



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 والحياة

**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**

Intitulé :

**Spécialité : *Biochimie Moléculaire et santé***

**L'extraction des lectines à partir des racines de deux plantes  
médicinales (*Eucalyptus globulus et Pinus sylvestris*)**

Présenté et soutenu par : LEDJASSA Ahmed  
LOUAAR Boubaker

Le : 14-06-2017

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** NECIB Y

(Pr-UFM Constantine)

**Rapporteur :** BAHI A

(MCB-UFM Constantine)

**Examineur :** DJEMAI ZOUGHLACHE S

(MAA-UFM Constantine)

*Année universitaire*

**2016 – 2017**

## Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Dr BAHY Ahlem Maitre de conférence au département de Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine, qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ces encouragements, sa gentillesse nous sommes très honoré de travailler avec elle*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire : A notre président du jury Monsieur Necib.Y professeur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à L' Université des Frères Mentouri Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.*

*A l'examinatrice Dr DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia Maitre assistante à l'université des frère Mentouri, nous somme fière que vous avez acceptez d'examiner et de juger notre travail Sans oublier de remercier nos très chers parents.*

*Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs connaissances et leurs conseils.*

*Merci*

## *SOMMAIRE*

# SOMMAIRE

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	

Introduction

## Etude bibliographique

### Chapitre 1 : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines.....	1
2. Historique.....	2
3. La structure des lectines.....	5
3.1. Les lectines simple.....	5
3.2. les lectines en mosaïques.....	5
3.3. Les assemblages macromoléculaires.....	6
4. Les sites de liaisons des lectines.....	7
5. La spécificité et l'affinité des lectines.....	7
6. LaClassification des lectines.....	9
6.1. Chez les animaux.....	9
a. Les lectines extracellulaires.....	9
b. Les lectines intracellulaires.....	9
6.2. Chez les végétaux.....	9
a) Les mérolectines.....	9
b) Les hololectines.....	9
c) Les chimérolectines.....	10
d) Les superlectines.....	10
7. Distribution des lectines dans le monde de vivant.....	10
7.1. Les lectines animales.....	11
7.2. Les lectines des plantes.....	12
7.3. Les lectines des microorganismes.....	13

8. Fonction biologique des lectines.....	14
8.1. Chez les plantes .....	14
8.2. Chez l'homme.....	14
<b>9. Propriétés des lectine .....</b>	<b>15</b>
9.1. L'interactionlectine–glucide .....	15
9.2. L'agglutination des cellules .....	15
9.3. L'activités mitogène .....	15
9.4. Effets mimétiques des hormones .....	16
9.5. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses .....	16
9.6. La propriété antivirales .....	16
9.7. La propriété antibactérienne .....	16
9.8. Autres propriétés.....	17
<b>10. L'intérêt des lectines .....</b>	<b>17</b>
10.1. En biochimie et protéomique .....	17
10.2. Dans le domaine biomédical .....	18
Hématologie .....	18
b) Immunologie .....	18
c) Biologie cellulaire .....	18
d) Cancérologie.....	18
10.3. Dans le domaine agronomique.....	19
<b>11. Le rôle des lectines dans l'immunité .....</b>	<b>19</b>

## **Chapitre II : Le système sanguin**

1. Historique .....	20
2. Le système ABO .....	20
3. Facteur rhésus.....	21
4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO .....	21

## **Chapitre III : Généralités sur les plantes**

<b>I. <i>Eucalyptus globulus</i> .....</b>	<b>23</b>
1. Origine du nom : .....	23
2. Noms communs :.....	23
3. La description botanique de la plante:.....	23
4. Classification d' <i>Eucalyptus globulus</i> :.....	24

5.	Les propriétés médicinales :.....	25
<b>II.</b>	<b><i>Pinus sylvestris</i></b> .....	<b>26</b>
1.	Description botanique de la plante (Naturactive) :.....	26
2.	Classification de pin:.....	26
3.	Propriétés médicinales : .....	27

## **Matériels et méthodes**

I.	Matériels et méthodes des tests phytochimiques.....	28
II.	Les méthodes.....	29
1.	La Préparation des plantes.....	29
2.	l'extraction des plantes.....	30
3.	Le test d'hémagglutination.....	32
4.	La limite d'hémagglutination.....	33
5.	L'effet de la température sur l'hémagglutination .....	33
6.	L'effet du pH sur l'hémagglutination.....	33
7.	Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.....	33
8.	Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides.....	33
9.	test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.....	34
10.	Le test des métaux.....	34
11.	L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.....	34

## **Résultats et discussion**

1.	Le test d'hémagglutination .....	35
2.	La limite d'hémagglutination.....	36
3.	L'effet de la température sur l'hémagglutination .....	37
4.	L'effet du pH sur l'hémagglutination .....	38
5.	L'effet d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et glycoprotéines.....	39
6.	L'effet de limite d'inhibition d'hémagglutination par les glycoprotéines .....	41
7.	L'effet d'agglutination sur les hématies humaines ABO.....	43
8.	L'effet des métaux (oligoéléments) .....	44
9.	L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 .....	46
	<b>Conclusion et perspective.....</b>	<b>48</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>49</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>62</b>

## RÉSUMÉS

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques. Notre étude est basée sur la recherche d'extraction, et d'étudier les différentes spécificités des lectines contenues dans les racines des deux plantes médicinales *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*. Par le test d'hémagglutination et leur étude biologique. L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon suivie par la chromatographie sur colonne.

L'activité hémagglutinante de *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* a été de 1:10 (2048) et de 1:9 (1024) respectivement, le traitement thermique des lectines de *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour leur inactivation. L'activité hémagglutinante de deux plantes reste stable toute au long de la gamme de pH testée de 1 jusqu'à 12 pendant une heure. Un test d'inhibition avec différents monosaccharides et glycoprotéines qui a montré que les lectines de *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* sont spécifiquement et seulement inhibées par les glycoprotéines : Fétuine, caséine, BSA et Fétuine respectivement. Un test des métaux a été réalisé et qui a démontré que nos lectines ne comptent pas sur les métaux comme cofacteur pour agglutiner les érythrocytes.

Pour le test d'ABO, les lectines extraites de nos plantes ne possèdent aucune sélectivité vis-à-vis des groupes sanguins humains.

La purification sur colonne de Sephadex G75 ont montrés un seul pic pour *Eucalyptus globulus* correspondre au 1<sup>er</sup> tube et *Pinus sylvestris* correspondre au 2<sup>ème</sup> tube.

**Mots clés :** Lectines, Extraction, Hémagglutination, Système ABO, Inhibition, Sucres, monosaccharides, glycoprotéines

## المخلص

تعد الليكتينات من عائلة البروتينات والبروتينات السكرية الغير متجانسة والقابلة للتعرف على السكريات قليلة التعدد و السكريات المتعددة.

الغرض من هذا البحث هو استخلاص و دراسة مختلف خصائص الليكتينات المستخلصة من جذور نبتتين طبييتين من *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* وهذا من خلال اختبار التراص و دراسته البيولوجية.

وجاء هذا الاستخراج عن طريق طحن والنقع في محلول ملحي ثم تمريرها عبر الكروماتوغرافي العمودي

أبدى مستخلص *Eucalyptus globulus* حدة تراص تقدر ب (2048)1/10

في حين أبدى مستخلص *Pinus sylvestris* حدة تراص تقدر ب (1024) 1/9

المعالجة الحرارية لكل من المستخلصين ابتداء من درجة حرارة 40° حتى 90° لم يكن كافيا لتثبيطهما. يبقى النشاط التراص للمستخلصين مستقر عند جميع درجات الحموضة المختبرة من 1 إلى 12 لمدة ساعة واحدة،

اختبار تثبيط مع السكريات الأحادية وبروتينات سكرية المختلفة التي أظهرت أن ليكتينات *Eucalyptus globulus* و *Pinus sylvestris* تثبط على وجه التحديد ببروتينات سكرية: Fétuine، Caséine، BSA و Fétuine على التوالي. تم إجراء اختبار المعادن وأثبتت أن الليكتينات لدينا لا تعتمد على المعادن بمثابة العامل المساعد للالتصاق في كرات الدم الحمراء.

لاختبار نظام ABO، الليكتينات المستخرجة من النباتات لدينا لا تمتلك أي انتقائية مع فصائل الدم البشرية.

وقد أظهر الاستخلاص باستخدام Sephadex G75 الحصول على ذروة واحدة مع كلا المستخلصين.

الكلمات المفتاحية: الليكتينات ، استخلاص ، نشاط التراص ، تثبيط ، سكر احادي و متعدد السكريات ، نظام ABO ، بروتينات سكرية .

Lectin form a family of heterogeneous proteins and glycoprotein that recognize certain oligosaccharide structures. Our study and research-based extraction, and study the different specificities of lectin contained in the bark of both medicinal plants *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*. By haemagglutination test and their biological study. The extraction was carried out by grinding and maceration in a buffer solution followed by column chromatography.

The haemagglutinating activity *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* was 1:10 (2048) and 1: 9 (1024), respectively, heat treatment of *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* lectin, from 40°C to 90 ° C, The haemagglutinating activity of two plants remained stable throughout the pH range tested from 1 to 12 for one hour. An inhibition test with different monosaccharides and glycoproteins showed that Lectin of *Eucalyptus globulus* and *Pinus sylvestris* were specifically and only inhibited by the glycoproteins: fetuin, casein, BSA and fetuin respectively. A metal test was carried out and demonstrated that our lectin do not rely on metals as cofactor for Agglutinated erythrocytes.

For the ABO test, the lectin extracted from our plants does not possess any selectivity with respect to human blood groups.

Purification on a Sephadex G75 column showed a single peak for *Eucalyptus globulus* corresponding to the 1st tube and *Pinus sylvestris* corresponds to the 2nd tube.

**Key words** :Lectin, Extraction, Agglutination, ABO system, Inhibition, Sugars, monosaccharides, glycoprotein .

*LISTE DES ABREVIATIONS*

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Con A** : Concavaline A lectine

**ConBr** : Lectine de Canavaliabrasiliensis

**EUC** : *Eucalyptus globulus*.

**Man**: Mannose

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PIN** : *Pinus sylvestris*.

**R** : rhésus

**VIH** : human immuno deficiency virus

*LISTE DES TABLEAUX*

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : les lectines et leurs applications .....	1
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines .....	3
Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines.....	8
Tableau 04 : Les Lectines spécifiques des groupes sanguins.....	22
Tableau 05 : Classification classique d' <i>Eucalyptus globulus</i> . ....	24
Tableau 06 : Taxonomie du <i>Pinus sylvestris</i> conformément au système d'information taxonomique intégré (SITI).....	27
Tableau 07:L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Pinus sylvestris</i> . ....	35
Tableau 08 : L'Activité de la limite d'hémagglutination d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> .....	36
Tableau 09 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Pinus sylvestris</i> . ....	37
Tableau 10 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Pinus sylvestris</i> <i>Eucalyptus globulus</i> .....	38
Tableau 11 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples et glycoprotéine d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	39
Tableau 12 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples et glycoprotéine d' <i>Pinus sylvestris</i> .....	40
Tableau 13: Les concentrations minimales en BSA, Caséine, Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait <i>Eucalyptus globulus</i> .....	42
Tableau 14: Les concentrations minimales en Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait <i>Pinus sylvestris</i> .....	42
Tableau 15: L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> .....	43
Tableau 16 : les Résultats du test des métaux avec <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> .....	44

*LISTE DES FIGURES*

## LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de <i>canavali ensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde .....	5
Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique .....	6
Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i> .....	6
Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides ....	7
Figure 05 : La classification structurale des lectines des plants .....	10
Figure 06 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) .....	11
Figure 07 : Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavaliamaritima</i> complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) .....	12
Figure 08 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO .....	21
Figure 09 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racin aires des plantes .....	31
Figure 10: Courbe représenté la Filtration d'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> sur colonne de Sephadex G75 .....	46
Figure 11: Courbe représenté la Filtration d'extrait de <i>Pinus sylvestris</i> sur colonne de Sephadex G75 .....	47

*LISTE DES PHOTOS*

## LISTE DES PHOTOS

Photo 01 : Photographie d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	24
Photo 02 : Photographie <i>Pinus sylvestris</i> .....	26
Photo 03 : Photographie d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	28
Photo 04 : Photographie <i>Pinus sylvestris</i> .....	28
Photo 05 : Les racines sèches des deux plantes médicinales <i>Eucalyptus globulus</i> (A) , <i>Pinus sylvestris</i> (B).....	29
Photo 06 : poudre des deux plantes médicinales <i>Pinus sylvestris</i> (A) , <i>Eucalyptus globulus</i> (B) .....	30
Photo 07 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> (A) et <i>Pinus sylvestris</i> (B).....	35
Photo 08: test de la limite d'hémagglutination d' <i>Eucalyptus globulus</i> (A), <i>Pinus sylvestris</i> (B) .....	37
Photo 09: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> (A) , <i>Pinus sylvestris</i> (B).....	38
Photo 10 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Pinus sylvestris</i> (A) <i>Eucalyptus globulus</i> (B).....	38
Photo 11 : Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i> par les sucres et glycoprotéines .....	40
Photo 12: Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de <i>Pinus sylvestris</i> par les sucres et glycoprotéines .....	41
Photo 13: Les concentrations minimales en BSA(A),Caséine(B) et la Fétuine(C) provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait <i>Eucalyptus globulus</i> .....	42
Photo 14 : Les concentrations minimales en Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait <i>Pinus sylvestris</i> .....	43
Photo 15 : L'agglutination des hématies humaines (A, O) par l'extrait brut d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> .....	44
Photo 16 : L'agglutination des hématies humaines ( AB , B ) par l'extrait brut d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> .....	44
Photo 17: L'agglutination de lectines de <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Pinus sylvestris</i> après l'incubation avec EDTA.....	45
Photo 18 : L'agglutination de lectines de <i>Eucalyptus globulus</i> (A) et <i>Pinus sylvestris</i> (B) avec les métaux testés.....	45

# INTRODUCTION

Les lectines constituent un groupe de protéines ou de glycoprotéines d'origine non-immunitaire, qui se lient de façon réversible aux hydrates de carbone et le plus souvent agglutinent les cellules ou précipitent les polysaccharides et des glycoconjugués. (**Goldstein et al, 1980**).

Les lectines ont été redéfinies par Peumans & Van Damme (1995) en tant que protéines possédant au moins un domaine non catalytique, qui se lie de façon réversible à un mono ou oligosaccharide spécifique. Toutefois, selon Cummings (1997), des protéines à activité enzymatique liés à des hydrates de carbone ne peuvent être considérés comme des lectines. En conséquence de leurs propriétés chimiques, ils sont devenus un outil dans plusieurs domaines de la recherche biologique (immunologie, biologie cellulaire, structure de la membrane, recherche sur le cancer et le génie génétique). Les lectines sont présentes dans un large éventail d'organismes de la bactérie aux animaux, étant présentes dans toutes les classes et les familles, mais pas dans tous les genres et espèces (**Lis et Sharon, 1994**). Beaucoup de plantes à fleurs de groupes taxonomiques divers s'accumulent de grandes quantités de ce qu'on appelle VSP (végétatif stockage protéines) dans divers organes de stockage végétatif. Ces VSP jouent un rôle primordial dans l'accumulation d'azote, le stockage et la distribution dans les plantes bisannuelles et vivaces, et en conséquence, on pense à contribuer à la survie de la plante dans son environnement naturel (**Staswick, 1994**). En outre, certains VSP avec une activité enzymatique particulière ou autre activité biologique agissent comme des protéines de défense contre les animaux herbivores spécifiques ou des invertébrés phytophages par exemple, et peut donc jouer un double rôle de stockage / défense ( **Peumans et Van Damme, 1995 ; Yeh et al, 1997**).

Plusieurs arbres de légumineuses non seulement ont démontré l'apparition de VSP spécifique à écorce abondante, mais aussi conduit à l'identification de certains de ces VSP d'écorce. La présente étude a été réalisée afin d'étudier la présence des lectines dans les racines des plantes *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*. Ces plantes n'ont été jamais étudiées en Algérie sur l'extraction des lectines, raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- Etude la présence des lectines par le test hémagglutination avec le sang des lapins.
- Etude l'effet de la température, pH et métaux sur l'activité de ces lectines.
- Etude l'affinité de ces lectines vers le glucide et les glycoprotéines par le test d'inhibition d'une part et vers les globules rouges de l'être humain par le test ABO d'autre part

*CHAPITRE 1*

*GENERALITE SUR LES LECTINES*

## 1. Définition des lectines

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon ,1998**) Cette classe des protéines est dénommée par Boyd en 1954, sous le nom «lectines» dérivée du mot latin «lectus» qui est le participe passé du verbe «légère», qui veut dire «sélectionner» ou «choisir» (**Liener et al., 1986**). Les lectines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD. Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins et Evrard, 2003**) Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes , car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses( **Liener et al., 1986**) Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est fonction de la température et de la durée de traitement (**Meite et al, 2006**) Bien qu'il existe des lectines thermorésistants (**Guillaume, 1993**) Quelques lectines importantes sont énumérées dans le tableau 1

**Tableau 01 : les lectines et leurs applications (Bothan et Weil, 2011).**

Lectines	Exemple et commentaire
<b>Lectine de légumes</b>	ConcanavalineA, lectine de pois
<b>Agglutinine de germe de blé</b>	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
<b>Ricine</b>	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
<b>Toxines bactériennes</b>	Entérotoxine thermolabile d'E.coli et toxine du choléra

<b>Hémagglutinine de virus de la grippe</b>	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
<b>Lectine de type S</b>	Lectine animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

## 2. Historique

En 1888, P. H Stillmarka découvre la première lectine qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes. (Sharon and Lis, 2004) A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. Ensuite P. Ehrlichea découvre la même activité dans l'extrait du pois rouge (*Abrus precatorius*).

En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isole à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaleine A (Sumner, 1919). Il fallut patienter presque vingt ans et les travaux de Sumner et Howell en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'hémagglutination de la concanavaleine A par des saccharoses (Sumner et Howell, 1936).

En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (Boyd et Sharpleigh, 1954). L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donné (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes.

**Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines (renato et col, 1991).**

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel /Bruyllant & Venneman	Toxicite de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicite de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hemagglutinante de la graine de Ricinus communis Toxicité de la graine de Croton triglium
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activite hémagglutinante de la graine d'Abrus Precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d' 'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La reversibilite de l'hémagglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)

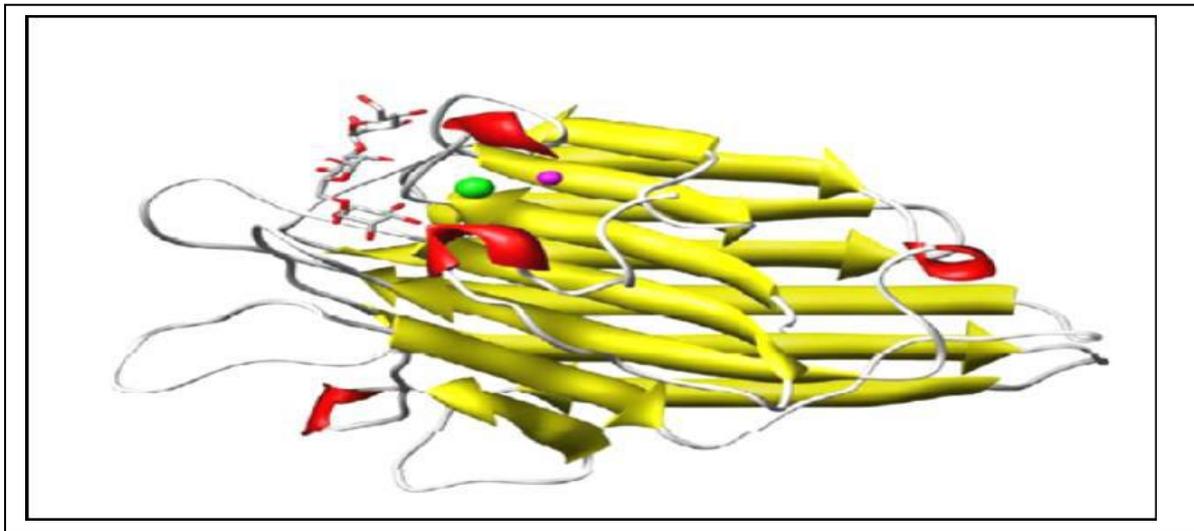
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hemagglutinines
1949	Liener	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
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
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

### 3. La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

#### 3.1. Les lectines simple

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 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 01)



**Figure 01 :** Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006).

La protéine est représenté par un ruban rouge pour les hélices  $\alpha$ , un ruban jaune pour les brins  $\beta$  et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Lenka, 2006)

#### 3.2. les lectines en mosaïques

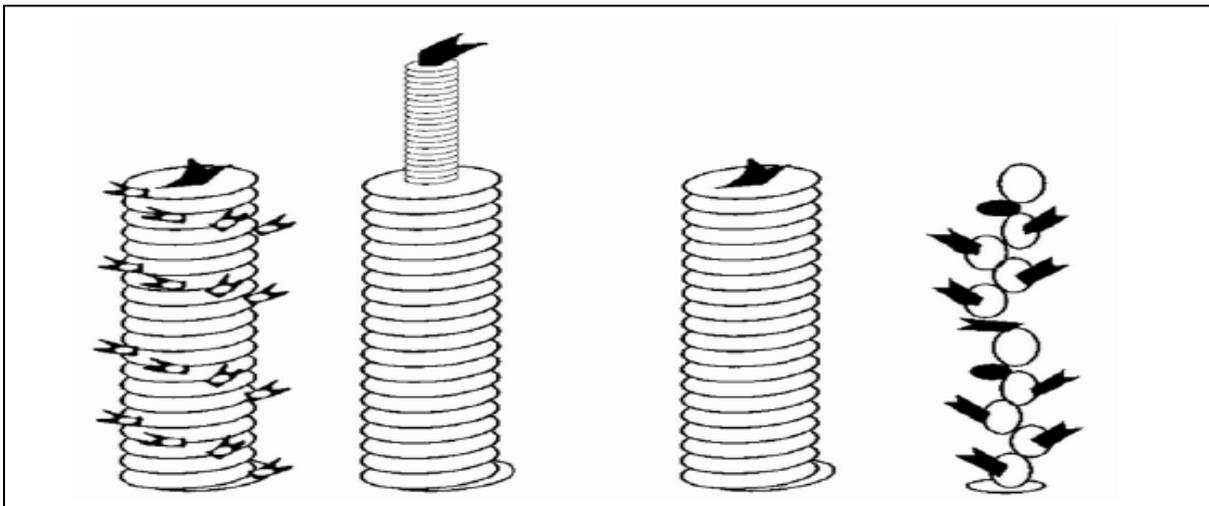
Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs type de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al*, 2006).



**Figure 2 :** Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al*, 2006).

### 3.3. Les assemblages macromoléculaires

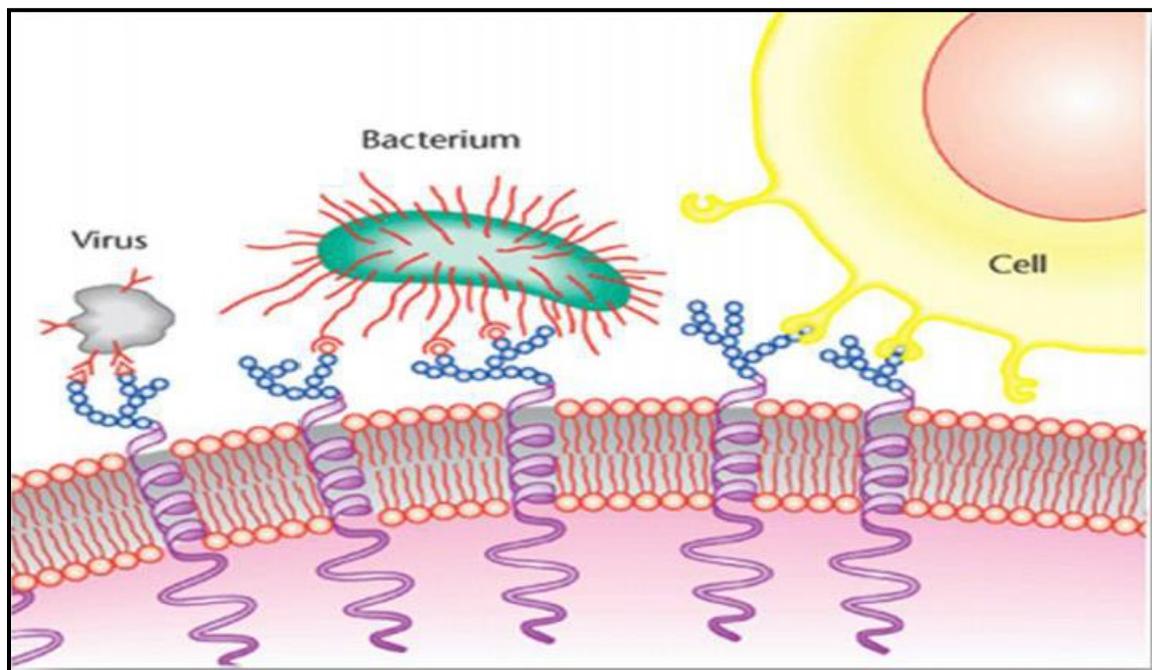
Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, 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, 2006) (Figure 03)



**Figure 03 :** Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli* (Lenka, 2006).

#### 4. Les sites de liaisons des lectines

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (**Goldstein et Poretz, 1986**) Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectines-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (**Pontet, 1996**) Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lient (**Gabius, 1985**).



**Figure 04 :** Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharon et Lis, 1993**)

#### 5. La spécificité et l'affinité des lectines

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (**Robert, 2008**) La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, 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,2003**) Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectines présente la plus forte affinité : le Mannose (Man),le Galactose(Gal)/N acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylglucosamine(GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc)(**Lis and Sharon,1998**) Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les epitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (**Dam and Brewer ,2002**).

**Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato, et coll. 1991) .**

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

## **6. La Classification des lectines**

### **6.1.Chez les animaux**

#### **a. 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**).

#### **b. 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 essentielles dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (**Chabrol et al, 2012**).

### **6.2.Chez les végétaux**

#### **a) Les mérolectines**

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et Ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides, dit monovalentes (exemple : héveïne, protéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans et Van Damme, 1995**).

#### **b) Les hololectines**

Les hololectines sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi- identiques ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués et agglutiner les cellules. Elles présentent la

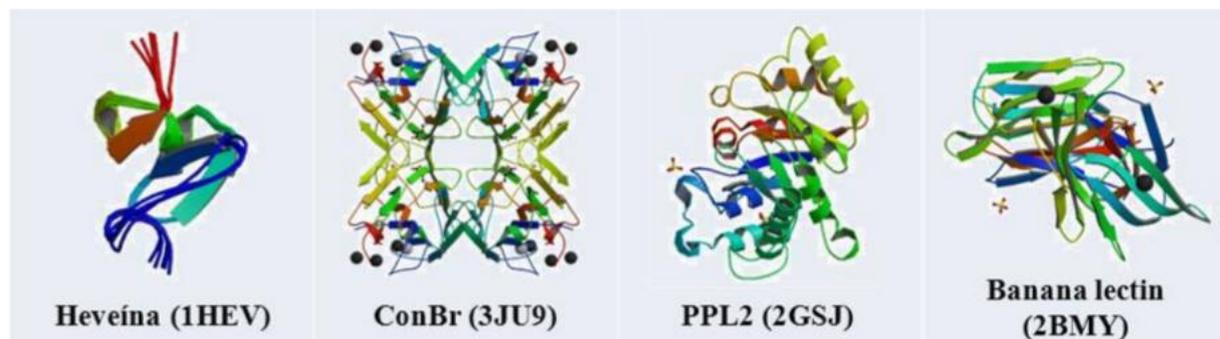
majorité des lectines de plantes (exemple : ConBr la Lectines de *Canavalia brasiliensis* ) (Van Damme *et al.*, 1998).

### c) Les chimérolectines

Les chimérolectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site De liaison (Van Damme *et al.*, 1998) Selon le nombre de liaison aux glucides, Les chimérolectines se comportent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip ribosomin activating proteine ; protéinein activant les ribosomes comme la ricine) (Peumans *et Van Damme*, 1995).

### d) Les superlectines

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



## 7. Distribution des lectines dans le monde de vivant

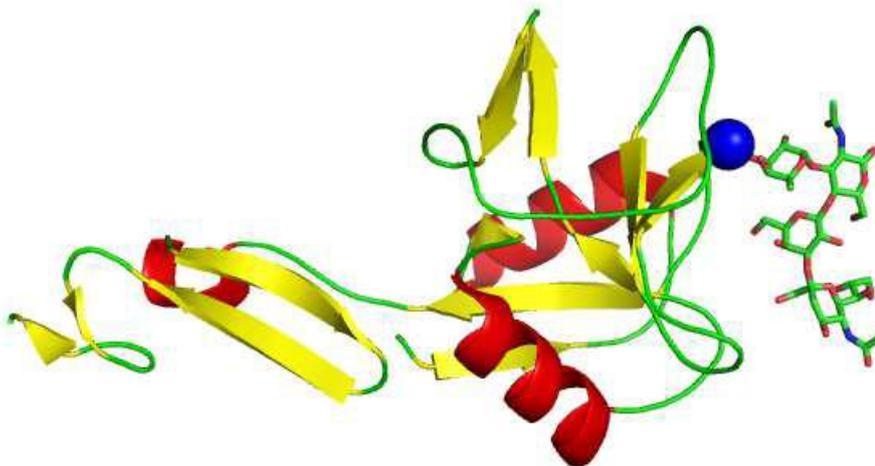
Initialement décrites dans le règne végétal où elles sont particulièrement abondantes, notamment chez les légumineuses et les graminées, les molécules sont en fait des molécules universelles. Elles sont en effet largement répandues dans le monde vivant puisque l'on en

rencontre même chez les virus et les bactéries. A titre d'exemple, le virus grippal présente des spicules d'hémagglutinine qui permettent son ancrage à la surface des cellules épithéliales de l'oropharynx. Des lectines sont également décrites chez les protozoaires tels que *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba badispar*, on en rencontre même chez les animaux supérieurs, notamment chez l'homme où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Bouchara et Trouchin, 2003).

### 7.1. Les lectines animales

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 *sigles*.

- Les structures de *galectines* sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le  $\beta$ -galactose et plus précisément pour le lactose ( $\beta$  Gal1-4Glc) et le Nacetyl lactosamine ( $\beta$  Gal1-4GlcNAc) (Leffler *et al.*, 2004).
- Les lectines du *type C* présentent un CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (Drickamer, 1993). Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une Lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers *et al.*, 2000) (Figure 5).



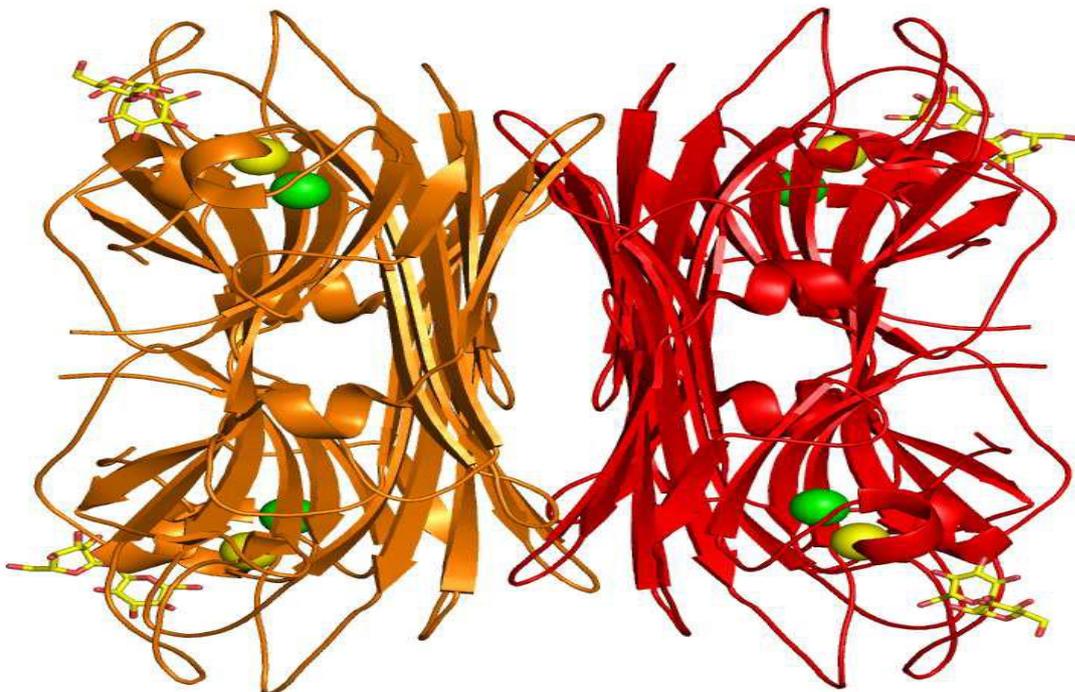
**Figure 6 :** Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers, *et al.* 2000) Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- Les *Sigles*, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique (**Crocker, 2002**).
- Les autres classes de lectines animales comprennent les lectines du *type P* qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CDMPR(**Roberts et al., 1998**). Les *pentraxines* qui sont une famille des lectines capables de se lier à des ligands de manière  $Ca^{2+}$  dépendante (**Emsley et al., 1994**) La plupart des lectines des vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (**Aragao, 2009**).

Par exemple, dans le processus de fécondation, un glycoconjugué de la surface de l'ovule interagit avec une lectine (spermadhésine) du spermatozoïde (**Topfer-Petersen et al., 1998**)

## 7.2. Les lectines des plantes

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavoline A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (**Edelman et al., 1972 ; Hardman et Ainsworth, 1972**)



**Figure 7 :** 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.

La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) (**Wright, C.S. et Hester 1996**) La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose telle que la jacaline isolée des graines de *Artocarpus integrifolia* (**Sankaranarayanan et al , 1996**) La famille Amaranthaceae contient la lectines ACA de *Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée avec le Gal $\alpha$ 1-3GalNAc (**Transue et al., 1997**).

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Chrispeels et Raikhel 1991, Rudiger et Gabius ,2001**).

### 7.3.Les lectines des microorganismes

Les infections sont toujours initiées par l'attachement du microorganisme aux tissus de l'hôte. Ce phénomène implique la reconnaissance des cellules de l'hôte le microorganisme, et nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (**Bouchara et Trouchin, 2003**) 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 et Varrot 2008, Sharon 1996**) L'exemple le plus marquant de lectines de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (**Weis et al , 1990**) Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymerehydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (**Imberty, 2011**) Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriaes (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles( **Imberty et al., 2005**) *Entamoeba histolytica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes Viau mécanisme dépendant du contact. Cette assassinat implique la protéine de surface amibienne dénommé le Gal / Gal Naclectine se lie au galactose

et au Nacétyl galactosamine permettant l'adhérence des amibes aux cellules hôtes (**Boettner et al, 2002**) Les lectines des champignons ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (**She et al, 1998 ; Sze et al, 2004**).

## **8. Fonction biologique des lectines**

### **8.1.Chez les plantes**

Fonction dans l'élongation des parois cellulaires ; fonction de cofacteurs enzymatiques agissant avec des enzymes glycoprotéiques ; intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines ; contrôle de la division cellulaire (mitogénicité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (**Etzler, 1986 ; Kaminski et coll.,1987**). D'autres études, suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (**Etzler, 1986**).

### **8.2.Chez l'homme**

Les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Elles sont utilisées lors du test d'hémagglutination en pratique clinique pour distinguer les types du sang (A, B et O), exemple : la lectine de haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) se lie à N-acétyl-D galactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A (**Gokeret al, 2008**) Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar et al, 2005 ; Gomes et al, 2012**) Elles contrôlent les niveaux des protéines dans le sang (**Rydz et al, 2013**) car elles sont responsables au transport des protéines, peptides et les médicaments natifs (**Sutapa et Gopa, 2013**) Les lectines ont la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses, La récente découverte suggère que les cellules malignes sont plus facilement agglutinées par des lectines que les cellules normales. Ces agglutinations sélectives pourraient être utilisées dans le traitement du cancer (**Voet et Voet, 2005**).

## **9. Propriétés des lectine**

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

### **9.1.L'interactionlectine–glucide**

Les lectines sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres (**Jain *et al*, 2001**) ces glycannes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de La lectines (**Jeyaprakash *et al*, 2003**) La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakash *et al*, 2003**).

### **9.2.L'agglutination des cellules**

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, 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). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans *et coll.*, 1995 ; Wang *et coll.*, 1998**).

### **9.3.L'activité 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 (**Nachbar *et Oppenheim*, 1980 ;Falasca, 1989 ; Babosa, 2001**).

### **9.4.Effets mimétiques des hormones**

Les lectines des graines d'haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (Greer et coll, 1985).

### **9.5. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses**

Les travaux de Valentier et coll. (2003) suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme in vitro. Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (Poiroux, 2011). Egalement ils inhibent leur migration (Banwell, 1983).

### **9.6. La propriété antivirale**

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).

### **9.7. La propriété antibactérienne**

Les lectines sont des outils de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (Tanne et Neyrolles, 2010) Les lectines animales comme les lectines récepteurs des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (Singh et al, 2012) aussi bien pour les lectines de type C qui résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (Mukherjee et al, 2014). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en

fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al, 2012 ; Huang et al, 2014 ; Xu et al, 2014**)

### **9.8. Autres propriétés**

Les lectines expriment diverses 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 a partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes, 1994**) les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy, 1997**) l'induction de l'apoptose (**Kulkarni ,1998**).

## **10. L'intérêt des lectines**

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ces 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, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

### **10.1. En biochimie et protéomique**

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus ) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique ) ; pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou une enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...). Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (**Dole.A.et Lindeberg . S. ,2005**)

**10.2. Dans le domaine biomédical****a) 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.

**b) Immunologie**

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent et réutilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi ,2004**) Les lectines mitogènes sont employées pour déceler 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 immun thérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

**c) 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**).

**d) Cancérologie**

Certaines lectines purifiées a partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot et coll. ,2004**). Kenoth et al (2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

### **10.3. 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 coll., 2002**).

## **11. Le rôle des lectines dans l'immunité**

Les lectines sont utilisées en immunologie par Paul Ehrlich au début des années 1890, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulés par les lectines *in vitro* ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent *in vivo* (**Sharon, 1983**). Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre d'une réponse de l'immunité innée (**De Hoff et al, 2009**) Le système du complément, son activation peut être initiée par des complexes immuns (voie classique), par des oligosaccharides microbiens (voie des lectines) ou par divers composants de surface des pathogènes (voie alterne) (**Cavaillon, 2005**). La voie lectine est initiée par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet de l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**) La lectine liant le mannose (mannose binding lectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectines du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (**Roos et al., 2007**) Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (**Kawsar et al., 2010**). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytes. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytes grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – Fucose, récepteur de galactose et récepteur de  $\beta$ -glucane (**Guénard et al, 2001**).

*CHAPITRE 2*  
*LE SYSTEME SANGUIN*

## Les groupes sanguins

### 1. Historique

En 1900 le médecin Autrichien Karl Landsteiner (1868-1943) démontre que les sangs humains ne sont pas tous semblables ni tous compatibles entre eux. Il découvrit le système ABO, suivant lequel le sang se partage en quatre groupes : A, B, AB ou O, selon les antigènes que l'on trouve associés aux globules rouges des personnes (**Boucher, 2008, Danic et Lefrère, 2011**). Un autre antigène important des globules rouges est le facteur rhésus Rh identifié en 1940 par Landsteiner et Weiner (**Brooker, 2001**).

### 2. Le système ABO

Le système de groupe sanguin ABO se définit à la fois par la présence d'antigène sur les hématies et par la présence d'anticorps naturels réguliers dans le plasma. La présence sur les globules rouges d'un antigène exclut la présence dans le plasma de l'anticorps qui lui correspond, exemple : si, dans le sang d'un individu, les hématies sont porteuses de l'antigène A, le plasma ne peut pas posséder d'anticorps anti A. sinon la réaction antigène-anticorps provoquerait une agglutination (**Ramè et Naccache, 2001**).

Les antigènes A et B détectés par des anticorps spécifiques définissent quatre groupes sanguins principaux : A, B, AB, O (**Ramata, 2010**).

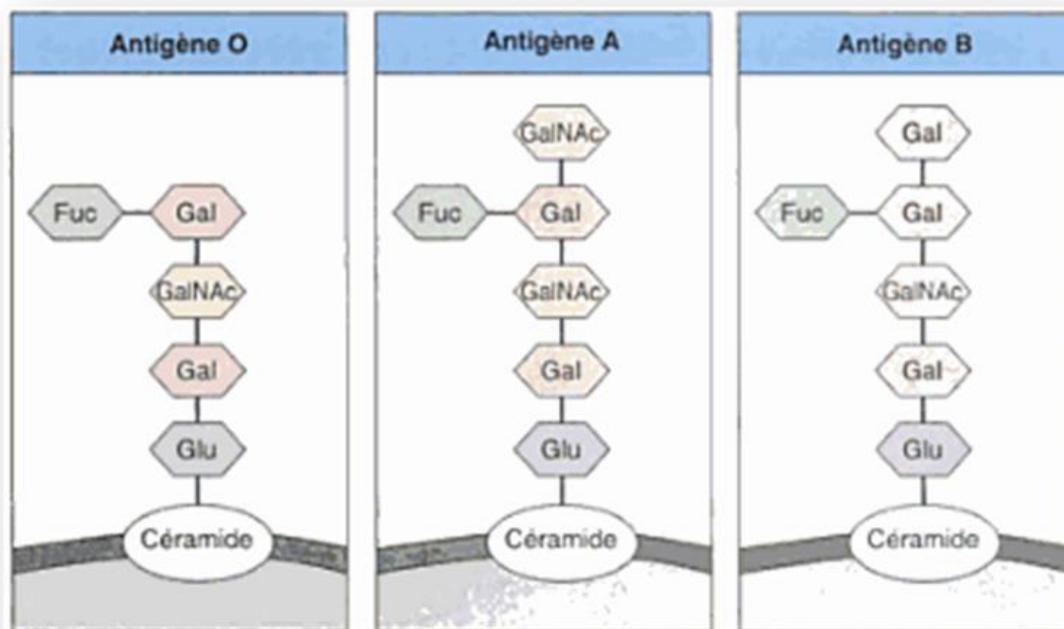
- ✚ groupe O (antigène A et antigène B absents et anticorps anti A et anti B présents): 43% de la population française .
- ✚ groupe B (antigène B présent et anticorps anti A présent). 11% de la population française.
- ✚ groupe A (antigène A présent et anticorps anti B présent) 42% de la population française.
- ✚ groupe AB (antigène A et antigène B présents et absence d'anticorps): 4% de la population française( **Béziat et al., 1996**).

### 3. Facteur rhésus

Le facteur R est l'un des plus importants systèmes de groupes sanguins après le système ABO, ses antigènes (C, D et E) sont aussi importants que ceux de système ABO. Les personnes dans le sang desquelles cet antigène est, sont dites Rh+, tandis que les autres sont Rh- (Boucher, 2008).

### 4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO

Les antigènes du système ABO proviennent d'une famille des glycolipides présents à la surface des globules rouges. Leur structure de base est constituée de lipide céramide auquel est attaché un oligosaccharide composé d'un glucose (Glu), d'un galactose (Gal), d'une N-acétylgalactosamine (GalNac), d'un galactose (Gal) et d'une fucose (Fuc). Les sujets du groupe O ne produisent que ce glycolipide. Les sujets du groupe A ont un enzyme qui ajoute une molécule de N-acétylgalactosamine à la chaîne oligosaccharidique pour former l'antigène A, alors que les sujets du groupe B ont une enzyme qui ajoute une molécule de galactose pour former l'antigène B. Les globules rouges des sujets du groupe AB expriment en plus la structure de base dépourvue des glucides terminaux, ce qui explique pourquoi des alloanticorps ne sont pas produits contre le groupe O (Parham, 2000) (figure 6)



**Figure 08:** Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (Parham,2000).

La détermination des groupes sanguins ABO se fait à l'aide de deux épreuves : L'épreuve globulaire dite de Beth-Vincent (consiste à détecter les antigènes présents sur les globules rouges du patient grâce à des anticorps de spécificité connue = sérum test) et l'épreuve sérique dite de Simonin (consiste à détecter les anticorps naturels présents dans le plasma grâce à des globules rouges de groupe connu (globules tests). La détermination du groupe sanguin ABO d'un patient est systématiquement associée à la recherche de l'antigène D (**Béziat et al, 1996**). (Tableau 05).

**Tableau 04:** Les Lectines spécifiques des groupes sanguins(**Béziat et al, 1996**).

Origine de lectine	Groupe spécifique	Référence
<i>Bandereira simplicifolia-I</i>	B	Richard, 1998
<i>Sophora japonica</i>	A, B	
<i>Vicia villosa</i>	A	
<i>Nelumbo vucifea</i>	B	Goker et al, 2008

*CHAPITRE 3*  
*GENERALITE SUR LES PLANTES*

## ***I. Eucalyptus globulus***

### **1. Origine du nom**

Le mot « *Eucalyptus* » vient du grec ; Eu « bien » et kaluptos « couvert ».

### **2. Noms communs**

Gommier, gommier bleu, arbre au koala, arbre à la fièvre.

✚ **Nom botanique** : *Eucalyptus globulus* et plusieurs autres espèces du genre botanique *Eucalyptus* (*E. citriodora*, *E. dives*, *E. radiata*, *E. polybractea*... etc.)

✚ **Noms vernaculaires** : *Calitous* « le nom le plus connue en Algérie », *Calibtus*, *Kafor*. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions.

### **3. La description botanique de la plante**

Le genre *Eucalyptus*, représenté par plus de 700 espèces réparties dans le monde entier (**Brooker et Kleinig, 2006**).

Il s'étend dans des régions les plus sèches (quasi désertiques) jusqu'aux cotes humides (**Chennoufi et al, 1980**). Il est apte à résister au froid et à croître sur des sols secs, siliceux, calcaires, humides ou argileux, salés ou non, près ou loin de la mer (**Virmani et Datta, 1967**).

Il se compose de grands arbres magnifiques et à feuilles persistantes avec un feuillage parfumé riche en glandes sébacées et est une excellente source de l'huile d'eucalyptus

- **Odeur** : forte, fraîche, balsamique « odeur d'une baume », camphrée.
- **Saveur** : chaude aromatique, un peu amère, suivie d'une sensation de fraîcheur prononcée et agréable.
- **Récolte** : en Février et en Novembre à la taille des arbres.



**Photo 01:** photographie d'*Eucalyptus globulus*.

#### 4. Classification d'*Eucalyptus globulus*

**Tableau 5 :** Classification classique d'*Eucalyptus globulus* (labille, 1800).

<i>Règne</i>	<i>Plantae</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Spermaphytes</i>
<i>Sous-embranchement</i>	<i>Angiospermes</i>
<i>Classe</i>	<i>Magnoliopsida /Dicotylédones</i>
<i>Sous –Classe</i>	<i>Rosidae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Myrtales</i>
<i>Famille</i>	<i>Myrtaceas</i>
<i>Genre</i>	<i>Eucalyptus</i>
<i>Espèce</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>

### 5. Les propriétés médicinales

- ✚ Les huiles d'*eucalyptus* ont un large usage dans l'industrie pharmaceutique, de la parfumerie (**Brooker et Kleinig, 2006**).
- ✚ Leur huile essentielle est utilisée comme produit répulsif et agent pesticide (**Daizy et al. 2008**).
- ✚ En fait, l'huile d'*eucalyptus* est connue depuis des centaines d'années comme anti bactérien, antifongique et antiseptique dans la nature
- ✚ Cette huile possède un effet rafraîchissant indéniable sur la température du corps. C'est un fébrifuge.
- ✚ Elle est utilisée dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour ses multiples vertus sur l'arbre respiratoire.
- ✚ Elle Facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (balsamique, fluidifiant, expectorant), anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus.
- ✚ Antiseptique pour les voies urinaires, elle est aussi antirhumatismale, stimulante et tonifiante (**Brooker & Kleinig, 2006**)

## **II. *Pinus sylvestris***

### **1. Description botanique de la plante (Naturactive)**

Le *Pinus sylvestris* est un grand arbre commun dans les montagnes de l'hémisphère nord, qui apprécie la montagne, jusqu'à 2000 mètres d'altitude, et les sols sablonneux ou gravillonnés. C'est un arbre imposant : le *pin sylvestre* adulte mesure de quinze à trente mètres de hauteur, et de six à dix mètres de largeur. Il résiste aux températures allant jusqu'à moins cinquante degrés Celsius. (Mioulane et Patrick , 1996).

*Pinus sylvestris* On le différencie grâce à ses longues aiguilles, réunies deux par deux à leur base. Groupées par deux et vrillées, elles mesurent quatre à huit centimètres, et sont gris vert à gris bleuté. Elles sont souples et pointues, mais non piquantes. Elles persistent au moins de deux à quatre ans. Son écorce est gris-pourpre chez les arbres jeunes et à la base, puis se colore en brun orangé par la suite et au sommet. Ses cônes mâles, jaunes, produisent du pollen en abondance, pour féconder les cônes femelles, rouges, qui vont alors former des cônes ovoïdes, verts, jusqu'à donner, à maturité, des pommes de pin.



**Photo 02** : Photographie *Pinus sylvestris*.

## 2. Classification de *Pinus sylvestris*

*Pinus* est le genre des conifères le plus largement étendu dans la famille des **Pinaceae** avec plus de 100 espèces (Farjon, 1984 ; Price et al, 1998), comprenant notamment le *Pinus sylvestris* dont la taxonomie est présentée dans le Tableau (Kramer et Green, 1990).

**Tableau 6** : Taxonomie du *Pinus sylvestris* conformément au système d'information taxonomique intégré (SITI).( Kramer et Green, 1990).

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous- Règne</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>embranchement</b>	<b>Pinophyta ou conifère</b>
<b>Sous- embranchement</b>	<b>Gymnosperme</b>
<b>Classe</b>	<b>Pinopsida</b>
<b>Ordre</b>	<b>Pinales</b>
<b>Famille</b>	<b>Pinaceae</b>
<b>Genre</b>	<b>Pinus</b>
<b>Espèce</b>	<b>Pinus sylvestris</b>

## 3. Propriétés médicinales

Les propriétés du *Pinus sylvestris* sont assez variées, on l'utilisera pour son action :

- ✚ Antibactérienne,
- ✚ Fongicide,
- ✚ Antiseptique respiratoire
- ✚ Décongestionnante ou expectorante, c'est également un analgésique percutané,
- ✚ Et peut, de plus, avoir une action cortisone-like par stimulation de l'axe hypophyso-corticosurrénal (Gayda et al ,2013).

La présence d' $\alpha$ -pinène confère à l'huile essentielle de pin des propriétés anti-inflammatoires (Kim Ds. et al ,2015).

*CHAPITRE 4*  
*MATERIEL ET METHODES*

## **Matériel et Méthodes des tests phytochimiques**

### **I. Matériel végétale**

Notre étude a été réalisée sur deux plantes médicinales ont été récolté à partir de zone de HAMMA BOUZAINNE, Constantine à le 3 mars 2017.

#### **❖ *Eucalyptus globulus***



**Photo 03:** photographie d'*Eucalyptus globulus*.

#### **❖ *Pinus sylvestris***



**Photo 04:** Photographie *Pinus sylvestris*.

## II. Les méthodes

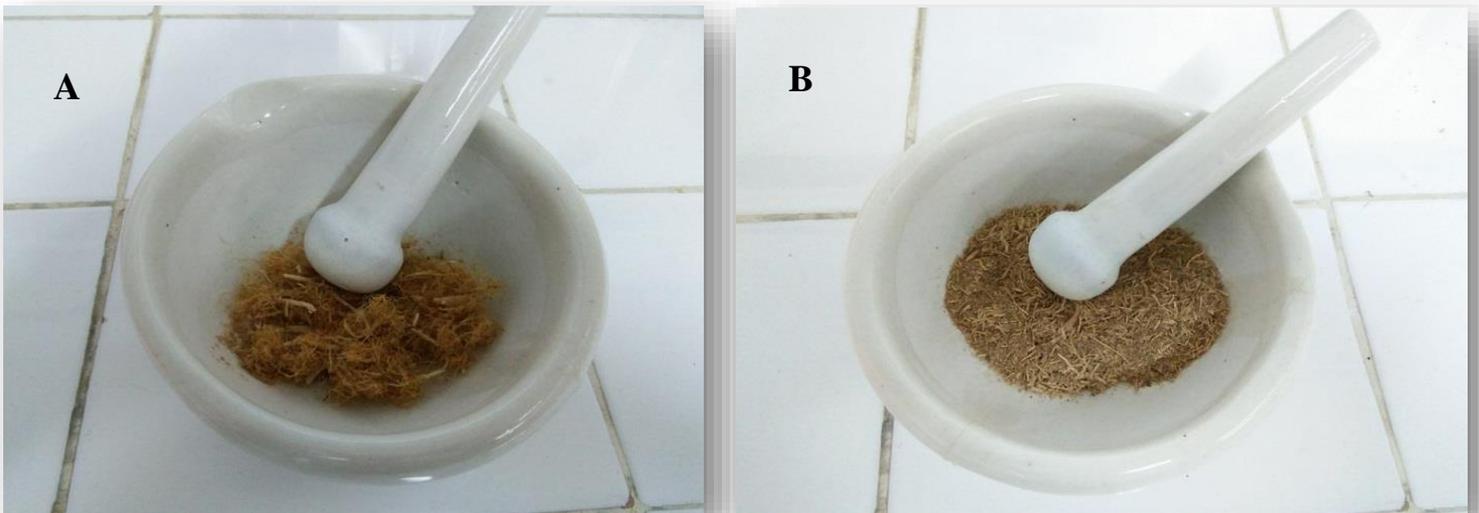
### 1. La Préparation des plantes

- **Lavage** : les racines ont été bien rincées avec l'eau et débrassé de toute impureté.
- **Séchage** : les racines des plantes ont été séchées à température ambiante pendant 7 jours.



**Photo 05** : Les racines sèches des deux plantes médicinales *Eucalyptus globulus*(A), *Pinus sylvestris* (B).

- **Broyage** : les racines ont été coupées, puis ils sont broyés dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.



**Photo 06** : poudre des deux plantes médicinales *Pinus sylvestris*(A), *Eucalyptus globulus* (B).

## 2. L'EXTRACTION DES PLANTES

### 2.1.Le principe

C'est une opération visant à récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de plantes à l'aide d'une solution Tampon.

### 2.2.La Technique d'extraction

9g des poudres obtenues à partir des 2 plantes ont été mises dans des flacons contenant chaque une 30ml solution tampon (0.01M pH=7.4) (**annexe 1**) pendant 24h, Après la centrifugation de la suspension à 6000tr/min pendant 30min, le surnageant est récupéré et conservé pour la réalisation des tests souhaités

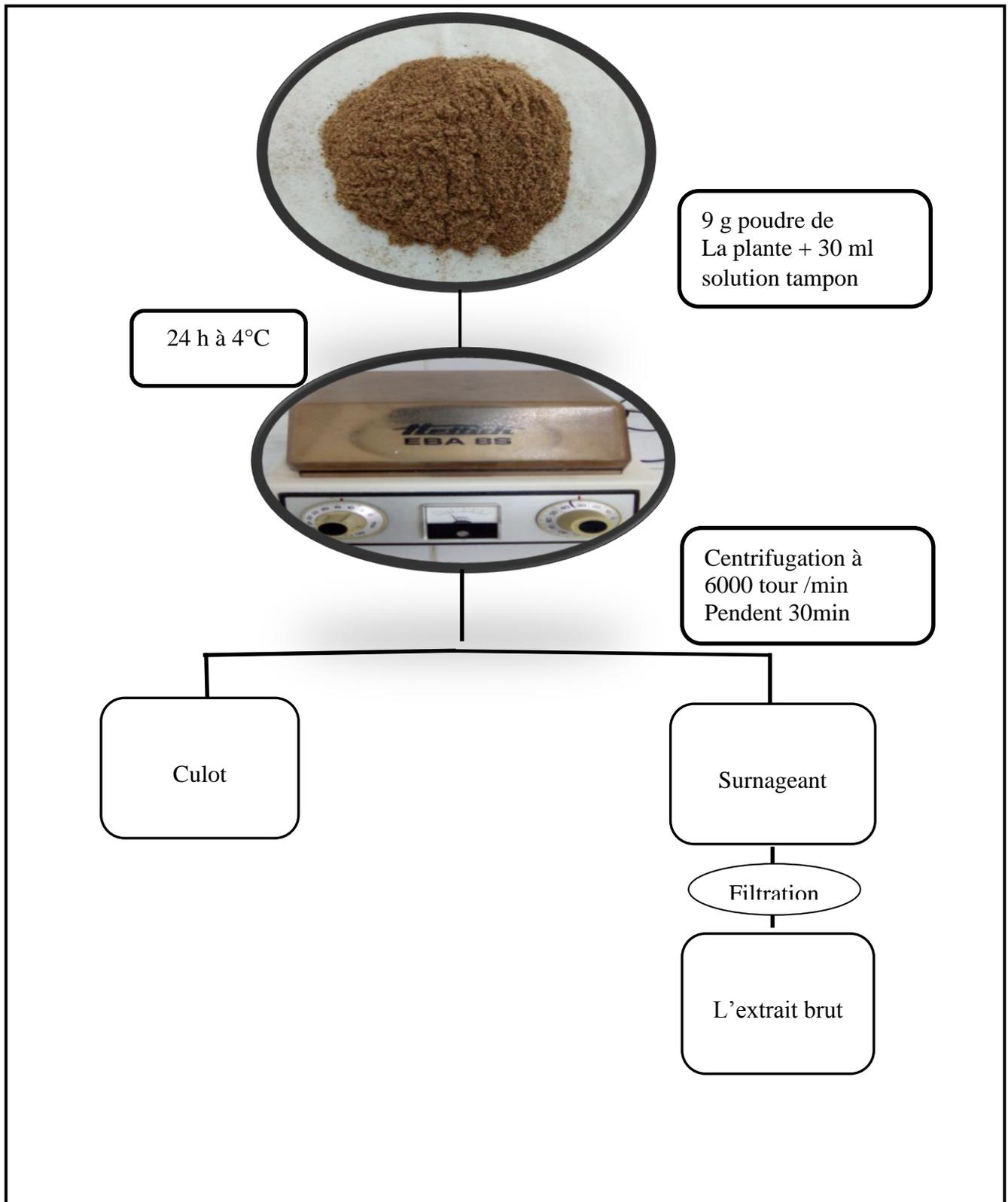


Figure 09 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.

### **3. Le test d'héماغglutination**

Ce test a été porté sur les hématies du lapin et permet d'affirmer la présence Des lectines dans les extraits. Il se base sur l'observation de l'agglutination, et par Conséquent de la précipitation des érythrocytes en présence des lectines.

#### **3.1.La Préparation des hématies à 3%**

Le sang humain est collecté à partir de laboratoire d'analyse médicale polyclinique ELHOUCAINI et IBENSINA, le sang du lapin est collecté à partir des lapins provenant au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine 1. Les hématies du lapin sont collectées pour la mise en évidence la présence des lectines dans les extraits, et les hématies de groupe sanguins humains ABO pour tester la spécificité des lectines des extraits au groupe sanguin ABO. Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

#### **3.2.Lavage des hématies**

Le tube contenant une quantité de sang (1.5 ml) a été centrifugé à 3000tr /min pendant 30 min le surnageant résultant est versé et une solution de Na Cl 0.9%est ajouté au culot ; après avoir bien mélangé le tube est soumis à nouveau à une centrifugation .l'opération est répété 3 fois jusque l'obtention d'un surnageant claire.

#### **3.3.La dilution des hématies**

Après avoir terminé le lavage le culot contenant les globules rouges est dilué par une solution saline d'eau physiologique sachant que 1.5 ml des hématies dans 48.5 ml de Na Cl 0.9% afin d'obtenir des hématies à 3%.

#### **3.4.La technique d'héماغglutination**

Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl d'extrait brute de notre plantes ont été déposés tout en ajoutant 50 µl des hématies du lapin. Après 1h, l'agglutination est observée à l'œil nu.

### **4. Le teste de limite d'héماغglutination**

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brute (*Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*) qui lui, est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme déconcentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de

l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

### **5. L'effet température sur l'hémagglutination**

Quatre tubes à essai, contenant chacun une aliquote de l'extrait brut ont été incubé à des températures différentes (40, 60, 80, 90 °C) dans un bain marie pendant 45 min. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à la température ambiante, enfin le test d'hémagglutination a été fait.

### **6. L'effet du pH sur l'hémagglutination**

Dans 12 tubes à essai une petite quantité de poudre de notre plantes a été mis tout en ajoutant un petit volume de tampon phosphate à différent valeurs de pH en allant de 1 à 12, Après 24 h d'incubation à 4 °C, le test d'hémagglutination a été effectuée sur le surnageant.

### **7. Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines**

Dans chaque puits d'une microplaque 50 µl de l'extrait a été déposé, tout en ajoutant 50 µl de solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de Na Cl 0,9%) (**Annexe 2,3**)[Fructose, Glucose , Mannitol , Galactose , Lactose , Mannose , Rhamnose , Glucosamine HCL , Mucine, Fétuine ,Ovalbumine, BSA ,caséine.] . Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, cela permettre au lectines de reconnaître le sucre, 50 µl des hématies du lapin à 3% ont été rajoutées. Après une heure la lecture a été faite à l'œil nu.

### **8. Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par Les saccharides**

Ce test a été effectué pour les sucres qui inhibent l'agglutination, il a été réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination est mesurée. Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés

Puis 50 µl des inhibiteurs (0,1g/ml) (**Annexe 02**) sont rajoutées au premier puits seulement, ensuite une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants, l'incubation de ce mélange a été effectué pendant 1h à température ambiante Finalement, 50µl des hématies à 3% ont été ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination a été faite à l'œil nu après une heure de temps.

**9. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO**

Ce teste a été effectuées pour déduire la spécificité des extraits aux groupes sanguin, il a été réalisée sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO en utilisant les érythrocytes des différents groupes sanguin.

**9.1.Principe**

Dans un puits d'une microplaque, 50 µl des hématies de chaque groupe ont été ajouté à 50ul d'extrait de plante. Après 1heure d'incubation, la lecture a été faite à l'œil nu.

**10. Le Test des métaux (oligoéléments)**

Premièrement, l'EDTA est ajouté à l'extrait d'*Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* (1V-1V respectivement). Après 1h, 50 µl de notre composé ont été déposés dans un puits tout en ajoutant 50 µl de l'un des métaux (MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCL<sub>2</sub>) (**Annexe 03**).enfin 50 µl de sang de lapin sont ajoutés au mélange, la lecture a été faite à l'œil nu après 1h d'incubation.

**11. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.****11.1. La préparation de la colonne de Sephadex G75.**

4 g de Sephadex G75 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,2). Le mélange a ensuite été incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne.

**11.2. La filtration des lectines**

Un échantillon de surnagent d'extrait brut a été récupéré puis versé au niveau de la colonne Sephadex G75 et équilibrée avec un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2), avec lequel elle a été recueillie par élution dans des tubes secs (5ml/tube). L'extrait récupéré a été testé sur les hématies du lapin pour s'assurer de la présence de l'activité hémagglutinante de notre extrait.

Les extraits issus de la chromatographie sur colonne sont placés dans le spectrophotomètre à UV afin de mesurer l'absorbance à longueur d'onde 280 nm, qui a été utilisée pour estimer la teneur en protéines dans les éluât de la colonne et tracer la courbe d'absorbance en fonction des tubes.

*CHAPITRE 5*  
*RESULTATS ET DISCUSSION*

## 1. Le test d'hémagglutination

Nos résultats qui concerne l'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait d'*Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*.

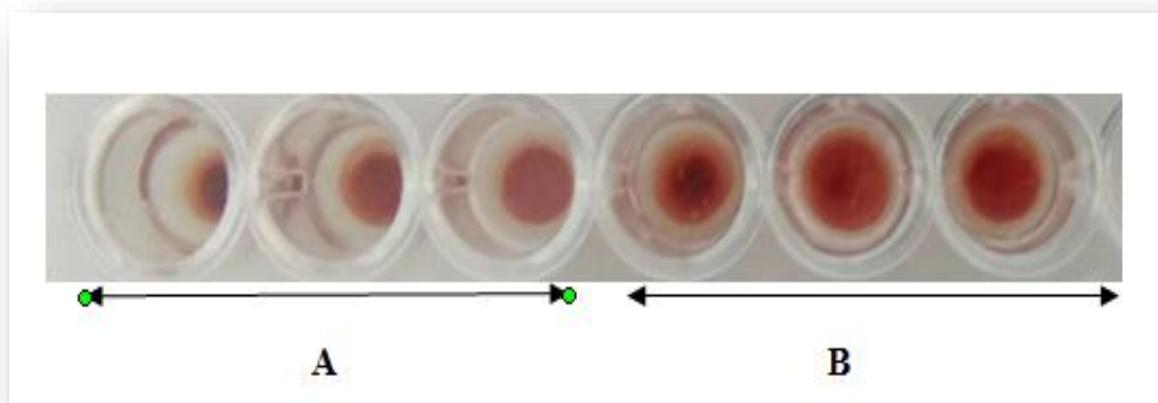
**Tableau 7 :** L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait d'*Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*.

Plante	Test d'agglutination
<i>Eucalyptus globulus</i>	+++
<i>Pinus sylvestris</i>	+++

+++ : Très forte agglutination.

L'extrait d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* montre une très forte agglutination vis-à-vis les hématies du lapin alors on parle d'hémagglutination positive .En absence de lectines, les cellules roulent au fond du puits où elles s'accumulent en un bouton rouge dense l'hémagglutination est négative. Le potentiel d'hémagglutination des lectines a été étudié en Utilisant des érythrocytes natifs de lapin ce qui a montré une bonne hémagglutination. C'est Résultats ont été similaires à ceux des lectines extraites des racines des plantes de *Moringa G* Et *Moringa M* et qui ont montré également de très fortes agglutinations lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes de lapin (Necib *et al*, 2014) par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que *Sinapis alba* et *Brassica fruticulosa* (Deeksha *et al* ,2015).

**Photo07 :** l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d'*Eucalyptus globulus*(A) et *Pinus sylvestris*(B)



Nous avons testé l'activité hémagglutinante des extraits de notre plantes médicinales : D'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*. Dont les deux ont donné un résultat positif. Ces résultats indiquent qu'elles contiennent effectivement des substances à activité agglutinante sur les hématies. Les extraits bruts d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* ont pratiquement le même degré d'agglutination sur les hématies du lapin. Cependant L'extrait brut de *Pinus sylvestris* présent une très forte activité hémagglutinante. Des études sur les lectines ont été effectuée sur des espèces de la famille de *Brassicaceae* dans les mêmes conditions qu'on a travaillé avec, ont montrées que le teste d'hémagglutination sur les grains de l'espèce *Brassica napus L* a donné un résultat positive, par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que *Sinapis alba* et *Brassica fruticulosa* (Deeksha et al, 2015).

## 2. La limite d'hémagglutination

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

**Tableau 8** :L' Activité de la limite d'hémagglutination d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*.

dilution	1/2	1/4	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
<i>Eucalyptus globulus</i> (A)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>Pinus sylvestris</i> (B)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

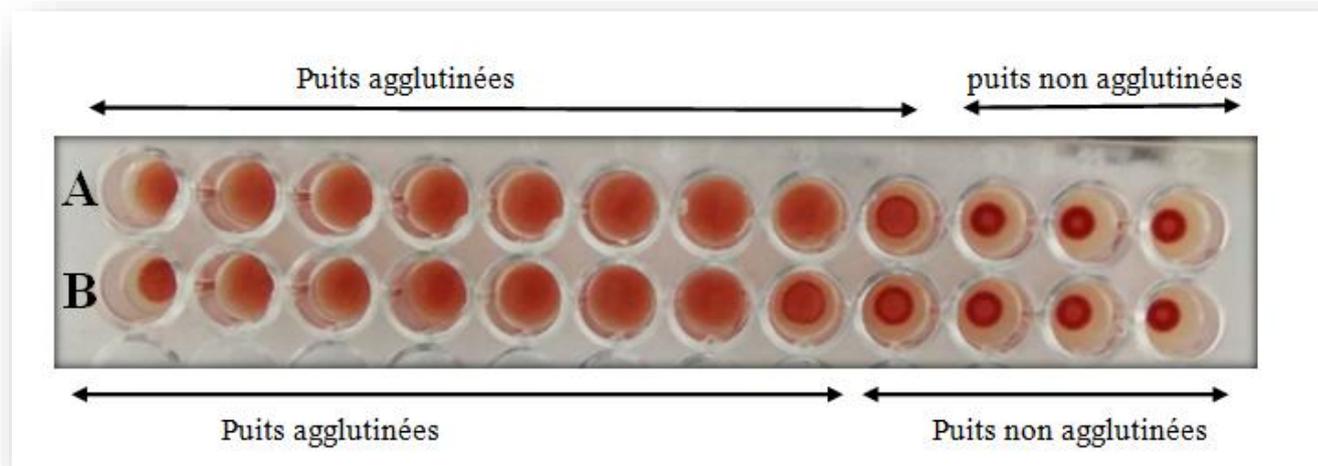
dilution	1/2048	1/4096	1/8192
<i>Eucalyptus globulus</i> (A)	+	-	-
<i>Pinus sylvestris</i> (B)	-	-	-

+++ : Très forte agglutination

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination

\_ : Absence d'agglutination



**Photo 08** : test de la limite d'hémagglutination d'*Eucalyptus globulus*(A), *Pinus sylvestris*(B).

Nos résultats ont montrés que l'activité hémagglutinante des extraits *Eucalyptus globulus* a été de 1<sup>ère</sup> jusqu'à 9<sup>ème</sup> puit(1024), tandis que l'extrait du *Pinus sylvestris* a une activité hémagglutinante proche d'*Eucalyptus globulus* de 1<sup>ère</sup> jusqu'à 8<sup>ème</sup> puit (512), dans une autre étude réalisée sur la lectines EHL isolé à partir d'*Euphorbia helioscopia*, l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml (Shaista *et al.*, 2014). Et d'apprêt Zitouni et al *Terfezia bouderei* a montré une forte agglutination allant jusqu'au 7ème puits (Zitouni *et al*, 2015). Alors que l'absence d'agglutination au niveau des autres puits est due à la dilution effectuée donc les fractions contenues sont des diluâtes de l'extrait brut.

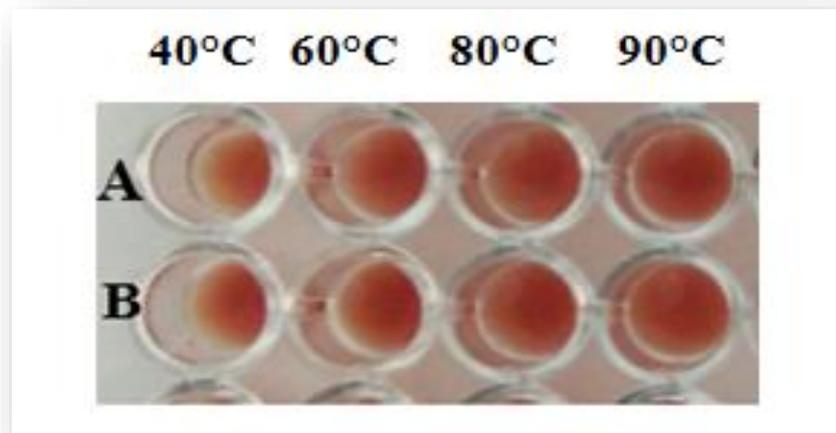
### 3. L'effet de la température sur l'hémagglutination

Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différent température

**Tableau 9** :L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'*Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*.

T°C	40	60	80	90
Plantes				
<i>EUC</i>	+++	+++	+++	+++
<i>PIN</i>	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination.



**Photo 09:** L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *D'Eucalyptus globulus* (A), *Pinus sylvestris* (B).

Le traitement thermique des extraits bruts des racines *d'Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* à différente température de 40, 60, 80 ,90°C pendant 45min, n'est pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante. Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistants à la température (thermorésistante), comme est le cas des lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocliadiella capillacea* et les racine des plantes *Cyperus rotundus*, *Pistacia Lentiscus* et *Ruta graveolens* pousse jusqu'à 100°C (Necib et al, 2015).

#### 4. L'effet du pH sur l'hémagglutination



**Photo 10 :** L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Pinus sylvestris*(A) *Eucalyptus globulus*(B).

**Tableau 10** : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Pinus sylvestris*, *Eucalyptus globulus*.

PH \ Extrait	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pinus sylvestris</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Eucalyptus globulus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination.

L'extrait de *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* contient la même résistance à toute la gamme de pH testée de **1** jusqu'à **12**. L'activité d'hémagglutination des lectines des extraits *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* reste stable toute au long de la gamme de pH testée de 1 à 12. Ces résultats ont été comparés à ceux de *Cyperus rotundus* et de *Pterocladia capillacea* qui ont montré que les lectines sont stables au pH [2-12] (Necib *et al*, 2015).

### 5. L'effet d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et glycoprotéines

**Tableau 11** : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples et glycoprotéine d'*Eucalyptus globulus*.

Sucres et glycoprotéine	<i>Eucalyptus globulus</i>
<b>Glucose</b>	++
<b>Fructose</b>	++
<b>Glucosamine-Hcl</b>	+++
<b>Mannitol</b>	++
<b>Galactose</b>	++
<b>Lactose</b>	++
<b>Rhamnose</b>	+
<b>Mucine</b>	+++
<b>Fétuine</b>	-

<b>BSA</b>	-
<b>Caséine</b>	-
<b>Ovalbumine</b>	+++

+++ : Très forte agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.



**Photo 11 :** Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait *d'Eucalyptus globulus* par les sucres et glycoprotéines ( 1:caséine, 2:lactose , 3:BSA , 4:ovalbumine , 5:galactose , 6:mannitol, 7:glucose, 8:fructose, 9:fétuine , 10 :glucosamine-Hcl, 11 :mucine).

**Tableau 12 :** Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples et glycoprotéine d' *Pinus sylvestris*.

Sucres et glycoprotéine	<i>Pinus sylvestris</i>
<b>Glucose</b>	+++
<b>Fructose</b>	+++
<b>Glucosamine-Hcl</b>	+++
<b>Mannitol</b>	++
<b>Galactose</b>	+++
<b>Lactose</b>	+++
<b>Rhamnose</b>	+++
<b>Mucine</b>	+++
<b>Fétuine</b>	-
<b>BSA</b>	+++
<b>Caséine</b>	+++
<b>Ovalbumine</b>	+++

+++ : Très forte agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.



**Photo 12 :** Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de *Pinus sylvestris* par les sucres et glycoprotéines ( 1:caséine, 2:lactose , 3:BSA , 4:ovalbumine , 5:galactose , 6:mannitol, 7:glucose, 8:fructose, 9:fétuine , 10 :glucosamine-Hcl, 11 :mucine)

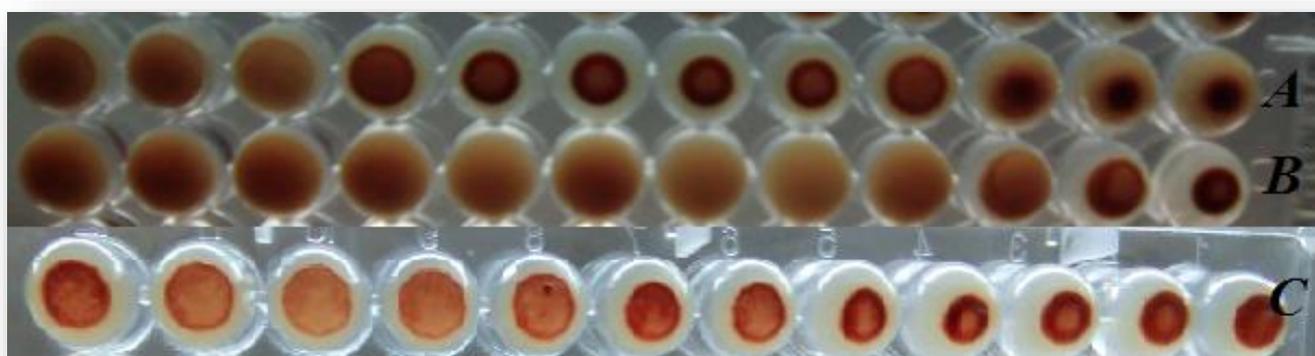
L'extrait *Eucalyptus globulus* a montré une inhibition avec les glycoprotéines Féтуine, caséine et BSA, par contre l'extrait de *Pinus sylvestris* donnée une inhibition avec une seule Glycoprotéine qu'est le Féтуine. Le même résultat a été obtenu avec les lectines extraite à partir de *Pistacia Lentiscus* (Necib *et al*, 2015) Les extrait d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* ont montré une agglutination avec tous les sucres testés, C'est le cas des lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (Valadez *et al*, 2011) et à partir de bactérie *Canavalia ensiformis* (Kulkarni *et Tayade*, 2013).

## 6. L'effet de limite d'inhibition d'hémagglutination par les glycoprotéines

Les concentrations minimales en BSA, Féтуine, caséine, provoquant l'inhibition d'hémagglutination des lectines d'*Eucalyptus globulus*, sont présentées dans le tableau Suivant :

**Tableau 13 :** Les concentrations minimales en BSA, Caséine, Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait *Eucalyptus globulus*

dilution \ glycoprotéine	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
<b>BSA</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	++	+++	+++	+++
<b>Caséine</b>	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Fétuine</b>	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++



**Photo 13 :** Les concentrations minimales en BSA(A), Caséine(B) et la Fétuine(C) provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait *Eucalyptus globulus*.

**Tableau 14 :** Les concentrations minimales en Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait *Pinus sylvestris*.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
<b>Fétuine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+



**Photo 14** : Les concentrations minimales en Fétuine provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait *Pinus sylvestris*.

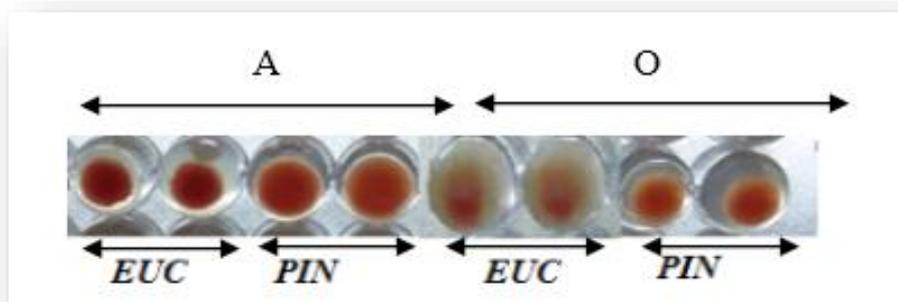
L'extrait d'*Eucalyptus globulus* a démontré une inhibition avec certaines glycoprotéines (BSA, Caséine, Fétuine) ce qui prouve la différenciation de ses récepteurs. La concentration minimale a été calculée avec ces glycoprotéines et a été démontré qu'elle est  $< 0,0125$  g/ml,  $< 0,05$  g/ml,  $< 0,00003$  g/ml au niveau du 3<sup>ème</sup>, 1<sup>er</sup> et 5<sup>ème</sup> puits respectivement. En utilisant une concentration initiale de 0,1g/ml, par contre, l'extrait de *Pinus sylvestris* démontré une inhibition avec une seule glycoprotéine qui est le Fétuine à une concentration de 0,0000004g/ml au niveau de 11<sup>ème</sup> puits ce qui indique que le Fétuine est un très fort inhibiteur par contre dans le cas de la lectine extraite à partir d'*Eucalyptus globulus*. C'est résultats est d'accord avec celle de *Pistacia Lentiscus* (Necib *et al*, 2015) qui montre une inhibition avec les glycoprotéines sauf l'ovalbumine qui a exprimé une agglutination avec d'*Eucalyptus globulus*, et seulement avec le fétuine pour *Pinus sylvestris*.

## 7. L'effet d'agglutination sur les hématies humaines ABO

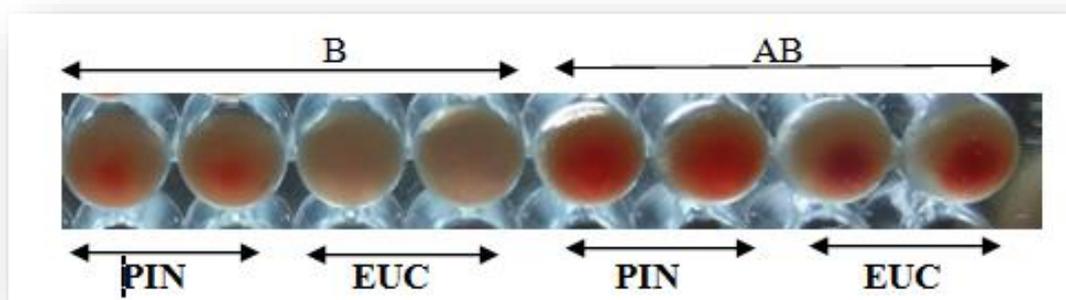
**Tableau15** : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*

	A	B	AB	O
<i>Eucalyptus globulus</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Pinus sylvestris</i>	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination



**Photo 15 :** L’agglutination des hématies humaines (A, O) par l’extrait brut d’*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*.



**Photo 16 :** L’agglutination des hématies humaines (AB, B) par l’extrait brut d’*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*

Les extraits des d’*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* agglutinent assez fortement tous les types de groupe sanguins humains, Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Diplotaxis assurgens*, *Raphanus sativus*, *Brassica tournifortii* et *Geotrupes Stercorarius* (Devi et al, 2014 ; Deeksha et al, 2015) respectivement qui ont la même Propriété. Sur la base de ces résultats nous pouvons classer les lectines d’*Eucalyptus globulus* et *Pinus Sylvestris* dans la catégorie des lectines Agglutinent les érythrocytes de tous les groupes Sanguins humains, qui sont généralement Désignées comme non spécifique.

### 8. L’effet des métaux (oligoéléments)

**Tableau16 :** les Résultats du test des métaux avec *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*

	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>
<b>EDTA</b>	++	++
<b>MgCl2</b>	+++	+++

CaCl <sub>2</sub>	+++	+++
MnCl <sub>2</sub>	+++	+++
FeCl <sub>2</sub>	+++	+++

+++ : Très forte agglutination

++ : Forte agglutination

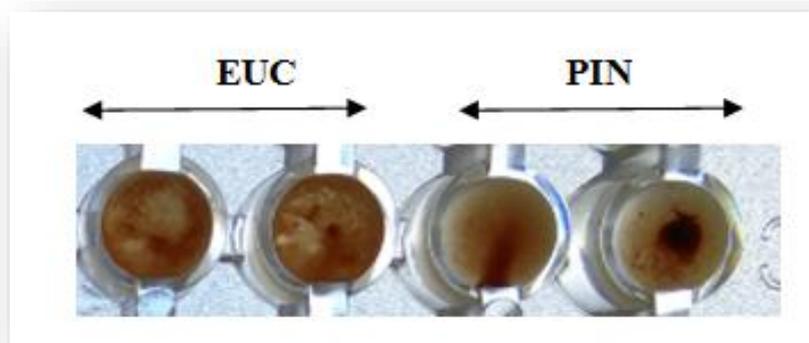


Photo 17 :L'agglutination de lectines de *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* après l'incubation avec EDTA.

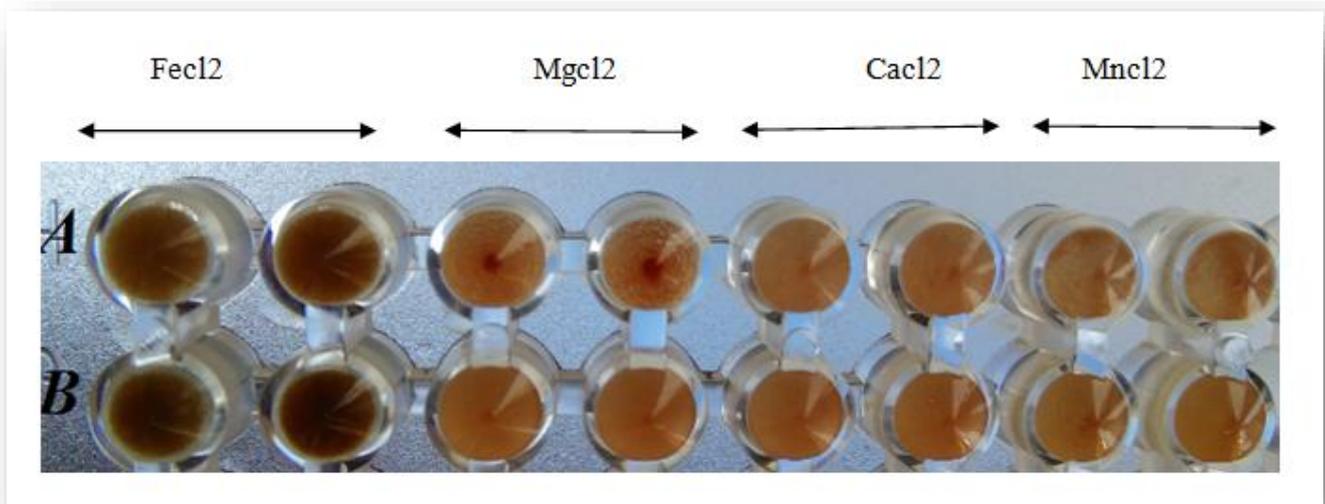
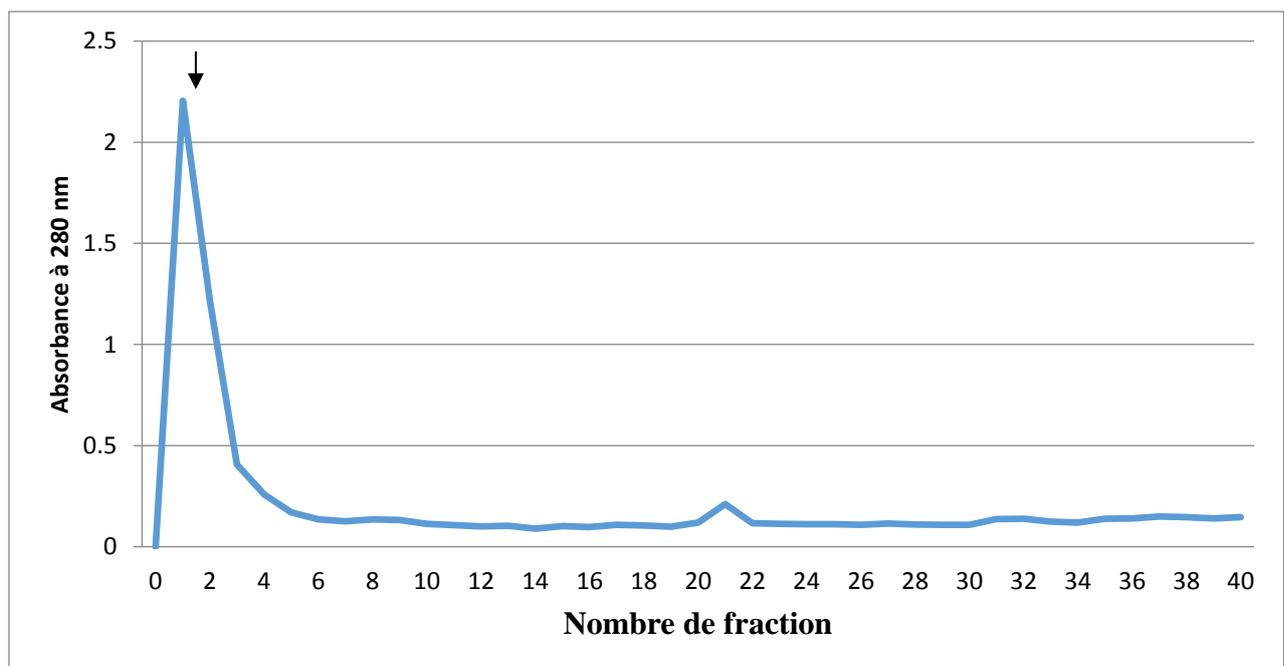


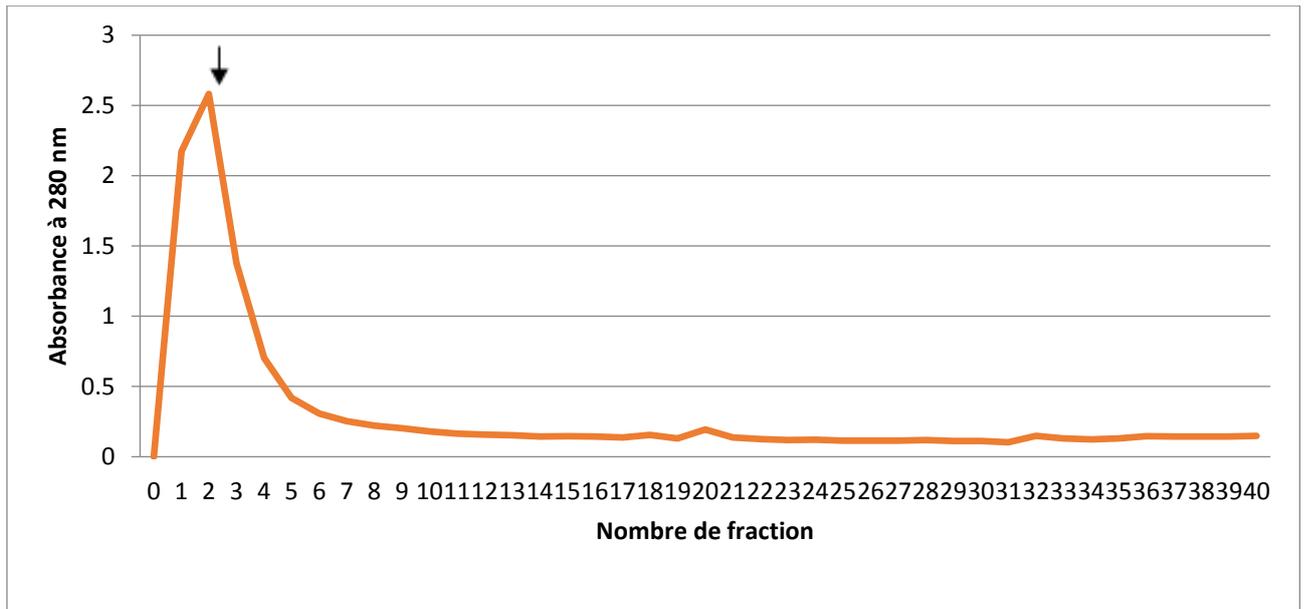
Photo 18 :L'agglutination de lectines d'*Eucalyptus globulus* (A) et *Pinus sylvestris* (B) avec les métaux testés.

L'hémagglutination n'a pas été influencée par l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou de l'agent Chélatant EDTA, ce qui suggère que les cations divalents ne sont pas essentiels à l'activité Hémagglutination, Ces résultats sont cohérents avec les études menées sur *Geotrupes Stercorarius* (Devi *et al*, 2014), et *Clarias gariepinus* (Odekanyin *et Kuku*, 2014).

## 9. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75



**Figure 10 :** Courbe représenté la Filtration d'extrait d'*Eucalyptus globulus* sur colonne de Sephadex G75.



**Figure 11 :** Courbe représenté la Filtration d'extract de *Pinus sylvestris* sur colonne de Sephadex G75.

Le volume de rétention : 5ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

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

La filtration des extraits d'*Eucalyptus globulus* (figure 10) et de *Pinus sylvestris* (figure 11) sur colonne de Sephadex G75 et la lecture à 280nm a montré un seul pic dans chaque courbe.

Afin de confirmer la présence des lectines au niveau du 1<sup>ère</sup> tube du extrait *Eucalyptus globulus* et le 2<sup>ème</sup> tube d'extract de *Pinus sylvestris*, un test d'hémagglutinine a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit dans le chapitre précédent. Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence des lectines avec une très forte Hémagglutination. . Ces résultats sont similaires à ceux des lectines de *Pterocliadiella capillacea* et des lectines de *Morus nigra* séparées par chromatographie sur colonne de Sephadex G75 (Necib *et al*, 2014) (Necib *et al*, 2015) par contre l'extract de lectines de *Ruta graveolens* séparées par chromatographie sur colonne de Sephadex G75 a donnée deux pics (Necib *et al*, 2015).

*CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes, qui sont considérés comme de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Nous avons extrait des substances à partir des racines de deux plantes médicinales : *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*, ces molécules ont une activité agglutinante sur les hématies et donc ce que signifie la présence de lectines.

Les lectines d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* sont thermorésistants, et ils sont différemment stables dans la gamme des pH neutre, alcalin et acide.

Les extraits de *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* ne présentent aucune spécificité pour les saccharides testés, Les lectines d'*Eucalyptus globulus* sont inhibés par les glycoprotéines Fétuine, caséine et BSA, et c'elles *Pinus sylvestris* sont inhibés par la Fétuine, les deux espèces ne présentent aucune spécificité pour les monosaccharides testés. L'affinité de ces lectines pour ces glycoprotéines peut être utilisée pour son purification.

Les lectines d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* agglutinent tous les types de groupe sanguins qui ne peuvent pas être utilisées comme des réactifs de groupages d'origines végétales.

Les lectines d'*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* présentent une agglutination avec les quatre métaux testée ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ).

La chromatographie sur Sephadex G75 a donné un seul pic pour les deux extraits. Ce travail peut être la première étape d'une naissance des nouveaux lectines. Les résultats obtenus avec les deux plantes, encourageant la poursuivre des études par :

Des tests de l'activité antimicrobienne, l'activité antivirale, l'activité anticancéreuse et l'activité immune modulatrice.

- La purification des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC.
- La détermination des poids moléculaire des lectines par électrophorèse et leur séquençage.

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE*

**A**lencar .N.M, Cavalcante CF,Vasconcelos .M.P, Leite KB, Aragao .K.S,

**Assreuy .A.M, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005).** Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. J Pharm Pharmacol.(57) , 919-922.

**Aragao K.S. (2009).** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de Disctyostelium discoideum. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France. Pp:17-27.

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

**Ayméric J-L, Lefranc G. (2009).** Immunologie Humaine. De Boeck & Laccier S.A.Paris.24.

**B**abosa T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinaesubtribe. 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.

**Béziat D, Courbil R, Faure C, Meudec J-M. (1996) .** La thérapeutique transfusionnelle comprendre pour réussir. HEURES DE FRANCE , 226.

**Boettner.D.R, Huston.C ,Petri.J.R, William.A.(2002).** Galactose/ Nacétylgalactosamine lectin : the coordinator of host cell killing. J. Biosci 27 , 553-557.

**Bothan .M.B, Weil .K.R(2011).** Biochimie de harper. 4éme édition. DE BOECK ,510.

**Bouchara J-P ,Trouchin G. (2003)** .Lectines fongiques et adhérence In Les Mycoses. ELSEVIER.Paris,167.

**Boucher .C. (2008)** .Une brève histoire des idées de Galilée à Einstein. FIDES,94-95.

**Boyd .W.C, Shapleigh E. (1945)** .Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). Science 119 .4193 Sumner J. B. (1919) The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. J. Biol. Chem. 37, 137-142.

**Boyd .W.C and Shapleigh E .(1954).** Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). Science.119, 419.

**Brooker.C. (2001)** .Le corps humain: étude, structure et fonction, le rôle infirmer dans la pratique clinique. 2ème édition .DE BOECK .196.

**Brooker M. I. H. &Kleinig D.A. (2006).**Field guide to Eucaliptus.Vol.1.South-eastern Australiathirdedition.Bloomings. Melbourne.

**Cavaillon J-M. (2005)** .Médiateurs de l'inflammation In Vincent J-L .Martin C. Sepsis sévère et choc septique. SPINGER-VERLAGE. France.23.

**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. 2012. pp 63-64.

**Chennoufi R., Morizur J. P., Richard H. &Sandret F. (1980).** Etude des huiles essentielles d'*Eucaliptus globulus* du Maroc. (Feuilles de jeunesse et feuilles adultes). *Riv.Ital. E. P. P. O. S.*, 62(7) : 353-357.

**Chrispeels .M.J and Raikhel NV. (1991)** . Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. Plant Cell. 3, 1-9.

**Crocker P.R. (2002)** .Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 609-615.

**Daizy R. B., Harminder P. S., Ravinder K. K. & Shalinder K. (2008).**

Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, **2565** :(12), 2166-2174.

**Dam T.K and Brewer C.F. (2002)** . Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*102, 387-429.

**Danic B, Lefrère J-J. (2011)** .La transfusion sanguine et le don de sang traité par le cinéma. *Hématologie* 17(16) ,402-409 .

**Deeksha M, Sangha K, Khurana D S, Kaur G, Bala M, Singh B. (2015)**

.Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops.

*Journal of Environmental and Applied Bioresearch*. 3(1) , 20-24.

**De Hoff P.L, Brill LM, Hirsch AM. (2009)** .Plant lectins : the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomics* 282 , 1-5.

**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.

**Devi.P.R., Kombiah. P., Sudhakar. R. G., Babu. G.** Purification And Characterization Of A Novel Lectin From *Geotrupes Stercorarius*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*,**2014**. 15 (2): 157-162.

**Dole.Aet Lindeberg S. (2005)**.Agrarian diet and diseases of affluence-do evolutionary novel dietary lectins cause leptin resistance. *Bio,med central* lid.doi .10.1186 ,1472-6823-5-10 .

**Drickamer K. (1993 )** . Ca<sup>2+</sup>-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 3, 393-400.

**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.

**Emsley.J, White H.E, O'Hara B.P, Oliva G, Srinivasan N, Tickle I.J, Blundell T.L, Pepys M.B and Wood S.P. (1994) .** Structure of pentameric human serum amyloid P component. Nature. 367, 338-345.

**Etzler .M.E. (1986).** Distribution and function of plant lectins in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine.* Orlando (USA) : Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ. Academic Press. Inc. pp 371-437.

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

**Farjon A (1984) Pines:** dessins et descriptions du genre *Pinus*. 2ème edn. E.J. Brill, Leiden, Pays-Bas, p. 235

**Gabius. H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985).** Receptor for the cell binding site of discoidin I. Cell.(42),449-456.

**Gayda, Arnaud.** Etude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie. Toulouse : Thèse, 2013

**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 folkloric medicinal plant extract *Ankaferr* blood steeper. Jint. Med. Res (36) , 163-170.

**Goldstein I.J , Hughes R.C , Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980).**  
What should be called a lectin? Nature.285, 60.

**Goldstein I. J, Poretz R.D. (1986).**Isolation physico-chimical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine. ELSEVIER. INC, 49-50.

**Gomes B .S, Siqueira A. B .S, Maria R. C. C , Teisceira V G E H, Anuda F V S, Naximmento K.S.D, De Lima A.N, Souza-Motta M, Porto A L F. (2012).**  
Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. Braz. J. Microbiol 43(2) ,770-778.

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

**Greer F, Brewer AC, Pusztai A. (1985).** Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. Brit. J. Nutr. 54, 95 -103

**Guénard H et al.(2001).** Physiologie humaine. 3ème édition. PARDEL , 497

**Guillaume J. (1993).** Nutrition et Alimentation des Poisson et Crustacés.  
Terrain,396

**Guillot .J, Guerry M, Kanska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M and Penault-Llorca F. (2004).** Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. Bull Cancer. 91, 141-158.

**H****ardman K.D and Ainsworth CF. (1972).** Structure of concanavalin A at 2.4 A resolution. Biochemistry. 11, 4910-4919.

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

**Hung Y, Tan J.M, Wang Z Y I S W, Hung X, Wang W, Ren Q. (2014).** Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 2014. 46, 255–266.

**Imberty Anne. (2011).** Les bactéries aiment nos sucres : approche structurale et thermodynamique des interactions protéines et glucides In « De la recherche à l'enseignement 8 Septembre 2012 ». Société Chimique de France. Paris Tech , 1-12.

**Imberty A and Varrot A. (2008).** Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*18, 567-576.

**Imberty A, Mitchell EP and Wimmerová M. (2005).** 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. pp 502.

**Jain D, Kaur K J, Salunke D M. (2001).** Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys J.* 80 ,2912-2921.

**Jeyaprakash A A, Katiyar S, Swaminathan C P, Sekar K, Surolia A. (2003).** Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol.* 332,217-228.

**Kaminski P.A , Buffard D et Strosberg A D. (1987).** The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant molec. Biol.* Vol. 9.N°5, pp 497-507.

**Kawsar S A, Aftabuddin S, Yasuimitsu H, Ozeki Y. (2010).** The cytotoxic activity of two D-galactose binding lectins purified from marine invertebrates. *Arch. Biol. Sci. Belgarde* 62(4), 1027-1034.

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

**Kim D.s, Lee Hj, Jeon yd et Al.** Alpha-pinène Expositions activité anti-inflammatoire par la suppression de MAPK et la voie NF-kB dans la souris péritonéale Macrophages. *Am J Chin Med.* 43, 2015, vol. 4, 731-42.

**Kramer .K.U, Green PS (1990)** Les familles et les genres des plantes vasculaires, vol. 1 Pteridophytes et Gymnospermes. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.

**Kulkarni .S.R, Tayade V.J. (2013).** Bacteriostatic activity of CON A lectin from *Canavalia ensiformis*. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 1(4),59 -63.

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

**Laija. S. N., Mahesh. S., Smitha. L. S., Remani. P.** Isolation and partial characterization of two plant lectins. *Current Research Journal of Biological Sciences*,  
**2010.** 2(4): 232-237.

**Leffler .H , Carlsson S, Hedlund .M, Qian Y and Poirier.F. (2004).**

Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433-440.

**Lenka S, Imberty A, Jaroslave K. (2006).**modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire.* Université de Grenoble I. France. pp 56- 58.

**Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986).** The lectins Properties. Functions and Applications in biologieand medicine. Academic Press INC. London LID. pp 13-24.

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

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

**Meite A , Kauame .K.G , Kati-Coulibaly S. (2006).** Substances antinutritionnelles. *Méd.Nut* 42(4), 179-187.

**Mioulane, Patrick.** Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Londres : Bordas, 1996. ISBN 2-04-027239-9.

**Mukherjee S , Zheng H , Derebe .M.G, Callenberg K M , Partch C L, Rollins D , Propheter .D.C, Jiang .Q.X.(2014).** Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature.* 505, 103–107.

**Murdock.L.L, Shade.R.E .(2002).** Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectects. *J.Agric. food. Chem.* 50 (22),6605-6611 .

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

**Naturactive.** Bien-être et santé, tout savoir sur les plantes et les huiles essentielles. 75009 Paris : Santecom S.A.S, 2014. 795282 - 03/2013.

**Necib. Y., Bahi A ., Derri. N, Fateh Merouan. F, Bouadi. H.,Boulahrouf. K.** Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**. 4(1):1707-1719

**Necib Y, BahiA ,Merouane F , Bouadi H , Boulahrouf K.(2015).** Immunomodulatory activity of lectines extracted from the red marine algapterocladiellacapillacea. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1693-1706.

**Necib Y, Bahi A, MerouaneF ,Bouadi H , Boulahrouf K .(2015).** comparative study of a new lectinextractedfromroots of plants: *Cyperusrotundus*, *Pistacialentiscus* and *Rutagraveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1720-1733.

**Odekanyin. O. O., Kuku. A.** characterization of galactose specific lectin from the skin mucus of african catfish *clarias gariepinus* burchell, 1822. *Academicjournals*, **2014**. 9(20): 869-879.

**Parham P. (2000).** Le système immunitaire. De BOECK Université ,340 .

**Peumans.W.J , Vandamme.J.M. (1995).**lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol*.109,347-352.

**Poiroux G. (2011).** Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et Biochimie*.Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier.pp 35-50.

**Pontet M. (1996).** Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines ani **Prix**

**RA, Liston A, Strauss.S.H (1998)** Phylogénie et systématique de Pinus.

Dans: Richardson DM (ed) Ecologie et biogéographie de Pinus. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, pp. 49-68. males: les galectines. Immunoanal.Biol. Spéc 11,297-305.

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

**Ramé A, Naccache P. (2001).** Transfusion sanguine. LAMARRE ,05 .

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

**Richard.H.T. (1998).** Application of lectin histochemistry and cytochemistry in diagnostic and prognosis. Methods molecular medicine 9 , 73-94.

**Robert K, Marry .M.D,PhD.(2008).** Les glycoprotéines in Biochimie de Harper. DEBOECK ,527.

**Roberts.D.L, Weix.D.J , Dahms.N.M and Kim.J.J.(1998).** Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Cell. 93, 639-648.

**Roos A, Daha .M.R, Vanpelt J, Berger S P. (2007).** Lectine liant le mannose dans les maladies rénales. Flammarion-Médecine-Science-Actualités Néphrologiques 13 , 134- 157.

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

**Rydz N, Swytun L L, Notley C , Paterson A D, Riches J J, Sponagle K , Booyawat B , Montgomery .R.R , James P D, Lillicrap D. (2013).** The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and

contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. *Blood*. 121, 5228–5237.

**Sankaranarayanan R , Sekar K , Banerjee R , Sharma V , Surolia A and Vijayan M. (1996).** A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a b-prism fold. *Nature Struct. Biol.* 3, 596-603.

**Shaista. R., Sakeena. Q., Ishfak. H. W., Showkat. A. G., Akbar. M., Rabia. H.** Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. *Pak. J. Pharm. Sci*, **2014**. 27(6): 1805-1810.

**Sharon N. (1983).** Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34. 213-291.

**Sharon N, Lis H. (1993).** Carbohydrate in cell recognition. *Scientific American*. 268(1), 82-89.

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

**Sharon N, Lis H. (2004).** History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14. 53R-62R . 11. (Sharon. N., Lis. H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 2004. 14, 53-62.

**Sharon .N and Halima, Lis. (2003).** *Lectins*. Kluwer Academic Publishers.

**She Q B, NG T B, Liu W K A.(1998).** novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 247 , 106-111

**Singh J (2012) Zoonotic malaria:** Plasmodium knowlesi, an emerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis* 25: 530–536

**Somers WS , Tang J , Shaw GD and Camphausen RT. (2000).** Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLex and PSGL-1. *Cell*. 103, 467-479.

**Sumner J B. (1919).** The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. *J. Biol. Chem.* 37,137-142.

**Sumner J B, Howell SF. (1936).** Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32(2), 227-237.

**Sutapa B M, Gopa R P. (2013).** exploring plant lectines in diagnostic. Pophylaxis and therapie. *Journal of medicinal plants research.*7(47),3444-3451.

**Sze S C W, Ho J C K, Liu W K. (2004).** Volvariella volvacea lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *J. Cell. Biochem.*y. 92, 1193-1202.

**Tanne A , Neyrolles O.(2010).** C-type lectins in immune defense against pathogens: Themurine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence.* 1, 285–290

**Topfer-Petersen E , Romero A , Varela PF , Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L and Calvete JJ. (1998).** Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30, 217-224.

**Transue T R , Smith A K , Mo H , Goldstein I J and Saper M A. (1997).** Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol.*10, 779-783.

**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. Purification,

Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*)

*Molecules*, **2011**. 16: 2561-2582

**Vandamme E J, Peumans W J , 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(6) , 575-692.

**virmani O.P. & Datta S. C. (1967)**. Oil of *Eucalyptus citriodorap*. and E. O. R. Decembre, 851-858.

**Voet D, Voet .J .G. (2005)**. Biochimie. 2ème édition. DE BOECK ,378

**Wangh .N.G .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.

**Wright.C.S and Hester G.(1996)**. The 2.0 Å structure of a cross-linked complex between snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding model. *Structure*.4,1339-1352.

**X**u .S , Wang .L , Wang .X.W , Zhao Y R B I W J , Zhao X F , Wang J X

**L.(2014)**. Type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol*. 2014. 44, 397–405 .

**Yeh .K.W, Chen.J.C, Lin .M.I , Chen .Y.M , Lin CY. (1997).** Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Mol Biol.*33,565–570 .

**Zhang .H , Peatman .E , Liu .H , Feng .T , Chen.L , Liu.Z.(2012).** Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2012. 32 , 598-608.

## ANNEXES

## Annexe 01 : Préparation du Tampon

- Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH7,4)

Pour 5 litres

Produit chimique	Quantité
Disodium phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	<b>0,435 g</b>
Monosodium phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<b>5 g</b>
Chlorure de sodium (Na Cl)	<b>45 g</b>
Eau distillée	<b>5 L</b>

## Annexe 02: Préparation des Monosaccharides et glycoprotéines .

- Préparation des monosacchari et desglycoprotéines .

Sucre/glycoprotéines	Na Cl
<b>0,1 g</b>	<b>1 ml</b>

## Annexe 03 : Préparation des Métaux et NaCl.

- Préparation des métaux (0,1M)

glycoprotéines	Quantité	NaCl
MgCl <sub>2</sub>	<b>0,095g</b>	<b>10 ml</b>
Ca Cl <sub>2</sub>	<b>0,11g</b>	<b>10ml</b>
Mn Cl <sub>2</sub>	<b>0,125g</b>	<b>10ml</b>
Fe Cl <sub>2</sub>	<b>0,164g</b>	<b>10ml</b>

- Préparation du NaCl 0,9 M :

NaCl	Eau distillée
<b>0,9</b>	<b>0,1L</b>

Année universitaire : 2016/2017

Présenté par : LOUAAR Boubaker  
LEDJASSA Ahmed

## L'extraction des lectines a partir des racines de deux plantes médicinales (*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé

### Résumé

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques. Notre étude est basée sur la recherche d'extraction, et d'étudier les différentes spécificités des lectines contenues dans les racines des deux plantes médicinales *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris*. Par le test d'hémagglutination et leur étude biologique. L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon suivie par la chromatographie sur colonne.

L'activité hémagglutinante de *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* a été de 1:10 (2048) et de 1:9 (1024) respectivement, le traitement thermique des lectines de *Eucalyptus globulus*, *Pinus sylvestris* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour leur inactivation. L'activité hémagglutinante de deux plantes reste stable toute au long de la gamme de pH testée de 1 jusqu'à 12 pendant une heure. Un test d'inhibition avec différents monosaccharides et glycoprotéines qui a montré que les lectines de *Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris* ont été spécifiquement et seulement inhibées par les glycoprotéines : Féruine, caséine, BSA et Féruine respectivement. Un test des métaux a été réalisé et qui a démontré que nos lectines ne comptent pas sur les métaux comme cofacteur pour agglutiner les érythrocytes.

Pour le test d'ABO, les lectines extraites de nos plantes ne possèdent aucune sélectivité vis-à-vis des groupes sanguins humains.

La purification sur colonne de Sephadex G75 ont montrés un seul pic pour *Eucalyptus globulus* correspondre au 1<sup>er</sup> tube et *Pinus sylvestris* correspondre au 2<sup>ème</sup> tube.

**Mots clés:** Lectines, Extraction, Hémagglutination, Système ABO, Inhibition, Sucres, monosaccharides, glycoprotéines

**Laboratoire de recherche :** BIOCHIME.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** NECIB Y

(Pr - UFM Constantine),

**Rapporteur :** BAHIA

(MCB - UFM Constantine),

**Examineur :** DJEMAI ZOUGHLACHE S (MAA - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 14/06/2017