caractérisation partielle des lectines extraites à partir des graines de ricin (*Ricinus communis*).

Dans notre étude, nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines en mettant en évidence leur activité hémagglutinante.

Cette activité hémagglutinante de *Ricinus communis* est stable dans la gamme de pH allant de 3 à 9. Le traitement thermique des lectines de *Ricinus communis* a été révélé une thermorésistante atteignant 100°C pour leur inactivation.

Le test d'inhibition réalisé avec différents monosaccharides montre qu'il y'a une spécificité pour le glucose, galactose, saccharose, arabinose, lactose et le ribose.

Mots clés : Lectines, glycoprotéines, *Ricinus communis*, activité hémagglutinante, monosaccharides.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie, Département de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, **Université Frères Mentouri Constantine.**

Jury d'évaluation :

Président du jury :	KHELIFI D.	(Pr- UFM Constantine),
Rapporteur :	ZITOUNI A.	(Pr -UFM Constantine),
Examineur :	NECIB Y.	(Pr- UFM Constantine),

Date de soutenance : 28/06/2016

