

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière: Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie de la nutrition et santé.**

**Intitulé :**

---

**Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines du gland de chêne-liège (Quercu Suber L)**

---

**Présenté et soutenu par :** *Chouaf Nadjah*

**Le :** 01/07/2018

*Foughali Khadidja*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** *Zitouni.A* *Maitre de conférences – UFM Constantine).*

**Rapporteur :** *Hafi.A* *Maitre-assistant - UFM Constantine).*

**Examineurs :** *Necib.Y* *Professeur –UFM Constantine)*

*Année universitaire  
2017 - 2018*

# Remerciements

*Avant tout nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné les forces et la patience d'accomplir ce modeste travail.*


*C'est avec un très grand honneur que nous préservons cette page en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

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

*Nous exprimons notre sincère gratitude à MONSIEUR ZITOUNI. A, professeur à Université des Frères Mentouri Constantine, pour ses aides techniques et ses orientations. Pour tous les conseils et l'attention qu'elle nous a prodigué tout au long de la réalisation de ce travail. Pour sa gentillesse, simplicité, sa sympathie nous sommes très honorées **d'avoir** eû la chance de travailler avec lui.*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire :*

*A notre maître et président du jury Monsieur Zitouni.A professeur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire au sein de l'Université des Frères Mentouri Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez accepté de présider notre jury de mémoire.*



*A Monsieur Monsieur NECIB.Y professeur à Université des Frères Mentouri Constantine, nous sommes fières que vous ayez accepté d'examiner et de juger notre travail.*

*Un grand merci pour le docteur Toumi Sadik Eddine par son aide et ses conseils.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mme Belil Ines , pour toute l'aide qu'elle nous a prodigué*

*Nous tenons aussi à remercier Mr Belbahri Laid pour son accueil au niveau de laboratoire d'animalerie et sa patience.*

*Nos remerciements s'adressent également aux ingénieurs des laboratoires de Biochimie, d'Enzymologie et de Biochimie-moléculaire pour leur soutien matériel et courtoisie: Houcine, Leila, Sadek, Nabil et Amar.*

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

**- MERCI-**



## *Dédicace*

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

*A mon très cher père :*

*ce travail est dédié a mon père CHERIF ; qui m'a toujours poussé et  
motivé dans mes études , j'aurais aimé qu'il serait présent avec moi  
et voir ce travail , j'espère qu'il apprécie cet humble geste comme  
preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié  
pour le salut de son âme*

*A ma tendre mère :*

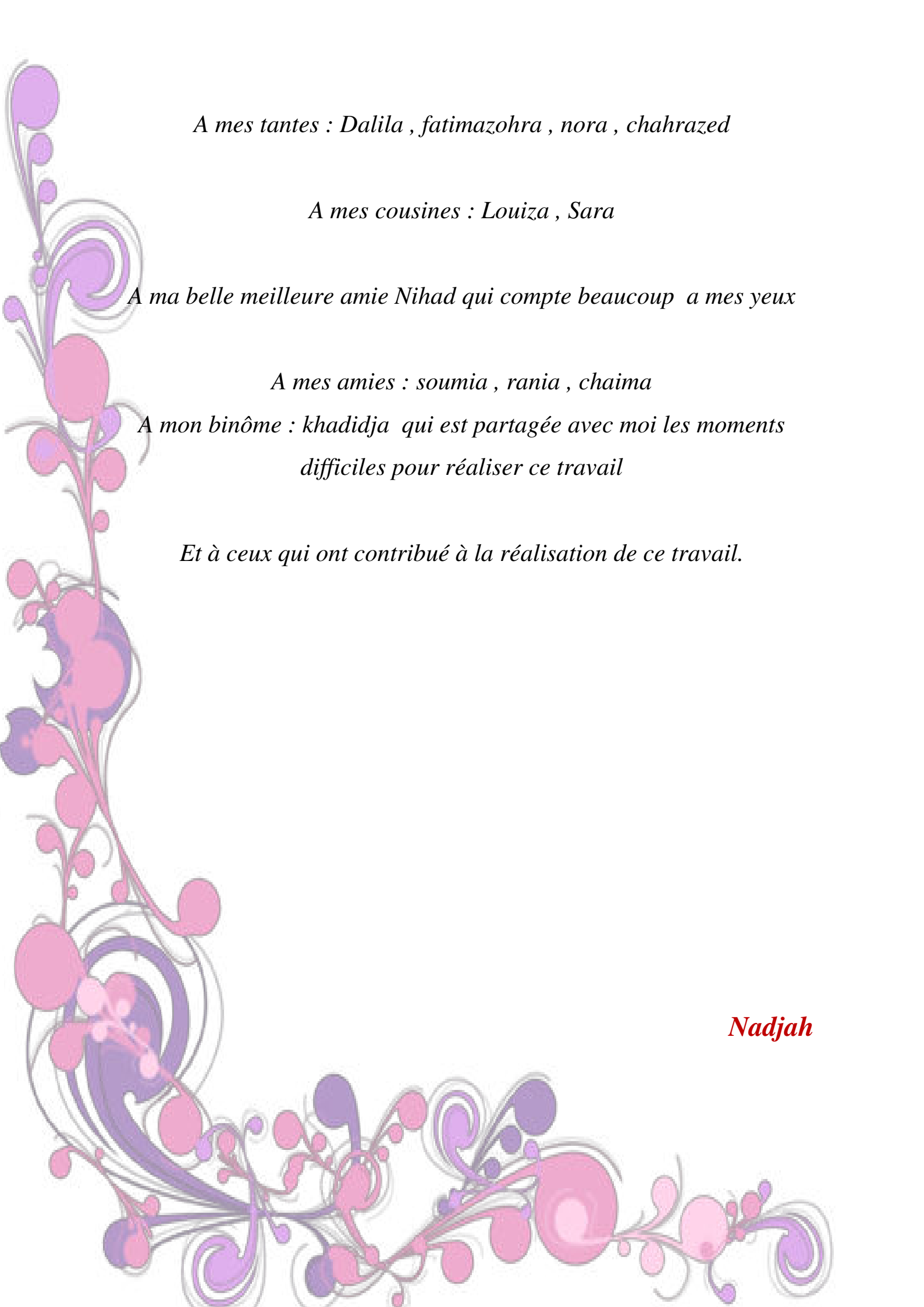
*Malika qui m'a toujours*

*Inondé de sa tendresse, qui m'a encouragé dans tout ce que j'ai  
Entrepris et a fait de moi ce que je suis aujourd'hui*

*A ma très belle chère sœur : zina*

*A mon cher frère BADREDDINE que j'aime et qui occupe une place  
unique dans ma vie et sa femme IMANE et sa belle fille MIRNA .*

*A mes chers frères : Abdelghafar et Abdelhakim*



*A mes tantes : Dalila , fatimazohra , nora , chahrazed*

*A mes cousines : Louiza , Sara*

*A ma belle meilleure amie Nihad qui compte beaucoup a mes yeux*

*A mes amies : soumia , rania , chaima*

*A mon binôme : khadidja qui est partagée avec moi les moments  
difficiles pour réaliser ce travail*

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

***Nadjah***



## *Dédicace*

A l'aide de dieu "allah" tout puissant  
Qui m'a tracé le chemin de ma vie

Je dédie ce travail qui est le fruit des années d'études qui sont pleines de réussite , d'amour, de joie et de bonheur, qui m'ont aidé dans toutes Les phases de ma vie. À celle qui s'est sacrifiée pour mon éducation et pour mon bien être ma chère mère .

A mon cher père BACHIR pour son soutien et son encouragement.

A mes chères grand-mère : Jamila et Aziza

A mon cher grand-père

A ma très chère sœur Nihed : Pour son amour ,et son encouragement

A mon cher frère : Ismail

A mes cousines : Amina , Ryma , Nadine , Imene , Amarylisse

A mes chers oncles et tantes



A mes amies : Rania , Chaima , Riheb , Racha

A mon binôme : *Nadjah qui est partagée avec moi les moments  
difficiles pour réaliser ce travail*

A toute ma famille et à tous ceux que j'aime.

***Khadidja***

## Résumé

Les lectines sont des substances de nature protéique extraits de plantes , d'animaux ou d'insectes. Ces substances sont capables de se fixer de façon spécifique et réversible à des résidus osidiques des membranes cellulaires sans montrer d'activité enzymatique .

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les graines de chêne- liège (*Quercus suber L*) pour cela ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante suivi par un test de la limite de cette dernière , rendre compte de leur ph qui été stable dans la gamme du ph 2 à 12 , leur thermo-stabilité de 40°C jusqu'à 90°C qui n'à été pas suffisante pour leur inactivation aussi un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents sucres qui a montré qui' il y'a une spécifié seulement pour la caséine , le mannose .

- La purification de nos protéines est réalisée par chromatographie sur gel de Séphadex G25, puis une lyophilisation a été réalisé aux 4 fractions obtenus de cette dernière qui ont une activité hémagglutinante.. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

l'étude des propriétés anti-inflammatoires sur un lot de 20 souris traitées avec (formaldéhyde, diclofénac et notre extrait brut et un lot témoin) et cela par deux types de traitement

( injection sous cutané / l'aponévrose de la plante du pied) . les résultats montrent que cet extrait inhibe l'œdème de la patte alors il possède un pouvoir anti-inflammatoire

**Mots clés:** lectines; activité agglutinante; inhibition; purification; effet anti-inflammatoire.



## **Abstract :**

Lectins are substances of protein nature extracts from plants , animals or insectes . these substance are fixable in a way and also reversible into saccharide residues and cellular membranes with out any enzymic activity .

The aim of these study is searching for lectins in the oak cork grains , that's way these proteins are being extracted and being teste dseveral times to look for a hemagglutinating activity ; and preceded by a limiting test taking into consideration to its ph which is stable from 2 to 12 degree , its thermo-stabilityfrom **40°C** to **90°C** which wasn't sufficient to its inactivation also was a test of its inhibition is realized by the follow of different saccharides which is show an only specification of casein and mannose.

The purification and desalating of our proteins of hasty amonium solfate is realized by the referment column's chromatography of sephadex gel G25 . A lyophilization was realise of 4 retained fractions of the last matter of each a hemagglutinating activity . the evaluation of its statue of purity is done under denaturing circumstances by (SDS-PAGE) . the study of anti-inflammatory proprieties is done on a sample of 20 micetraited with the edema .diclofenacis a well-known anti-inflammatory our rawsampleis the witness and it is done with two types of traitements ( under skin injection / feet injection ) . it permits us to obtain results supported by the statistic study which shows the evidence that this extractinhibits the edema of the foot and for that manifestes anti-inflammatory proprieties.

**Key words :**Lectins , hemmagglutinating activity , inhibts , purification , anti-inflammatory effect .

## ملخص :

الليكتينات هي مواد طبيعية بروتينية مستخلصة من النباتات او الحيوانات او الحشرات هذه المواد قابلة للالتصاق بطريقة رجعية الى سكريات على اغشية الخلايا بدون وجود اي نشاط انزيمي.

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الليكتينات في بذور البلوط الفليني ، لذلك استخلاصا البروتينات و قمنا بفحصنا مرات عديدة للتحقق من وجود اي ارتصاص و تبعنا ذلك بفحص نهائى , اخذين بعين الاعتبار درجة الحموضة و التي تكون ثابتة من 2 الى 12، و درجة حرارة ثابتة من 40 الى 90° درجة و التي لم تكن كافية لتعطيل العملية ، و كذلك اختبار تثبيط للتحقق من باقي السكريات و التي اوضحت وجود سكر الكازيين و مانوز.

ان تقنية و افقار البروتينات اللامينوسولفات المشبع حققت بتقنية غلق الخلايا الكروماتوغرافي لجال سيفادكس و حقق التجفيد عن طريق 4 تجزيئات للمادة الاخيرة ذات النشاط الارتصاصي ، ان تقييم درجة نقاوتها تمت تحت ظروف شاذة SDS-PAGE ، اما دراسة خصائص مضادات الالتهاب فقد تمت على 20 فار عولجا formaldehy diclofenac .

لتحفيز الودمة ,هو مضاد التهاب معروف، و عينتنا الخام هي الشاهد و قد تمت عن طريق نوعين من المعالجة (الحقن تحت الجلد/الحقن في باطن القدم ) ، نوعا الفحص سمح لنا ان نحصل على نتائج مدعمة بدراسة احصائية و التي اظهرت ان هذا المستخلص يثبط ودمة القدم و لهذا فقد اظهر خصائص مضادة للالتهاب

**الكلمات المفتاحية:** الليكتينات , نشاط التراص , تثبيط,تنقية ,تأثير مضاد الالتهاب ,

## Résumé

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Liste des abréviations

## Introduction

# Etude bibliographique

## *Chapitre I : les lectines*

<b>1 Généralité sur les lectines</b> .....	1
1.1 Définition .....	1
1.2 Historique.....	3
1.3 Le rôle biologique des lectines .....	5
1.4 La spécificité et l'affinité des lectines .....	7
1.4.1 Le site de reconnaissance .....	11
1.4.2 L'inhibition des lectines par des glucides .....	13
<b>2. La structure des lectines</b> .....	14
2.1 Les lectines simples .....	14
2.2 Les lectines mosaïques .....	15
2.3 Les assemblages macromoléculaires .....	16
2.4 La structure tridimensionnelle .....	17
<b>3 .La classification des lectines</b> .....	18
3.1 Chez les animaux .....	18
3.2.1 Les lectines intracellulaires .....	18
3.3.1 Les lectines extracellulaires .....	18
3.2 Chez les plantes .....	19
3.2.1 Les mérolectines .....	19
3.2.2 Les hololectines .....	19
3.2.3 Les chimérolectines .....	19
3.2.4 Les superlectines .....	20
<b>4 Les propriétés des lectines</b> .....	23
4.1 Les propriétés biologiques des lectines .....	23
4.1.1 L'interaction lectine–glucide .....	23
4.1.2 L'agglutination des cellules .....	24

4.1.3 L'activités mitogène .....	25
4.2 Les propriétés médicinales des lectines .....	25
4.2.1 La propriété anticancéreuse .....	25
4.2.2 La propriété antivirales .....	26
4.2.3 La propriété antibactérienne .....	26
4.2.4 La propriété antifongique .....	26
4.2.5 La propriété immunomodulatrices .....	27
<b>5 Utilisations et applications des lectines .....</b>	<b>27</b>
5.1 Dans le domaine biomédical .....	27
5.1.1 Immunologie .....	27
5.1.2 Hématologie .....	28
5.1.3 Biologie cellulaire .....	28
5.1.4 Cancérologie .....	28
5.2 Dans le domaine agronomique .....	29
<b>6 La distribution des lectines dans le monde vivant .....</b>	<b>30</b>
6.1 Les lectines des microorganismes .....	30
6.1.1 Les lectines bactériennes .....	30
6.1.2 Les lectines viral .....	30
6.1.3 Les lectines des champignons .....	31
6.2 Les lectines animales .....	31
6.3 Les lectines végétales .....	32
7. Le rôle des lectines dans l'immunité .....	34

## ***Chapitre II : Généralités sur le gland du chêne-liège***

1-Le chêne-liège .....	35
1.2-Description botanique .....	35
1.3- classification de chêne de liège.....	36
1.4-Cycle de vie de chêne-liège.....	36
1.4.1- La naissance d'un arbre.....	36
1.4.2 Du gland au chêne.....	37
2- Le gland.....	37
5- Des propriétés nutritionnelles intéressantes.....	38

### **Chapitre III : Matériels et méthodes.**

1. Matériels :.....	40
➤ Matériel végétal.....	40
➤ Matériel animal.....	40
➤ Protocole expérimental suivi.....	41
2. Méthode :.....	43
2.1. Préparation de l'extrait brut.....	43
2.2. Dosage des protéines.....	43
2.3. Le test d'hémagglutination... ..	44
2.3.1.La Préparation des hématies à 3%.....	44
2.3.2.La technique d'hémagglutination.....	44
2.3.3.Le teste de la limite d'hémagglutination.....	45
2.3.4.Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine.....	45
2.3.5.L'effet du pH sur l'hémagglutination.....	46
2.3.6.L'effet de la température sur l'agglutination .....	46
2.3.7.Précipitation au sulfate d'ammonium.....	46
2.3.8.la chromatographie par filtration sur gel (Séphadex G25) .....	47
2.3.9.lyophilisation.....	48
2.3.10. SDS-PAGE .....	48
3.Etude biologique de l'activité anti-inflammatoire.....	50

### **Chapitre IV : résultats et discussions**

1. Test d'hémagglutination :.....	54
2. Dosage des protéines :.....	56
3.: Test de la limite d'hémagglutination.....	56
4. Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine :.....	58
5. Effet de pH sur l'hémagglutination :.....	60
6. L'effet de température sur l'hémagglutination .....	61
7.Précipitation des lectines au sulfate d'ammonium .....	63
8.La Chromatographie sur colonne DEAE-cellulose :.....	65
9. SDS-PAGE :.....	68
10. Résultats Etude biologique .....	70

#### **Conclusion et perspectives**

#### **Références bibliographique**

# Liste des abréviations

**A**: Absorbance

**CMI** : concentration minimale d'inhibition d'héماغglutination

**ConA** : Concanavaline A lectin

**ConM** : Canavalia Maritima

**CRD** : site de liaison aux hydrates de carbonnes (*Carbohydrate Recognition Domain*)

**DiscI; DiscII** : Discoidine 1 et 2

**DEAE-C** : Cellulose diéthyl-aminoéthyle

**DO** : Densité optique

**E-coli** : Escherichia coli

**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique

**Fuc** : L-fucose

**Gal, GalNAc** : D-galactose, N-acethylgalactosamine

**Gal**: galactose

**Glc ,GLCNAC** :D-galactose,N-acethylgalactosamine

**Gal**: galactose

**Glc, GLCNAC** : D-glucose, N-acétylglucosamine

**KDa** : kilo Dalton

**Man** : Mannose

**Moringa G**: *Moringaguilandina*.

**MoringaM**:*Moriongamoringa*.

**NeuAc** : acide N-acétylneuraminique.

**nm** : nanomètre.

**PBS** : Phosphate buffer saline

**PAPG** : Pyelonephritis-associated Pili G( sous-unité).C'est une adhésine (Protéine)

**PAMPs**: Pathogen-associated molecular patterns

**PA-IIL**: *Pseudomonas aeruginosa* lectin II

**SDS-PAGE** : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**TSA**: Thermal Shift Assay

**Tris** : 2-amino-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol

**WGA**: *Wheatgermagglutin*

$\lambda$ : longueur d'onde.

# Liste des figures

- Figure 1** : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire(Gianluca, 2006). .....7
- Figure 2** : L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-III (Gianluca, 2006)... .....13
- Figure 3** : Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de canavalia ensiformis en complexe avec le tri mannoside (Lenka , 2006) .....15
- Figure 4**: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de .....16  
virus  influenz en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al., 2006).
- Figure 5**: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie. d'Ecsherichia- coli . .....17
- Figure 6** : Classification des lectines végétales proposée par Peumans et Van Damme (1995). .....20
- Figure 7** : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire . Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides. ....24
- Figure 8** : 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. ....	33
<b>Figure 9</b> : Représentation des graines de gland du chêne-liège (Quercus Suber L) . ...	36.
<b>Figure 10</b> : Schéma explicatif de la procédure expérimentale. ....	42
<b>Figure 11</b> : Traitement des souris . ....	52
<b>Figure 12</b> : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait des graines du gland du Chêne-liège . ....	55
<b>Figure 13</b> : Courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction des tubes des différentes fractions protéiques . ....	66
<b>Figure 14</b> : profil électrophorétique des différentes fractions. ....	68
<b>Figure 15</b> : rats Effet anti-inflammatoire d'un extrait de lectine après l'injection de formaldéhyde chez les.....	72

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> les lectines et leurs applications ( <b>Bothan and Weil, 2011</b> ). .....	2
<b>Tableau 2 :</b> Historique de découverte des Lectines ( <b>Ramata, 2010</b> ). .....	4
<b>Tableau 3 :</b> Lectines spécifiques pour les monosaccharides ( <b>Sharon 2003</b> ). .....	8
<b>Tableau 4 :</b> La Spécificité osidique des lectines de certaines plantes ( <b>Baracate, 2016</b> ). .....	10
<b>Tableau 5:</b> Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses ( <b>Raquel, 2012</b> ). .....	22
<b>Tableau 6:</b> Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical ( <b>Murdockl .L Shade R.E, 2002</b> ). .....	29
<b>Tableau 7:</b> L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut du gland du chêne. ....	54
<b>Tableau 8:</b> Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration. ....	56
<b>Tableau 9:</b> test de limite d'hémagglutination de l'extrait : .....	57
<b>Tableau 10:</b> concentration des protéines en fonction des dilutions en (mg/ml) à 280nm et 260nm.....	58
<b>tableau 11 :</b> test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les saccharides. ....	59
<b>Tableau 12:</b> Effet de pH sur l'activité hémagglutinante. ....	60
<b>Tableau 13:</b> Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination . ....	62
<b>Tableau 14 :</b> dosage des protéines dans les culots de précipitation .....	63

<b>Tableau 15:</b> teste de la limite de differentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait.....	63
<b>Tableau 16 :</b> l'absorbance en fonction de volume d'éluion. ....	65
<b>Tableau 17 :</b> représentation d'agglutination des fractions.....	66
<b>Tableau 18 : :</b> inhibition de l'œdème chez les différents lots de rats, en d'un prétraitement, par voie (ip), par l'extrait brut et de molécule de référence (diclofénac) et un lot temoin (formaldéhyde). ....	70

## **Introduction :**

Les lectines sont une classe des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides et d'agglutiner les cellules. Elles interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (par exemple lors de réponses immunitaires, et d'infections). **(Amit, 2016)**

Les premières lectines découvertes chez les plantes sont la ricine (présente dans les extraits de *Ricinus communis*) et l'abrine (obtenue à partir d'extraits d'*Abrus precatorius*), par Peter Hermann Stillmark en 1888, elles sont capables d'agglutiner des cellules sanguines et sont des protéines inactivantes de ribosome (RIP) **(Santos et al., 2014)**

Après cette découverte plusieurs lectines sont isolées et purifiées essentiellement à partir des plantes et sont considérées actuellement comme les principales sources des purification des lectines, elles contiennent souvent des quantités importantes de ces dernières **(Rostislav et al., 2016)** .

Les lectines végétales ont un rôle essentiel dans la défense contre les microorganismes pathogènes et les insectes, les virus, les nématodes et les prédateurs d'herbivores, et sont impliquées aussi dans l'organisation cellulaire, la protection cellulaire, les mécanismes de croissance de la paroi cellulaire, et la mitose induite **(Santos et al., 2014)**.

En raison de leurs propriétés biologiques les lectines aujourd'hui s'appliquent dans différents domaines biotechnologiques et médicales comme les applications anti tumorales exemple : les cellules de cancer du sein traitées par l'hémagglutinine *Pseudomonas aeruginosa* **(Sze et Tzi, 2011)**.

Elles peuvent induire la mort de cellules cancéreuses en ciblant les voies de mort cellulaire programmées et sont donc considérés comme un agent

anticancéreux prometteur pour une future thérapie contre le cancer (**Zheng et al., 2016**). Elles sont aussi exploitées pour d'autres activités biologiques, telles que les activités antifongiques, antivirales.

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est aussi lié sans doute à leur capacité unique de lire l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont des récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire.

Les lectines sont présentés en quantité plus importante chez les végétaux que les animaux, pour cette raison l'objectif principal de notre travail est de chercher la présence des lectines dans les graines d'une plante médicinale du chêne-liège *Quercus suber* qui n'a été jamais étudiée en Algérie sur les lectines et l'extraction de cette dernière à partir de cette plante avec des études biologiques.

## **Objectif :**

### **Objectif général :**

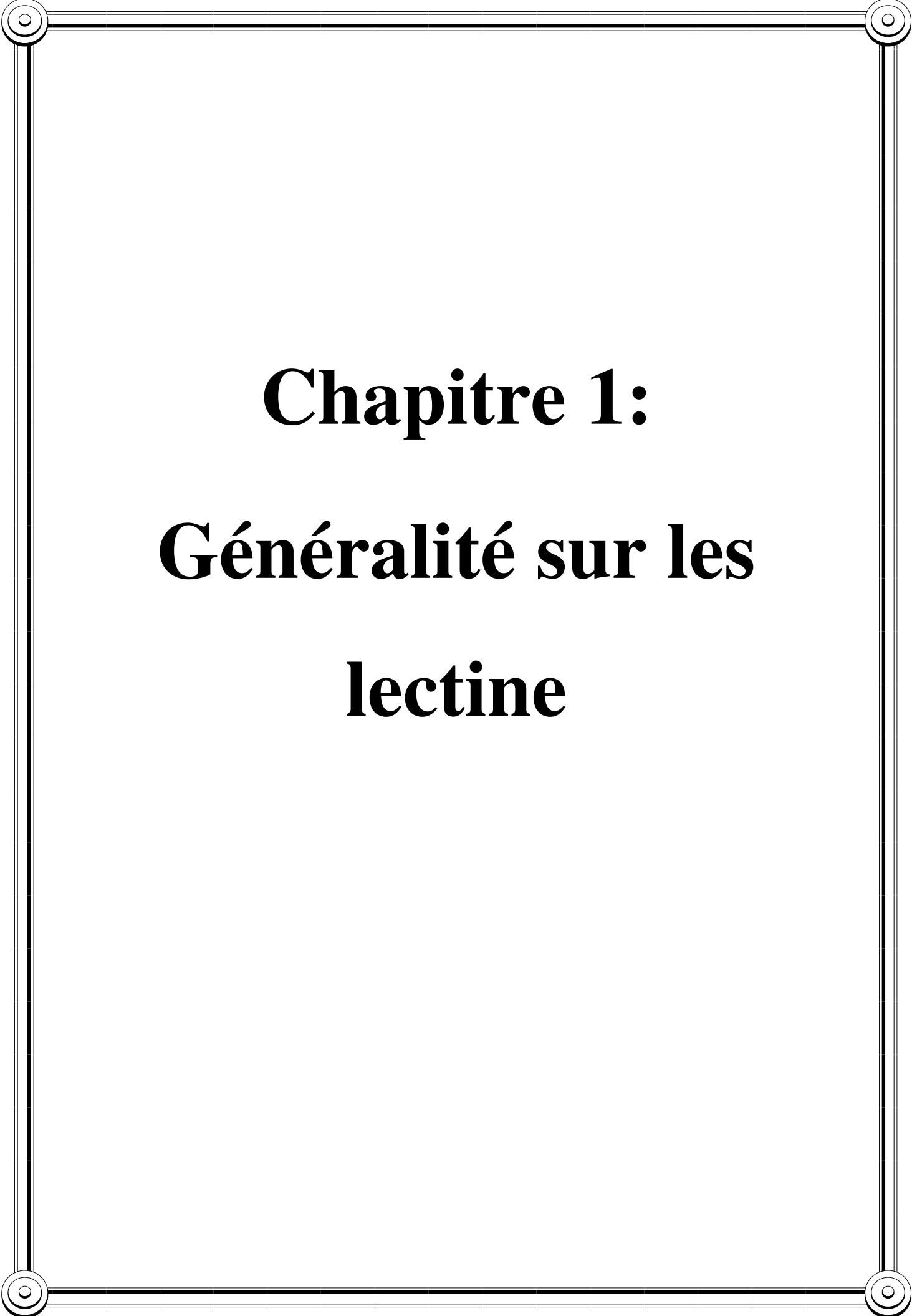
Le protocole que nous avons choisi de suivre est le suivant :

- Extraire les lectines selon une procédure que nous décrirons par la suite.
- Réaliser des tests d'héماغglutination sur l'extrait afin de confirmer leur activité et leur présence .
- Etude l'effet de la température et pH sur l'activité de ces lectines.
- Test d'inhibition d'héماغglutination en présence de différents monosaccharides et d'une glycoprotéine pour déterminer la spécificité.

- Réaliser une chromatographie sur colonne de Séphadex G25 à des fins de dessalage et aussi augmenter le taux de purification de l'extrait brut .
- Déterminer de nouveau l'activité hémmagglutinante des différentes fractions de l'éluât après dessalage et purification.
- Réaliser une lyophilisation aux fractions qui ont une activité agglutinante .
- Réaliser une SDS PAGE en conditions dénaturantes pour contrôler la pureté de notre échantillon .
- l'étude des propriétés anti-inflammatoires sur un lot de 20 souris , et déterminer si oui ou non les lectines de cette plante ont un effet anti-inflammatoire .



# **Étude bibliographique**



# **Chapitre 1:**

# **Généralité sur les**

# **lectine**



## 1-Généralités sur les lectines :

### 1.1.Définition des lectines :

Les lectines sont définies comme étant des protéines d'origine non-immunes qui se lient spécifiquement aux glucides et dépourvues d'activité enzymatique, agglutinent les cellules, précipitent les polysaccharides les glycoconjugués (**Goldstein et al** ). Ces substances ont été successivement baptisées agglutinines, hémagglutinines ou bien phytohémagglutinines et finalement lectines.

La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène.

L'agglutination des hématies est le test principal permettant de détecter les lectines. Leurs masses moléculaires sont généralement comprises entre 50 et 120 **KDa**.

Elles peuvent provoquer l'hypertrophie du pancréas et de l'intestin grêle . Ces effets néfastes des lectines sont inactivés par leur traitement thermique dont l'efficacité dépend de la durée du traitement et de la température (**Kokourek,J. and Horejsi,V.1981**) .

La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides (**Gianluca Cioci**).

Elles peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus pathologiques ainsi que dans processus biologiques (**Lis ,H. and Sharon ,N.1998**).

Aujourd’hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical :

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l’identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi,J 2004**).
- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd,W.C. and Shapleigh ,E 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

Quelques lectines importantes sont énumérées dans le **tableau 1**.

**Tableau 1: les lectines et leurs applications (Bothan and Weil, 2011).**

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

## 1.2. Historique :

La présence des protéines agglutinantes est connue depuis le début du 19<sup>ème</sup> siècle, ces protéines cellulaires spécifiques aux sucres ont été nommées lectines. L'étude de ces lectines a été introduite par **P. H Stillmark** en **1888**, qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que les extraits des graines de ricin (*Ricinus communis*) contenant des molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes (**Sharon et Lis, 2004**). Ces molécules ont ainsi nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines (**Aragao, 2009 ; Poiroux, 2011**). Ensuite **P. Ehrliche** a découvert la même activité dans l'extrait d'*Abrus precatorius* (pois rouge). A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes (**Poiroux, 2011**).

En 1919 **James B. Sumner** de l'université Cornell a isolé la première lectine, c'était la première fois qu'on a obtenu une hémagglutinine pure, la concavaline A, qui a été isolée à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) (**Sharon et Lis., 2004**).

Après cette découverte **Sumner et Howell** ont continué à travailler sur la concavaline A et en 1936 ont montré que le glycogène peut être précipité entièrement par un excès de concavaline A, mais elle se dissout en excès de glycogène ce qui décrit la spécificité des lectines pour la première fois (**Sumner et Howell., 1936**).

En 1954, des études par **Boyd et Shapleigh** ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd et Shapleigh., 1954**). Après 3 ans, **O. Mäkelä** a réalisé une étude sur des extraits de graines de 743 espèces de différentes légumineuses, il a mis en évidence qu'un peu plus d'un tiers de ces extraits possèdent une

activité hémagglutinante et qu'environ un dixième d'entre eux révèlent une spécificité envers les groupes sanguins A, B ou O.

Tous ces découvertes jouent un rôle essentiel dans les études structurales et fonctionnelles des lectines (**Poiroux, 2011**). Le tableau I montre l'historique de découverte des lectines

**Tableau 2 : Historique de découverte des Lectines (Ramata, 2010).**

Année	Auteurs	Découverts
1884	Warden et addel/Bruyllant et Venneman	Toxicité de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante 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 la graine de Croton triglium
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d'Abrus precatorius
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A (Con A)
1926	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolus

		vulgaris
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
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
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

### 1.3. Le rôle biologique des lectines :

En utilisent leur capacité unique de « lire » l'information biologique, qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des glucides (**Wiley et Skehel, 1987**). Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et des fonctions dans ces organismes vivants . Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans les processus pathologiques ainsi que dans les processus biologiques (**Lis et Sharon, 1998**).

■ Les lectines situées à la surface des bactéries, des parasites intestinaux ou des virus

reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection (**Rudiger et Gabius, 2001**). figure1

■ Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours un mystère. Une hypothèse

très probable est le rôle de défense du végétal contre les phytopathogènes ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante (**Rudiger et Gabius, 2001**).

■ Les lectines jouent un rôle important dans le système immunitaire, dont elles reconnaissent les carbohydrates qui se fixent exclusivement sur les agents pathogènes ou celle qui sont inaccessible dans les cellules hôtes (**Renata et al., 2015**).

■ Elles contrôlent les niveaux des protéines dans le sang (**Rydz et al., 2013**) car elles sont responsables au transport des peptides, protéines et les médicaments natifs (**Sutapa et Gopa, 2013**).

■ Pendant les processus de fertilisation, la reconnaissance s'effectue par l'interaction entre une lectine du spermatozoïde (spermadhesine) et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes (**Topfer-Petersen et al., 1998**).

Des exemples des lectines et leurs rôles dans les organismes vivants (**Gianluca, 2006**).

### ***1. Bactéries***

Lectines fimbriales, lectines solubles et toxines: servent à l'Adhésion, l'infection et la

formation de biofilm.

### ***1. Virus :***

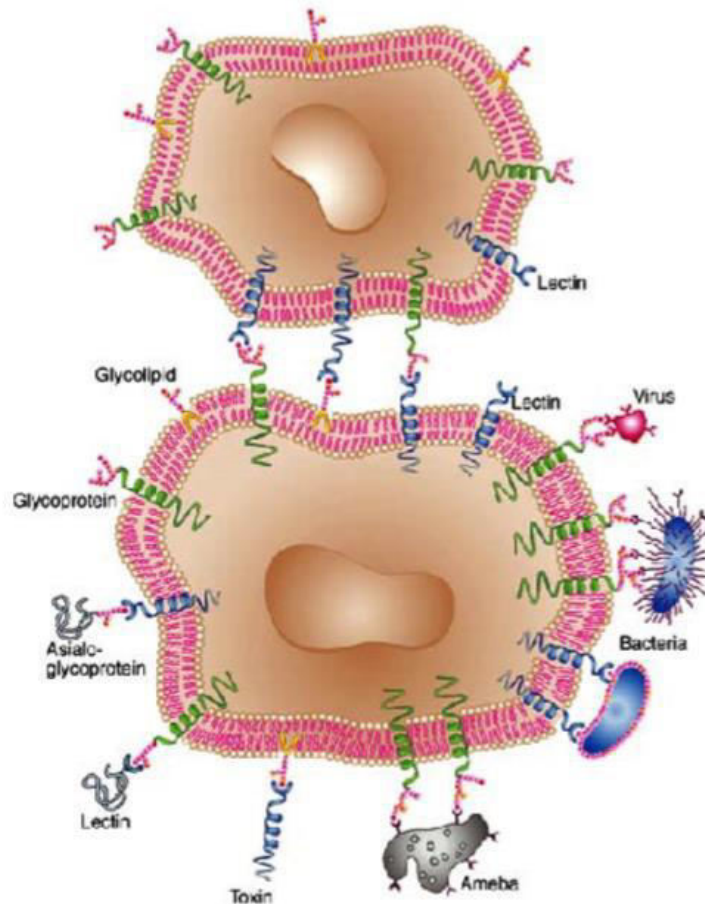
Influenza hémagglutinine : adhésion, infection .

*2.Plantes :*

Légumineuses : rôle de défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote.

**3.Animaux :**

Calnexine et L-type : Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines.



**Figure1 : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire(Gianluca, 2006).**

**1.4. La spécificité et l'affinité :**

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules,

surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon et al. 2003**).

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

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

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

**Tableau3: Lectines spécifiques pour les monosaccharides (Sharon2003).**

Monosaccharide	Lectine
Man	<i>Allium sativum ; Canavalia ensiformis ; Crocus sativus ; Dioclea grandiflora ; E.Coli type 1 fimbriae ; ERGIC-53 ; Galanthus nivalis ; MBLs of animals ; Pisum sativum ; Vicia faba</i>



Fuc	<i>Aleuria aurantia</i> ; <i>Anguilla anguilla</i> ; <i>Lotus tetragonolobus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa lectin II</i> ; <i>Ulex europaeus lectin I</i> ; <i>Ulva lactuca</i> ; <i>Chromobacterium violaceum lectin</i>
Gal/GalNAc	<i>Arachis hypogaea</i> ; <i>Coprinus cinereus</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Erythrina corallodendron</i> ; <i>Dolichos biflorus</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Griffonia simplicifolia lectin I</i> ; <i>helix pomatia</i> ; <i>Hygrophorus hypothejus</i> ; <i>Phaseolus limensis</i> ; <i>Moluccella laevis</i> ; <i>Polyandrocarpa misakiensis</i> ; <i>Ptilota filicina</i> ; <i>Ricinus communis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa lectin I</i>
GlcNAc	<i>Conglutinin</i> ; <i>Griffonia simplicifolia lectin II</i> ; <i>Tachylectin-2</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Ulex europaeus lectin II</i> ; <i>Psathyrella velutina</i>
NeuNAc	<i>Achatina fulica</i> ; <i>Cancer antennarius</i> ; <i>Hericium arinaceum</i> ; <i>Homarus americanus lectin I</i> ; <i>Limax flavus</i> ; <i>Scylla serrata</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Psathyrella velutina</i>

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

Certaines lectines possèdent deux ou plusieurs sites de fixation par molécule ce qui explique leur pouvoir de précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et entrainer l'agglutination des cellules diverses .

On peut classer les lectines en trois catégories selon la nature de leur domaine de reconnaissance glucidique :

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

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

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

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

Les interactions multiples entre d'une part les glycoconjugués et d'autre part les lectines multivalentes, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee 1995**), **Tableau 4** représente la spécificité osidique de certaines plantes contenant les lectines.

**Tableau 4 : La Spécificité osidique des lectines de certaines plantes (Baracate,2016).**

<b>Espèces</b>	<b>Spécificité</b>
<i>Abrus precatorius</i>	<b>Gal</b>
<i>Adeniadigitata</i>	<b>Gal</b>
<i>Aleuria aurantiaca</i>	<b>L-Fuc</b>
<i>Canavalia brasiliensis</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 sessilifolia</i>	<b>GlcNac&gt;Fuc&gt;Gal</b>
<i>Datura stramonium</i>	<b>GalNAc</b>

#### 1.4.1.le site de reconnaissance :

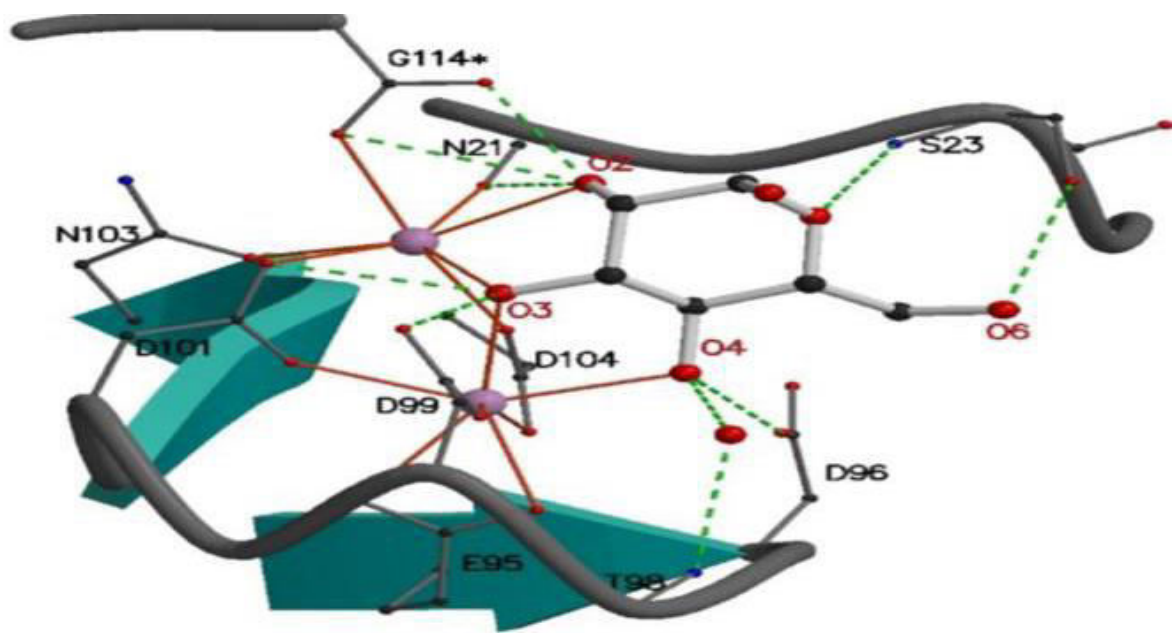
Toutes les informations disponibles sur les modes de reconnaissance ont été établies sur la base de l'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre. Dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides, les sites de liaison sont généralement des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand

qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes. (**Gianluca, 2006**).voir figure 2

Les liaisons hydrogène entre la lectine et le ligand sont des fortes interactions et très directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité.

Les chaînes latérales des résidus chargés comme l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine et l'arginine sont souvent impliquées dans les liaisons hydrogène avec les ligands. Les groupements NH ou CO de la chaîne principale de la protéine participent souvent à la reconnaissance. Une importante contribution à la force de l'interaction vient parfois des interactions hydrophobes.

Les sucres sont des molécules très polaires mais la disposition des groupements OH peut créer des zones hydrophobes qui peuvent donner lieu à des interactions avec les résidus aromatiques, comme le tryptophane ou la tyrosine. Ce type d'interaction est appelé *stacking interaction* (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).



**Figure2:L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-IIL (Gianluca,2006).**

#### 1.4.2 L'inhibition des lectines par des glucides :

La spécificité osidique des lectines est définie en terme de concentration minimale de monosaccharide nécessaire pour inhiber l'agglutination ou la réaction de précipitation induit par ces molécules (**Goldstein et Hayes, 1978 ; Goldstein et Poretz, 1986**). **Makela (1957)** suggère que les monosaccharides réagissant avec les lectines peuvent être divisé en quatre classes, la classification est basée sur la structure stéréo-isomère des groupes hydroxyles en C3 et C4 du cycle pyranose .

**I** : Les lectines qui se lient au L-fucose comme celle de *Ulex europeaus L* .

**II** : Les lectine sui se lient au galactose et/ou N-acétylgalactosamine, telle celle du soja.

**III** : Les lectines telles la ConA ou la GNA, se lient au mannose et/ou glucose.

IV : Les lectines qui se liant la L-xylose, iodose, gulose et L-glucose

## 2 . La structure des lectines :

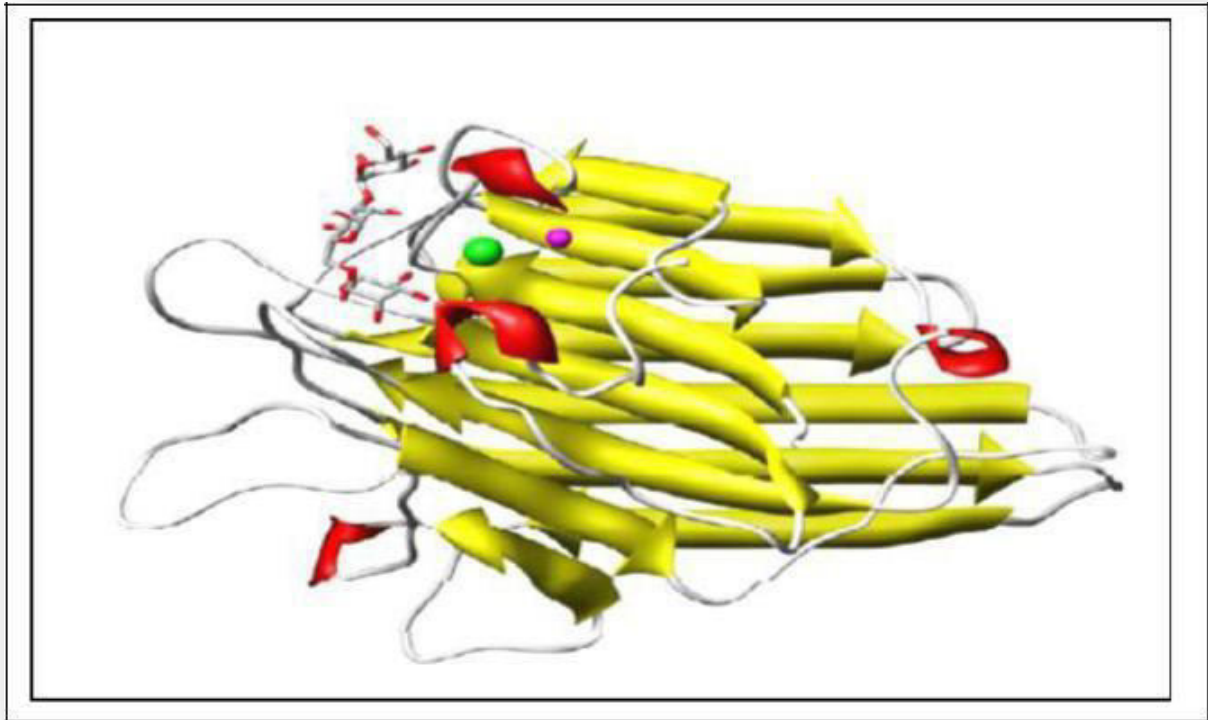
Dans les années 1970 les études ont été concentrée sur les propriétés moléculaires des lectines pour une compréhension approfondie de leurs activités au niveau moléculaire

(Kumar *et al.*, 2012).

En 1972 ils ont pu de cristalliser la première structure d'une lectine de la concavoline A qui a été déterminée par diffraction des rayons X, depuis cette date à nos jours, plus de 500structures cristallines de lectines ont été déterminées (Gianluca, 2006)

### 2.1 Les lectines simple :

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), généralement de masse moléculaire ne dépasse pas **41 kDa**. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose) (zitouni, 2015) **figure 3**

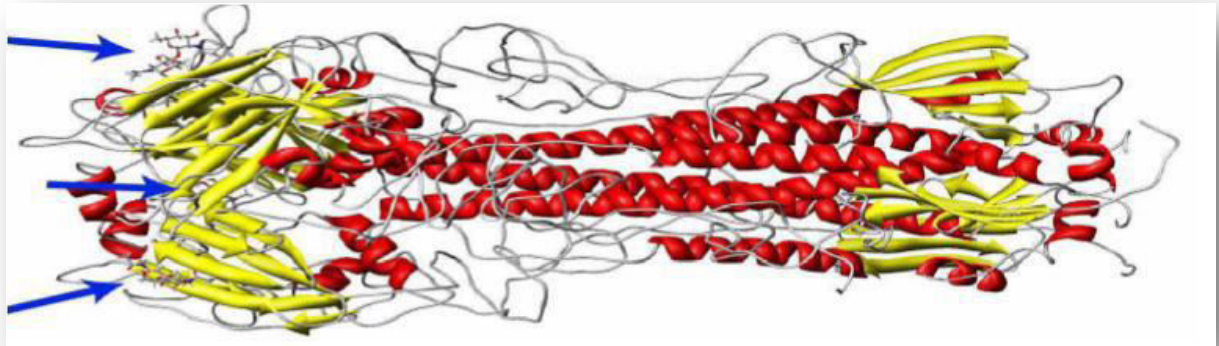


**Figure 3 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le tri mannoside (Lenka , 2006)**

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 alors que le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Lenka,2006)

## **2.2. les lectines en mosaïques :**

Ce groupe comporte diverses lectines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (zitouni, 2015).

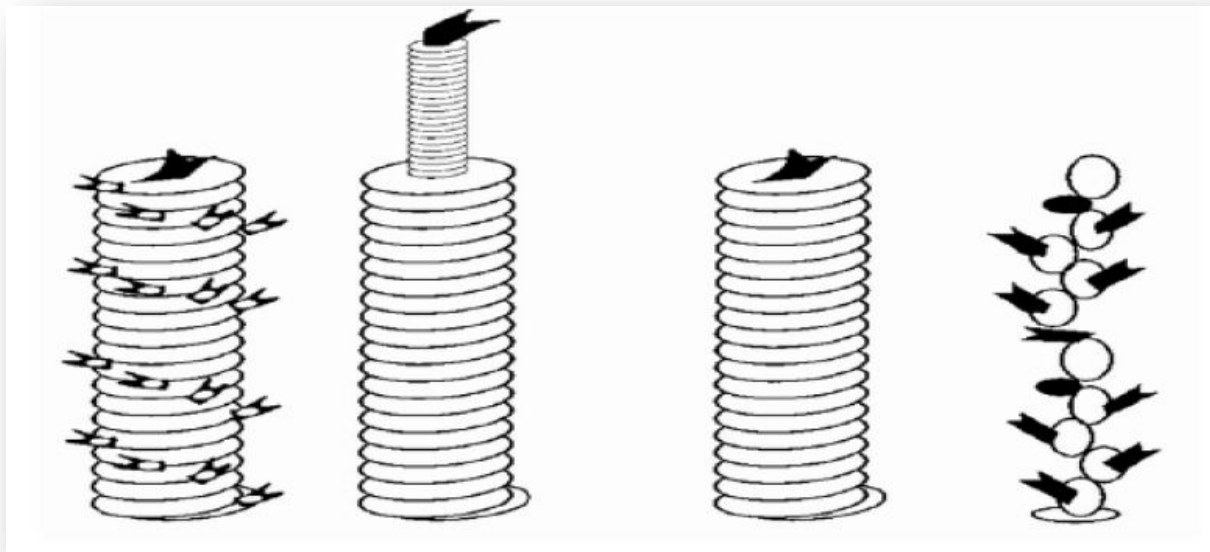


**Figure 4:** Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenz en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

### 2.3. Les assemblages macromoléculaires :

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries ou elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, elles sont 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 un site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006) Figure 5.





**Figure 5:** Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichia-coli*.

#### 2.4.La structure tridimensionnelle :

La structure tridimensionnelle des lectines est composée des feuilles  $\beta$  contactées par un nœud forment des chaînes antiparallèles avec des hélices  $\alpha$ , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon *et* Lis, 1990).

Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regrouper jusqu' à trois régions chevauchantes, la région centrale constituée par les résidus d'interaction et des ions métalliques ( $Mn^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) qui sont importants pour l'interaction, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction lectine-carbohydate.

(Sharon *et* Lis, 1990 ; Young *et* Oomen, 1992).

### 3 . Classification des lectines :

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants.

Les plantes sont une source riche de lectines et constituent la principale source (Santos *et al.*, 2014).

#### 3.1. Chez les animaux :

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

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

On peut les regrouper dans deux principaux groupes :

##### 3.1.1. Les lectines extracellulaires :

Les lectines extracellulaires comprenant toutes les autres familles, comme les lectines de type R et C, ainsi que les galectines. Elle 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).

##### 3.1.2. Les lectines intracellulaires :

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

### 3.2. Chez les plantes :

**Peumans et Van Damme (1995)** ont proposé une classification des lectines végétales en quatre groupes (mérolectines, hololectines, chimerolectines et superlectines) qui prend en compte leurs structures moléculaires mais aussi leur réactivité (nombre de sites fonctionnels)(**houles, 2001**).

#### 3.2.1. Les mérolectines :

Ce sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seule domaine de liaison aux glucides (exemple : héveïne, protéines d'orchidées) dit monovalentes (**Doumbia, 2005**). Ce sont aussi de petites protéines monovalentes incapables de précipiter des glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, et donc non agglutinantes ( **Santos et al., 2014**).

#### 3.2.2. Les hololectines :

Ce sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides dont deux ou plusieurs sont identiques ou très similaires, Cette classe comprend toutes les lectines qui ont plusieurs sites de liaison et sont capables d'agglutiner des cellules ou de précipiter des glycoconjugués. (**Santos et al., 2014**). La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines (**Doumbia, 2005**).

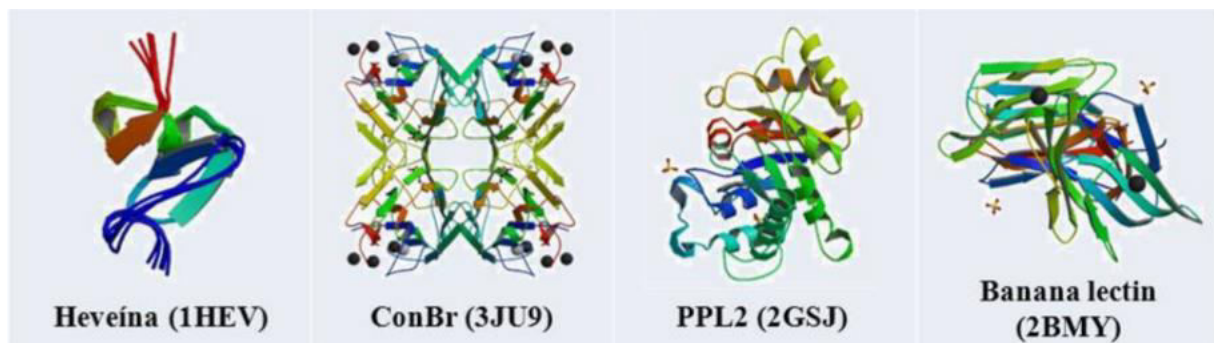
#### 3.2.3. Les chimérolectines :

Ce 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 ayant un en activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimerolectines se comportent comme des mèrolectines

(exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip ribosom inactivating proteine ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (Doumbia, 2005) .

### 3.2.4. Les superlectines :

Ce sont des oligomères poly-spécifiques constitués de plus de quatre monomères, Elles sont constituées de molécules avec deux ou plusieurs domaines distincts de liaison aux glucides (Santos *et al.*,2014).



**Figure 6 : Classification des lectines végétales proposée par Peumans et Van Damme (1995)**

Cette classification est basée sur la structure globale des lectines.

**A)** Les mérolectines possèdent un seul site de reconnaissance des glycannes.

**B)** Les hololectines possèdent au moins deux sites de reconnaissance identiques des glycannes.

**C)** Les chimérolectines sont des protéines de fusion constituées d'une chaîne polypeptidique liant les glycannes associée en tandem avec une chaîne polypeptidique ayant une activité biologique ou catalytique.

**D)** Les superlectines sont des protéines ayant deux sites de reconnaissance des glycanes de spécificité différente ( **houles, 2001**).

Il existe d'autres classifications des lectines végétales selon différents critères moléculaires

on peut classer les lectines des plantes en 7 familles :

- .Les lectines de Légumineuses .
- Les lectines mannose-spécifiques de Monocotylédones .
- Les lectines chitine-spécifiques composées de domaine hévéine .
- Les lectines RIP de type 2 .
- Les lectines apparentées à la jacaline .
- Les lectines de la famille des Amaranthaceae .
- Les lectines du phloème des Cucurbitaceae ( **houles, 2001**)

### ➤ **Les lectines de Légumineuses :**

Les lectines de légumineuses comprennent la plus grande famille de protéines de cette classe, avec environ 200 membres. Ces lectines sont tous constitués de deux ou quatre sous-unités presque identiques de 25-30 kDa, chacune avec un seul site de combinaison de glucides et un  $\text{Ca}^{2+}$  et un  $\text{Mn}^{2+}$  par sous-unité qui sont essentiels pour la liaison des glucides (**Charon,2009**).

Ces protéines peuvent être présentes dans les feuilles, graines , tiges et racines des végétaux(**Raquel, 2012**)

Les possibilités d'utilisation des lectines de légumineuses comme outils biotechnologiques sont considérables au vu du grand nombre d'études scientifiques démontrant les activités biologiques de ces molécules (tableau 5) (**Raquel, 2012**) .

**Tableau 5 : Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses (Raquel, 2012)**

Lectine	Rôle
Dgui ( <i>Dioclea guianensis</i> )	Activité antifongique
ConBr ( <i>Canavalia brasiliensis</i> ), CFL ( <i>Cratyliafloribunda</i> ), Dgui, DGL ( <i>D. grandiflora</i> ), Dvir ( <i>D. Virgata</i> )	Effet toxique sur les Mollusques
CGL ( <i>Canavaliagladiata</i> )	Activité anti-inflammatoire et Analgésique
ConBol ( <i>Canavaliaboliviana</i> )	Activité antinociceptive
ConBr, CGL, ConM ( <i>Canavaliamaritima</i> )	Effet vasodilatateur
ConM	Relaxation de l'aorte et libération d'oxyde nitrique
ConBr, DGL, DVL ( <i>Diocleaviolacea</i> )	Activation des lymphocytes
ConBr	Activité antidépresseur
ConA ( <i>Canavalia ensiformes</i> ), ConBr, CFL, DVL, DGL	Interférence dans le processus de formation des biofilms microbiens

➤ **Lectines de céréales :**

Une autre famille de lectines végétales est celle des céréales, dont un exemple important est l'agglutinine du germe de blé (WGA). Les lectines de cette famille sont toutes spécifiques pour la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylauraminique et se composent également de deux sous-unités identiques, mais elles diffèrent nettement de celles des légumineuses. Elles sont

exceptionnellement riches en cystéine et elles sont dépourvues de métaux (Charon,2009)

## 4. Propriétés des lectines :

### 4.1.Les propriétés biologiques des lectines :

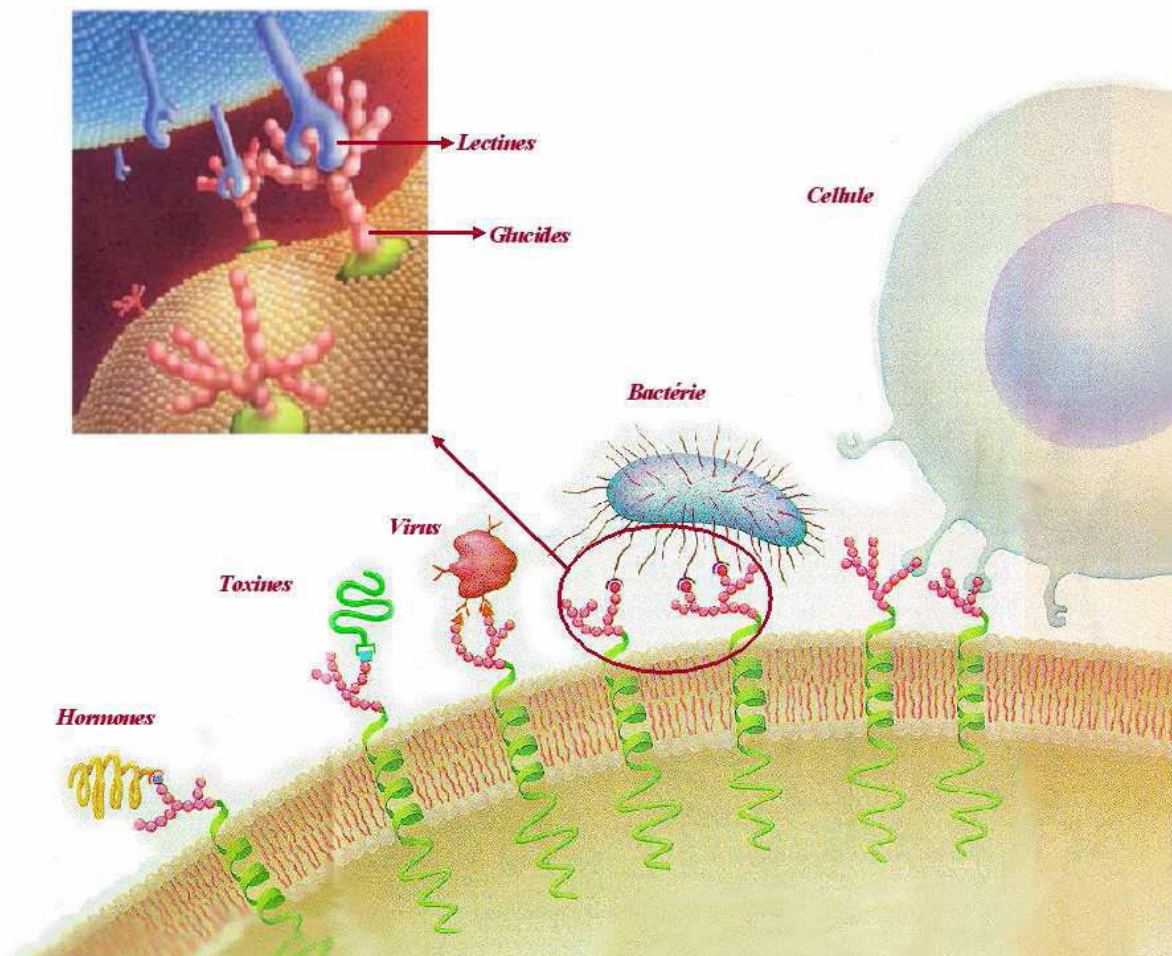
#### 4.1.1. L'interaction lectine–glucide :

Les lectines sont, dans la plupart des cas, di ou multivalentes et peuvent interagir avec des hydrates de carbone ou des glycoprotéines en solution ou liées à des membranes cellulaires et leurs sites de liaison interagissent avec des cellules pour former différents liens réversibles(Santos *et al.*,2014).

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules, cette caractéristique est typique des lectines(Karoline, 2008) .

Cette caractéristique est typique des lectines Elle est aussi classiquement utilisée pour

leur caractérisation et leur détection . Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (Karoline, 2008) .



**Figure 7 :** Rôle de glycoconjugés situés sur la surface cellulaire.

### Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides

#### 4.1.2. 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, champignon, mycoplasme). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (Baracate, 2016) .



### 4.1.3. Activité mitogène :

En 1960, **P.C. Nowel** caractérisait le pouvoir mitogène de certaines lectines montrant qu'elles étaient capables d'induire la transformation blastique, de transformer les lymphocytes en lymphoblastes et d'en induire la mitose (**Zentero, 1986**).

L'une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Ramata, 2010**).

## 4.2. Les propriétés médicinales des lectines :

Les lectines étaient considérées comme des substances toxiques uniquement destinées à être utilisées comme outils d'analyse des glycoconjugués. Cependant des études récentes ont montré leur intérêt dans le domaine médical.

### 4.2.1. La propriété antibactérienne :

Les lectines sont des phénomènes de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**Tanne et Neyrolles, 2010**). Pour cette raison , plusieurs lectines ont une activité antibactérienne, telle que l'EUL et le calnexin A qui ont une action antibactérienne contre *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* et *P. syringae* respectivement (**Qiu et al., 2012 ; Atalah et al., 2014**).

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 supportent 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**).

#### **4.2.2. La propriété antivirales :**

Dans les infections virales les lectines sont impliquées dans la fixation et inhibition de la réplication des virus (**Xu et al.,2014**). Elles sont aussi responsables à la détection des molécules pathogènes (PAMPs) liées aux virus (**Kawamura et al., 2014**). Les lectine sont la capacité de bloqué l'infection du VIH-1 par l'inhibition de l'enzyme rétro transcriptase du virus (**Tanaka et al., 2009 ; Hamid et al., 2013**).

#### **4.2.3. La propriété anticancéreuse :**

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, 2009**). Egalement ils inhibent leur migration (**Banwell, 1983**).

#### **4.2.4 La propriété antifongique :**

Parmi le grand nombre des lectines purifiées seulement une petite portion d'elles a une activité antifongique et qui reste indirect, seuls les lectines qui ont un domaine catalytique ayant cette activité, principalement elles appartiennent à la classe I des chitinases (**Andrew et al., 2014**).

Les lectine de *Phaseolous vulgaris cv* ont une activité fongicide contre *Valsa mali* (**Lam et Ng, 2010**). La même propriété est présentée par les lectines de *Tinospora tomentosa* qui ont une action inhibitrice sur la croissance du champignon *Aspergillus niger* (**Repon et al., 2014**).

#### 4.2.5 La propriété immunomodulatrice :

Plusieurs lectines exercent des activités immunomodulatrices au temps de la première interaction avec les glycanes présentent à la surface des cellules immunitaire (**Abdeljalil *et al.*,2014**).

Les lectines forment des signaux de production des cytokines (**Souza *et al.*, 2013**)

comme est le cas des lectines isolées à partir de *Viscum album L* qui ont une activité

immuno-modulatrice pour les macrophages, et elles médiate la repense immunitaire par amélioration des cytokines (**IL-3, IL-23 et TNF- $\alpha$** ) (**Lee *et al.*, 2007**).

### 5.Utilisation et application des lectines :

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

#### 5.1 Dans le domaine biomédical :

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

##### 5.1.1 Immunologie :

Les lectines mitogènes sont employées pour démontrer les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques acquises ou

congénitales, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunothérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

Certaines lectines isolées à partir des légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar *et al.*, 2005**).

### **5.1.2 Hématologie :**

Séparation des leucocytes ; identification des groupes sanguins ; isolement des macromolécules contenant des résidus saccharidiques (antigènes des groupes sanguins) (**Miége J . , 2016**).

### **5.1.3. Biologie cellulaire :**

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

### **5.1.4 Cancérologie :**

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

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

**Tableau 6: Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (Murdockl .L Shade R.E, 2002).**

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

### 5.2 Dans le domaine agronomique :

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

## 6. La distribution des lectines dans le monde vivant :

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se trouvent dans tous les classes d'organismes, chez les microorganismes (**bactéries ,virus**), chez les plants, les insectes et les animaux (**Van Damme et al., 1998**). Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines (**Aragao, 2009**).

### 6.1 Les lectines des microorganismes :

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasite eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les glycanes présents sur la surface des cellules hôte.

#### 6.1.1 Les lectines bactériennes :

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol, elles jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules hôtes (**Sharon, 1996**). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles: les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles (**Imberty et al., 2005**).

#### 6.1.2 Les lectines viral :

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (**Influenza virus**). Cette hémagglutinine associer avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, qui est l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique) (**Weis et al., 1990**).

### 6.1.3 Les lectines des champignons :

L'abondance des lectines dans les champignons est tout à fait remarquable. Elles ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi anticancéreuses et antivirales (**She et al., 1998 ; Sze et al., 2004**).

### 6.2 Les lectines animales :

Les lectines animales sont réparties dans des différentes familles . Les trois familles les plus étudiées sont :

- Les lectines de type C, elles sont soit circulants dans le plasma, ou attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire (**Somers et al., 2000**), dont l'association glucide-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (**Drickamer,1999**).
- La famille des galectines, elle regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le  $\beta$ -Gal, et sont caractérisées par la présence d'un domaine bien conservé appelé *S-type carbohydraterecognition domain* (S-CRD) (**Leffler et al., 2004**).
- Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (**Crocker, 2002**).

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 associées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (**Aragao, 2009**).

### 6.3 Les lectines végétales :

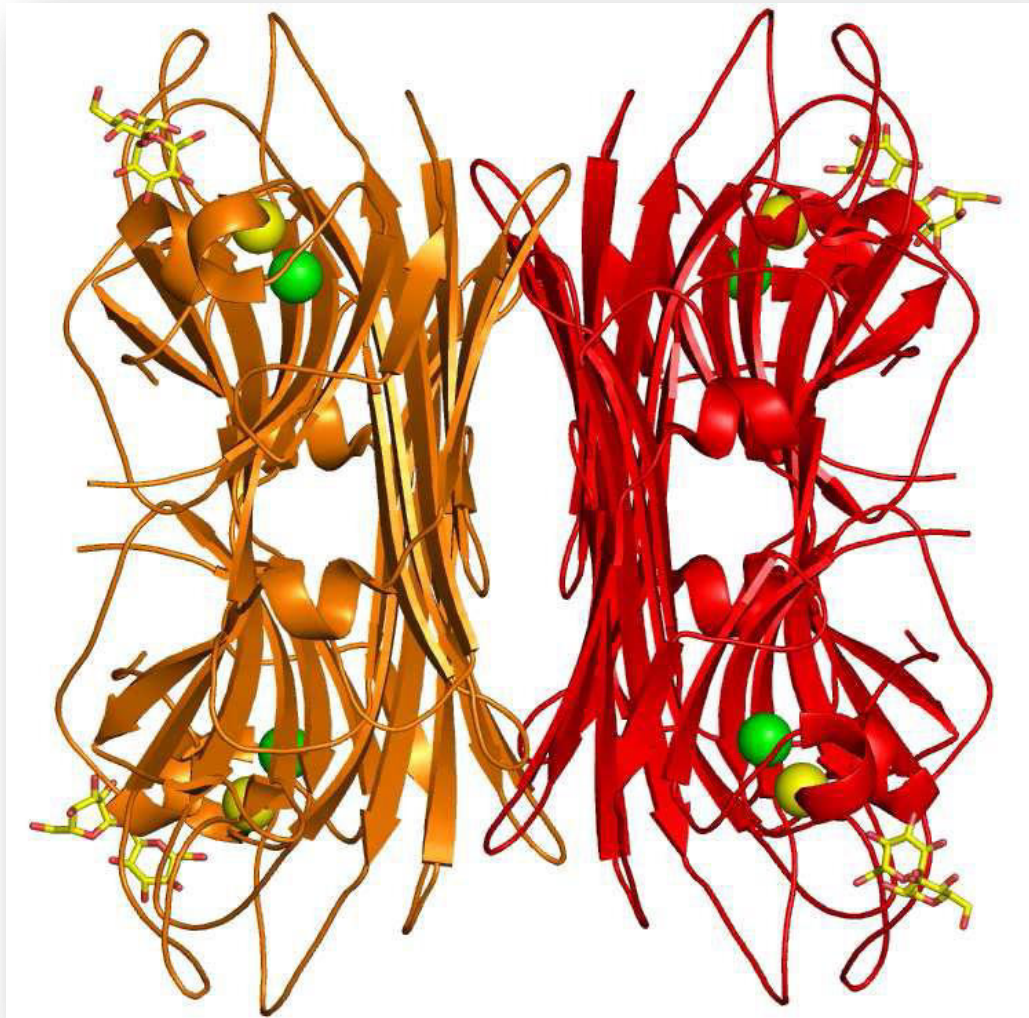
Dans les plantes, les lectines ont été trouvées dans les moisissures, les champignons, les lichens et les spermatophytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (**Grant, 1991 ; Renkonen, 1948**).

La famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales, telle que la ConA se retrouve dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de supporter une attaque par des organismes étrangers (**Nachbar et Oppenheim, 1980**).

Les lectines sont réparties dans tout l'appareil végétatif car elles sont présentes dans les tiges, les racines et les graines. Dans ces derniers elles représentent de 1-10% des protéines totales et dans certaines d'elles jusqu'à 50 %, dans les tissus végétatifs les lectines forment de 1-20% de leur contenu en protéines totales (**Peumans et Van Damme, 1995**).

Les lectines des plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Macedo et al., 2015**).





**Figure 8** : 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 .

## 7. 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 biochimiques et morphologiques 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 lutte 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 association permet l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**). La lectine liant le mannose (mannose bindinglectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine 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 glycolipides ou des glycoprotéines des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – fucose, récepteur de galactose et récepteur de  $\beta$ -glucane (**Guénard *et al.*, 2001**).

*Chapitre II :*

*Généralités sur le*

*gland du chêne-liège*

## 1-Le chêne-liège :

Le chêne-liège (*Quercus Suber L*) est un arbre de petite taille, le chêne-liège ne dépasse généralement pas 12 à 15 mètres . Il s'agit d'une espèce typiquement méditerranéenne.

### 1.2-Description botanique :

Le houppier de cette espèce est clair, laissant voir de grosses et rares branches tortueuses. Son écorce épaisse, isolante et crevassée peut atteindre 25 centimètres d'épaisseur. C'est cette écorce qui constitue la partie la plus singulière de cet arbre. Il s'agit d'un tissu végétal constitué de microcellules mortes alvéolées qui lui confèrent une densité très faible. Ses feuilles persistantes sont petites (de 3 à 5 centimètres), alternes, coriaces, ovales-oblongues et bordées de dents épineuses et cotonneuses sur leur face inférieure et persistent sur l'arbre pendant deux à trois ans. Ses fleurs jaunâtres s'épanouissent en avril-mai, les mâles sous forme de chatons et les femelles, minuscules, étant séparées sur le même pied. Ses glands oblongs, enveloppés sur la moitié de leur longueur par des cupules, sont réunis par deux sur des pédoncules courts et renflés.

#### ➤ Exigences culturales :

Le chêne-liège réclame beaucoup de soleil et de chaleur( températures moyennes annuelles douces de 12 à 19 °C). , ce qui explique qu'il ne pousse que dans les régions chaudes. Il ne tolère pas la présence de calcaire et ne se développe donc que sur des sols acides, voisinant avec le pin parasol et l'arbousier. Grâce à un système racinaire pivotant qui lui permet un enracinement très profond, il est capable de bien s'adapter à des situations de sécheresse.

' MICHEL CARON Fleurs à bulbe - Éditions Ouest-France,2005'

### 1.3- classification de chêne de liège :

- **Embranchement** : *Spermaphytes* ;

-**Sous-embranchement** : *Angiospermes* ;

- **Classe** : *Dicotylédones* ;

- **Sous-classe** : *Apétales* ;

- **Ordre** : *Fagales* ;

- **Familles** : *Fagacées* ;

- **Sous-famille** : *Quercoideae* ;

- **Genre** : *Quercus* ;

- **Espèce** : *Suber L.1753*

### 1.4-Cycle de vie de chêne-liège :

#### 1.4.1- La naissance d'un arbre :

La graine tombe (le gland de chêne ici) sur le sol dans l'humus tiède et humide. Elle y fermente, puis un jour éclate. La germination commence, ses réserves la nourrissent. Les premières racines apparaissent et pompent l'eau, les sels et les substances nutritives dans le sol. La pousse se développe, une petite tige s'élance vers le ciel. A la recherche de la lumière, les feuilles apparaissent. 50 jours après la germination, le plant a accompli la majeure partie de sa croissance de première année. S'il survit à l'hiver, il débutera sa deuxième année muni de bourgeons, d'écorce, et d'un minuscule « tronc » en bois, faisant de lui un véritable arbre miniature.

### 1. 4. 2 Du gland au chêne :

En même temps que la pousse se développe en surface, les racines se multiplient sous terre. Elles sont indispensables à l'arbre : elles lui permettent de tenir debout et de résister au vent ; c'est aussi grâce à elles que l'arbre puise sa nourriture dans la terre.

Au printemps et en été, l'arbre grandit et grossit. Des tiges avec des feuilles sortent des bourgeons et s'allongent. Dans le même temps, sous son écorce, l'arbre grossit. Il fabrique des nouveaux vaisseaux qui forment des anneaux concentriques. Ce sont les cernes de croissance que l'on observe sur un tronc d'arbre scié. Chaque cerne de croissance contient 2 couleurs (une zone claire + une zone sombre) et correspond à 1 an.

“” Sources internet : Rue Des Ecoles ; scoutorama.org ; divers”

## 2- Le gland :

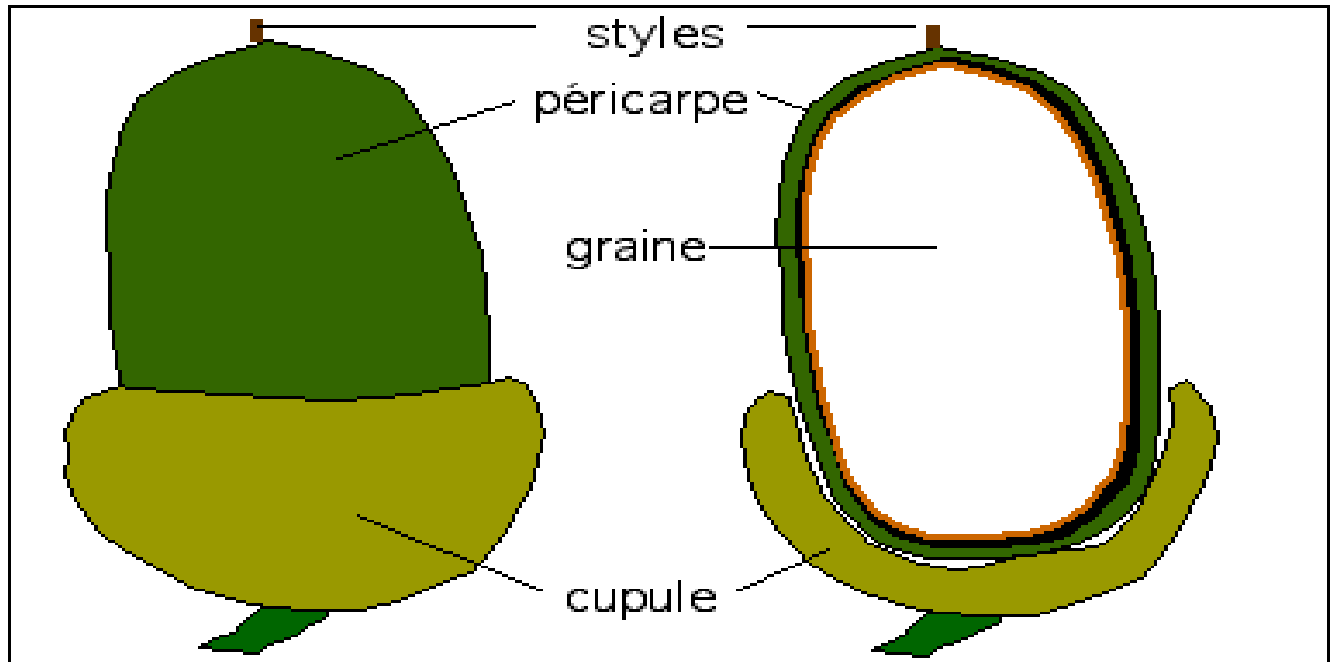
Un gland est un akène, contenant une seule semences (rarement deux graines).mûrissent généralement dans l'année même de la floraison. Ils sont de grosseur varie de 1 à 6 centimètres de long et de 0,8 à 4 centimètres de large et leur chute s'échelonne d'octobre à janvier. . Les glands prennent de 6 à 24 mois (selon les espèces) pour arriver à maturité.

le gland est entourée par une sorte de coupe qui est la cupule est portée par un gros pédoncule très court. Les écailles légèrement saillantes croissent en longueur à partir de la base.

” Saccardy L. Le Chêne-Liège et le Liège en Algérie. . In: Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale, 18<sup>e</sup> année bulletin n°203, juillet 1938. pp. 489”



**Figure 9 : Représentation des graines de gland du chêne-liège (*Quercus Suber L.*).**

**Schéma explicatif d'une graine de gland :****3- Des propriétés nutritionnelles intéressantes :**

Il existe de nombreuses variétés de chênes et leur productivité ainsi que la composition nutritionnelle des glands est variable en fonction de l'espèce et de l'environnement local. Cependant, en général, les glands sont plus caloriques par unité de poids que les grains de céréales, ils représentent une source fiable de vitamine C et d'amidon, et sont riches en magnésium, calcium et phosphore. Le gland possède également des index glycémique et insulinémique bas, ce qui le rend intéressant comme protection contre l'augmentation du glucose sanguin après les repas.

“ Par Juliette Pouyat Publié le 10/06/2014 Mis à jour le 10/03/2017 ”





# **Chapitre III :**

## **Matériels et méthodes**

### Matériels et méthodes :

#### 1. Matériels :

##### a- Matériel végétal :

Notre étude a été réalisée sur le gland de l'arbre chêne liège (**Quercus Suber L**) qui a été récolté a partir de la région de Jijel au mois de **Mars 2018** .

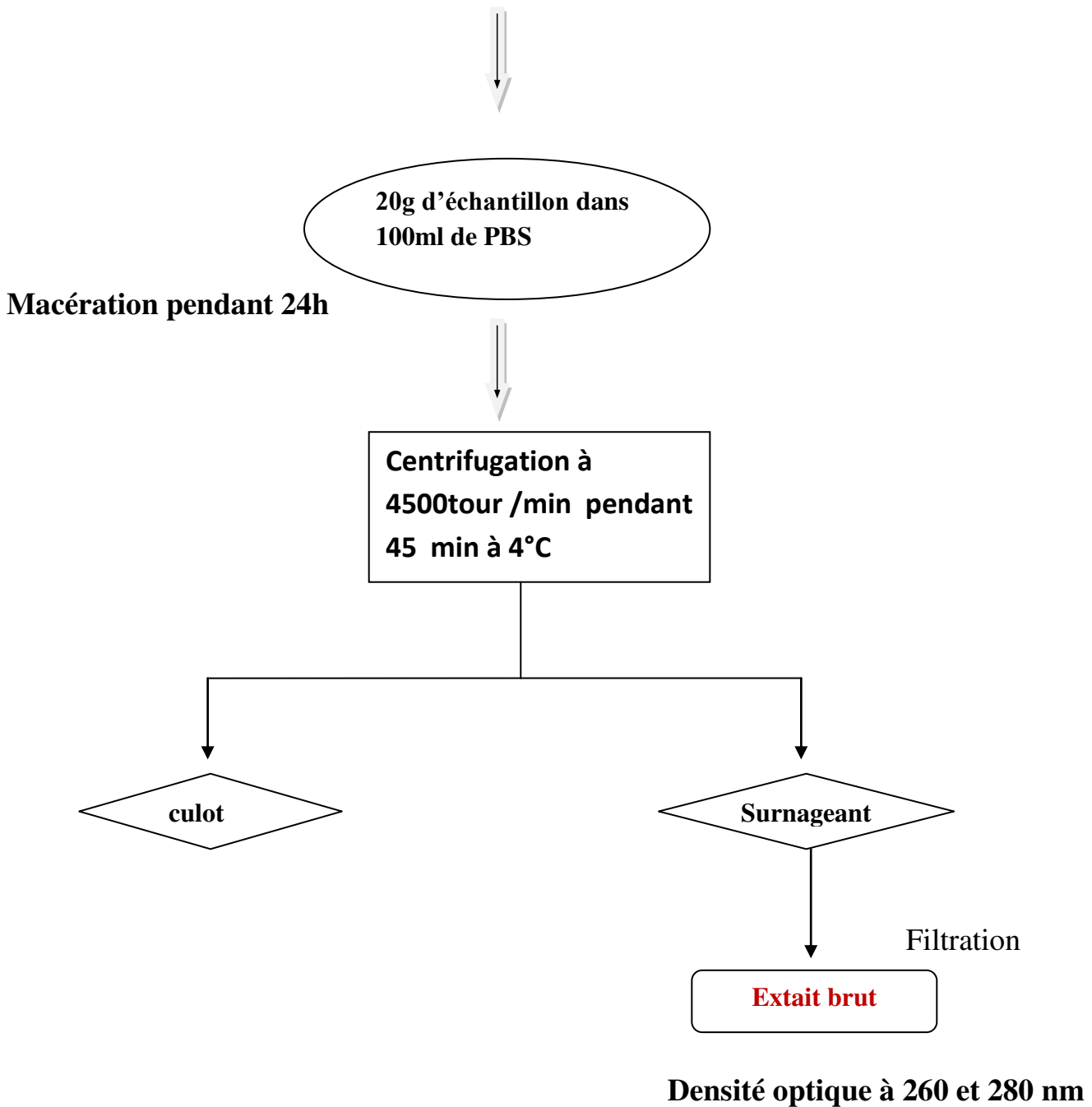
##### b-Matériel animal :

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

c- Le Protocole expérimental suivi :



100g des graines du gland sont rendus en poudre grâce a l'azote liquide



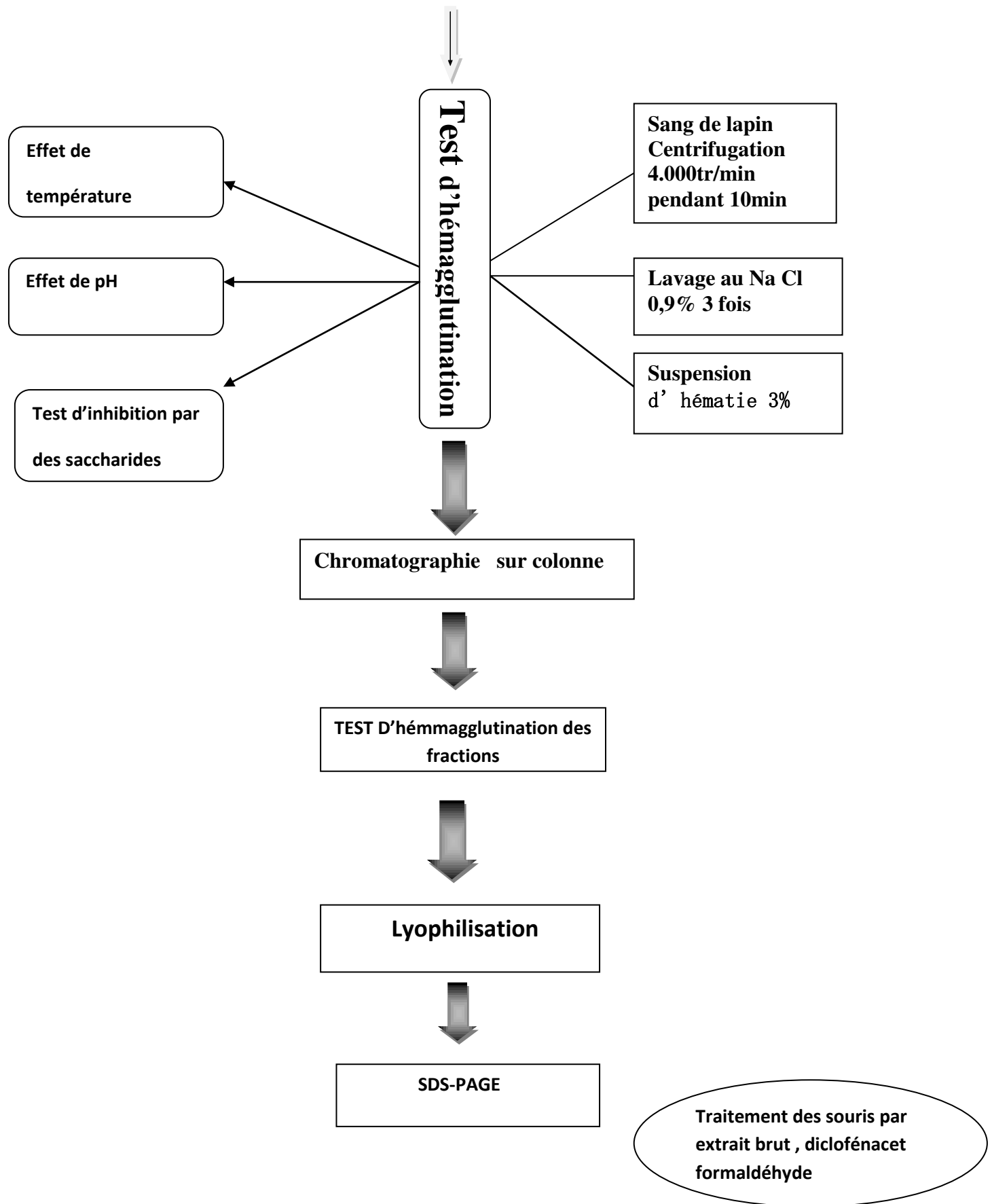


Figure 10 : Schéma explicatif de la procédure expérimentale.

## 2. Méthode :

### 2.1. Préparation de l'extrait brut :

L'extraction des lectines a été faite selon la méthode de (Budu 1988 et de Cammue et al1985).

#### a . Préparation du gland :

➤ **Séchage**: les graines du gland ont été séchées sous un courant d'air pendant 7 jours.

➤ **Broyage**: les graines ont été coupées puis broyées dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre qui a été ensuite conservée dans un flacon fermé.

#### b. L'extraction des lectines par la solution tampon :

- **Le principe :**

C'est un procédé visant à extraire certains constituants présents dans le gland ; c'est une opération de séparation solide /liquide : un corps solide (le poudre du gland ) est mis en contact dans une solution tampon . (Annexe 01).

- **La Technique d'extraction :**

20g des poudres obtenues à partir des graines ont été mises dans un flacon de 100 ml de solution tampon (0.01M pH=7.4) pendant 24h;Après la centrifugation de la suspension à 4500tr/min pendant 45min , le surnageant et le culot sont récupérés et conservés pour la réalisation des tests souhaités .

### 2.2.Dosage des protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Warburg et Christian (1941) qui ont étudié les propriétés spectrales des macromolécules et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée

d'acides nucléiques qui contaminent souvent les préparations de protéine. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à **280 nm**, pour les protéines et à **260 nm**, pour les acides nucléiques.

Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation : **[Protéines] (mg/ml) = 1.55 A<sub>280</sub> - 0.76 A<sub>260</sub>**.

### 2.3. Le test d'hémagglutination :

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les extraits aux différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein et al 1980 ; Rüdiger 1993**).

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.

#### 2.3.1. La Préparation des hématies à 3% :

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de **Higuichi et al(1988)**, de la manière suivante :

Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

- **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% )(**Annexe 02**) 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.

- **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%.

### **2.3.2.La technique d'hémagglutination :**

L'activité hémagglutinante des lectines a été réalisée dans des microplaques de titration.

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 3% . Après 1h d'incubation à une température ambiante , l'agglutination est observée à l'œil nu.

### **2.3.3.Le teste de la limite d'hémagglutination :**

Ce test nous à permis de déterminer le pouvoir agglutinant et d'en déduire le titre en lectine c'est-à-dire la concentration la plus basse à laquelle on observe une hémagglutination.

- **Technique :**

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brute (*le gland*) qui lui, est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme de concentration 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).

### **2.3.4.Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine:**

La spécificité des lectines vis-à-vis des glucides a été mise en évidence en présence d'une série des saccharides pouvant éventuellement inhiber l'agglutination des hématies de lapin.

- **Technique :**

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 NaCl 0,9%) (**Annexe 03**) (glucose, galactose, mannose, fructose ,lactose ) et glycoprotéines qui sont BSA et la caseine).

Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, cela permettre au lectine 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.

### **2.3.5.L'effet du pH sur l'hémagglutination :**

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante a été déterminé par la mise en œuvre de test hémagglutinante des lectines en utilisant le tampon PBS à différentes valeurs de pH en allant de 2 à 12, dans chaque tube à essai une petite quantité de poudre de notre plantes 1g a été mis tout en ajoutant un petit volume de tampon phosphate 4ml à différent valeurs de pH en allant de 2 à 12, Après 24 h d'incubation à 4 °C, le test d'agglutination a été effectuée sur le surnageant .

### **2.3.6.L'effet de la température sur l'agglutination :**

Les aliquotes de l'extrait brute ont été versés dans 5 tubes à essai, ces derniers ont été incubés à des température différents (40, 60, 80 et 90°C) dans un bain marie durant 1h de temps . Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à température ambiante, enfin le test d'agglutination a été fait .

### **2.3.7.Précipitation au sulfate d'ammonium:**

- **Principe :**

une des étapes initiales des procédures de purification ; Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance a précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient ; l'électrolyte le plus utilisé pour la précipitation différentielle est le sulfate d'ammonium ; ce



sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées ; il est très hydrophile et compétitionne efficacement avec les protéines ; les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines ; Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

- **Technique :**

Le fractionnement protéique est effectué sur 10 ml d'extrait brut du gland de chêne a différentes concentrations de sulfate d'ammonium (pourcentage de saturation) :30% ; 50% ; 75% ; 90% ; ajoutées par petites fractions appropriées. Le tout est soumis a une agitation mécanique a froid. Après un repos d'une heure environ, la solution est centrifugée a 45000 trs /mn pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu est éliminé et le culot est recueilli dans 10 ml du tampon et a servi pour le test d'hémagglutination.

### **2.3.8.la chromatographie par filtration sur gel (Séphadex G25) :**

Dans la chromatographie sur gel filtration, les molécules sont séparées selon leur taille et leur poids moléculaire. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance a base de dextran ;et dans ce travail la phase stationnaire est constituée du gel de Séphadex G25.

Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 1 à 25 KDa.

- **La préparation de la colonne :**

4 g de Séphadex G25 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,4). Le mélange a ensuite été incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne. Le pooling des culots issus de la précipitation a été versé lentement

dans la colonne SephadexG25 , puis il a été recueilli par l'élution avec le tampon phosphate (0,1M ; Ph7,2) dans des tubes secs (2ml/tube) .

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

Cette étape permet de quantifier les lectines séparées par chromatographie sur colonne en mesurant l'absorption de toutes les fractions, à une longueur d'onde comprise entre **260 nm** et à **280 nm**. Une courbe reliant l'absorbance en fonction des tubes (volume d'élution) est ainsi obtenue.

Seules les fractions ayant révélées une absorbance relative aux pics et donc présentant une concentration protéique appréciable ont fait l'objet d'un test d'hémagglutination. Ce test nous permet de sélectionner les fractions les plus riches en lectines afin de les soumettre à une lyophilisation et ensuite a une électrophorèse sur gel .

### **2.3.9.lyophilisation :**

c'est une technique de déshydratation a basse température et sous vide qui consiste a transformer des extraits initialement liquide en poudre .

l'extrait a été d'abord congelé puis fixé au lyophilisateur .

### **2.3.10.Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS - PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) :**

Cette méthode est utilisée pour contrôler la pureté et estimer la masse moléculaire des fractions contenant la protéine d'intérêt

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par (**Laemmli and Favre,1973**).

- **Principe :**

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique qui permet de séparer les protéines sur un support de gel en polyacrylamide et sous l'influence d'un champ électrique. La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu dans des conditions dénaturantes en raison de la présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS est un détergent anionique fort

possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. En se liant aux protéines, il leur donne une charge nette négative et les fait migrer uniquement en fonction de leurs poids moléculaire.

A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique, cette propriété leur confère la possibilité de migrer sous l'influence d'un champ électrique (certaines migrent vers l'anode, d'autres vers la cathode), dans cette technique, les protéines sont d'abord incubées avec un agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoethanol qui rompt les liaisons disulfures, et aussi avec le SDS qui est un détergent fort et qui, via sa longue chaîne hydrocarbonée forme des interactions hydrophobes avec les chaînes peptidiques des protéines de telle sorte à leur procurer une charge nette négative, dès lors elles migrent toutes dans la même direction à travers le gel de polyacrylamide et ne sont séparées qu'en fonction de leurs masses moléculaires. (**Annexe 5**)

On utilise deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation suivant la taille, précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation), moins dense permettant au préalable de concentrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées. (**Annexe 6 ; Annexe 7**).

Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 50 $\mu$ l par puits, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8).

- **Fixation, coloration et décoloration :**

Une fois la migration électro-phorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie. (**Annexe 8**)

La décoloration avec l'eau de robinet est faite le lendemain. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa.

### 3. Etude biologique :

Notre études à été mené pour évaluer l'activité anti-inflammatoire éventuelle de nos lectines , nous avons utilisé un lot de 20 souris femelles appartenant à la race Wistar de poids allant de 150 à 280 grammes , et provenant de l'animalerie de la faculté des frères Mentouri Constantine 1 . les 20 souris ont été nourries avec des croquettes dont la composition est reportée dans (Annexe 9) , placées dans un environnement à température ambiante 25°C durant toute notre période expérimentale et séparées en 4 lots différents selon leurs poids .

#### Réactifs :

- Solution de formaldéhyde à 2% .
- L'extrait brut .
- Diclofénac , comme anti-inflammatoire de référence .

#### Protocole expérimentale : (protocole modifié )

L'œdème est provoqué par injection sous cutané de la plante du pied d'une solution de formaldéhyde à 2% . Selon laquelle l'inflammation est induite par injection de formaldéhyde au niveau de la voute plantaire de la patte droite du souris . L'œdème sera traduit en volume et mesuré ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire . Pour chaque essai de l'activité anti-inflammatoire .

4 lots de 5 souris ont été utilisées . Ces souris ont été mises à jeun , 17 h avant l'essai .

- ❖ **Lot témoin négatif .**
- ❖ **Lot témoin positif :** les souris de ce lot reçoivent par voie sous cutané de formaldéhyde à 2% ( 100  $\mu$ l / g ) dans la voute plantaire de la patte droite du souris .
- ❖ **Lot référence :** les souris de ce lot ont été traités par voie intra-péritonéal avec un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique , 30 minutes avant l'injection de formaldéhyde . L'administration de l'anti-inflammatoire se fait à raison de 81  $\mu$ l / g.
- ❖ **Lot essai :** l'extrait à tester est administré aux souris par voie (ip) à raison de 84  $\mu$ l/g ; 30 minutes avant l'injection de formaldéhyde .
- ❖ Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait par mesure de la patte ; et ceci à 30,60,120 , 180 min après l'injection de formaldéhyde .
  - L'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évaluation ont été estimées par la détermination des pourcentages moyens d'inhibition de l'œdème , calculés suivant la formule :

**Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est selon Szekely et al., (1997) :**

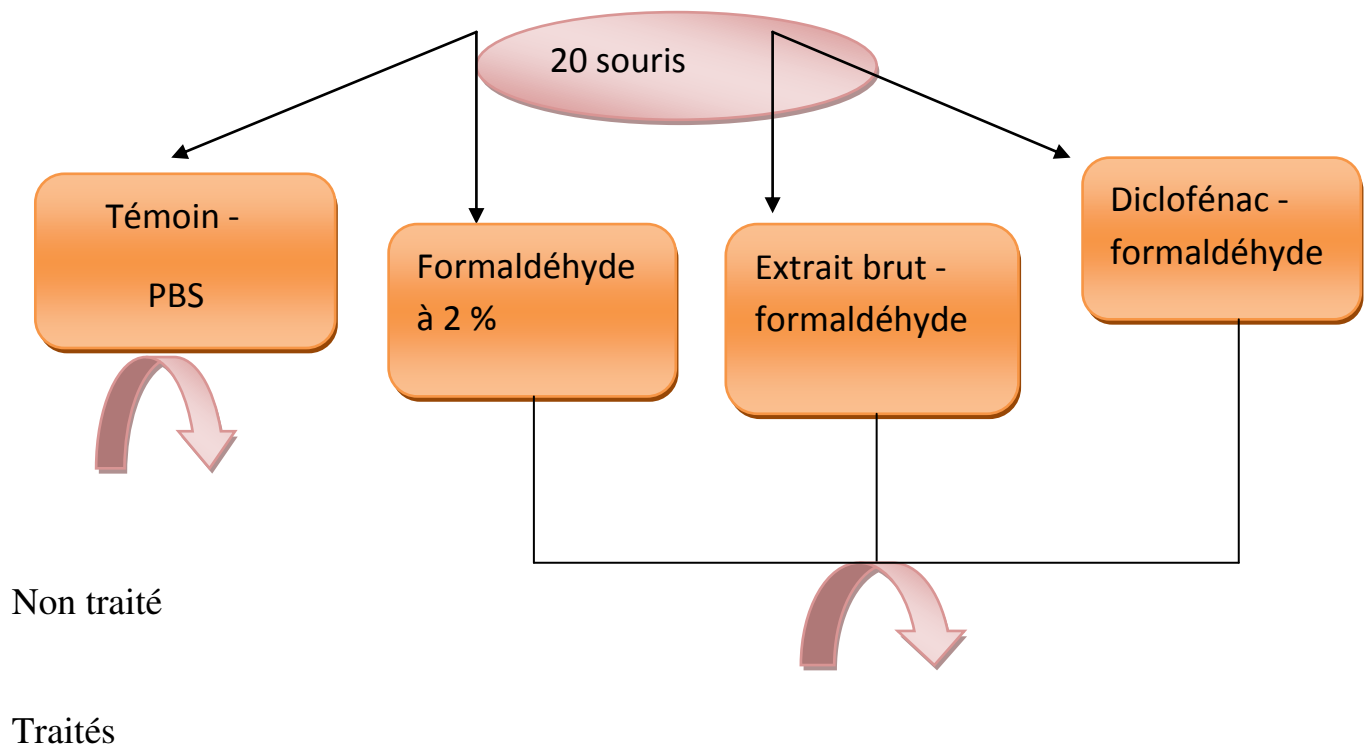
$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (VTf - VTp) / Vtf$$

- **VTf:** le volume de l'œdème chez les rats témoins ayant reçu uniquement le formaldéhyde,

- **VTp** : le volume de l'oedème chez les rats traités avec notre extrait.

Le nombre de rats utilisé pour chaque dose est de 5 .

la répartition et le traitement des souris est résumé dans la figure ci-après :



**Figure 11 : Traitement des souris**

**➤ Induction et détermination du volume de l'œdème :**

Le volume du pied est déterminé par immersion qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Nous ramenons le niveau de l'eau à sa position initiale dans la grande seringue à l'aide des deux petites seringues. Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée est directement lu sur les petites seringues.

Le volume de l'œdème  $V_T$  à un temps  $t$  donné est:

$$V_T = V_t - V_0$$

-  $V_0$  : le volume initial du pied,

-  $V_t$ : le volume du pied au temps  $t$  .



# **Chapitre IV :**

## **Résultats et discussions**



### 1. Le test d'agglutination :

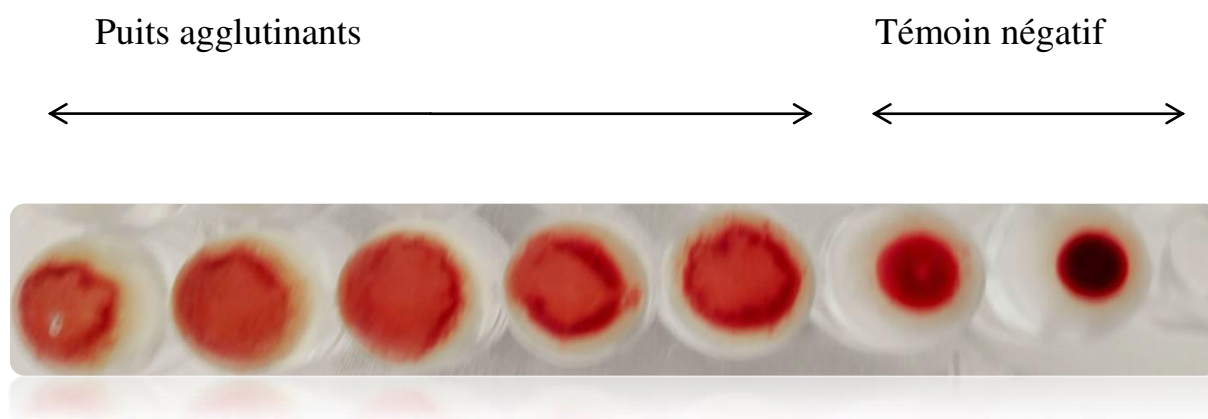
Dans ce travail ; on cherche la présence des lectines par la méthode d'hémagglutination qui repose sur l'observation de l'agglutination ou l'agrégation des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse homogène. Le tableau suivant représente l'hémagglutination des hématies du lapin avec le surnageant de notre échantillon.

**Tableau7: L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut du gland du chêne.**

plante	Teste d'agglutination
Le gland du chêne	+++

- + + + : très forte agglutination.

l'extrait du *gland du chêne* montre une bonne agglutination vis-à-vis des hématies du lapin qui a été observé a l'œil nu .cette observation est due à la fixation des lectines avec les sucres présents à la surface des hématies. ce qui prouve que notre plantes contient des lectines . ces dernières sont capables d'interagir avec des globules rouges ; cette interaction entre les lectines et les hématies se manifeste lors du dépôt des lectines au fond de puits et l'ajout des hématies ; ces derniers vont sédimenter au niveau du puits dès lors dépôt et former un réseau entre les hématies et les lectines, c'est le phénomène d'agglutination.



**Figure 12 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait du gland du Chêne-liège .**

Nos résultats montrent clairement que notre surnageant présente une très forte agglutination et par conséquent contiennent une forte concentration en lectines ; Le potentiel d'agglutination des lectines a été étudié en utilisant des érythrocytes natifs de lapin ce qui a montré une bonne agglutination. Ces 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) .

## 2. Dosage des protéines pour l'extrait brut :

**Tableau 8 : Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration.**

DO à $\lambda=260\text{nm}$	DO à $\lambda=280\text{nm}$	Concentration (mg/ml)
0.845 Dilution 1/100	0.672 Dilution 1/100	<b>0.399</b>

## 3. Test de la limite d'hémagglutination :

La limite d'hémagglutination est utilisée pour mettre en évidence soit la concentration minimale montrant une agglutination ou encore, la dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus lors du test de la limite d'hémagglutination.

Tableau 9: test de limite d'hémagglutination de l'extrait .

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
E													
T													
R		+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
Contrôle													

**E.B** :extrait Brut (50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).

**T-** : témoin négatif (50 µl de PBS+50 µl des hématies à 3%)

**R** : résultats

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination.
- : Absence d'agglutination.

D'après les résultats obtenus, on observe sur microplaque une forte activité hémagglutinante au niveau des deux premiers puits (dilution  $\frac{1}{2}$  ;  $\frac{1}{4}$ ) avec des concentrations de : 199.5 µg/ml et 99.7 µg/ml. Le pouvoir hémagglutinant de nos lectines commence à diminuer progressivement dans les cinq puits suivants allant jusqu'au septième puits( dilution 1/128) avec respectivement les concentrations : 49.8 µg/ml ; 24.9µg/ml ; 12.4 µg/ml ; 6.2µg/ml ; 3.1 µg/ml , alors qu'il disparaît complètement au niveau du huitième puits (dilution 1/256) avec une unité hémagglutinante (UH) de : 1.56 µg/ ;ils sont même plus importants que d'autres lectines de fruits de la famille *Moracées* (*Morus nigra*) qui ont présenté une moyenne activité 16UH (Derri, 2015) ainsi que les fruits

de la famille de *Fagaceae* (*Quercus fusiformis*) qui ont également présenté le même résultat 16UH (Ynalvez, et al.,2011).

**Tableau 10 : concentration des protéines en fonction des dilutions en (mg/ml) à 280nm et 260nm**

Dilution	[extrait] (mg/ml)	Dilution	[extrait] (mg/ml)
1/2	0.1995	1 / 128	0.0031
1/4	0.0997	1/256	0.0015
1/8	0.0498	1/512	0.0007
1/16	0.0249	1/1024	0.0003
1/32	0.0124	1/2048	0.0001
1/64	0.0062	1/4096	0.00009

#### 4. Le teste d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides :

Le test d'inhibition a été effectué avec certains saccharides (glucose, galactose, mannose, fructose ,lactose ) et glycoprotéines qui sont BSA et la caseine pour déterminer la spécificité des extraits aux glucides. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

tableau 11 : test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les saccharides.

	glucose	galactose	lactose	mannose	BSA	fetaine	inoline	caseine	fructose
<b>E.B</b>									
<b>T-</b>									
<b>R</b>	-	-	-	+	-	-	-	+	-

**+ : inhibition ; - : pas d'inhibition**

**E.B** :extrait Brut (50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).

**T-** : témoin négatif (50 µl de PBS+50 µl des hématies à 3%)

**R** : résultats

+++ : Très forte agglutination.

++ : Forte agglutination.

+ : faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.

Dans ce test on a utilisé l'extrait brut dilué (1/16).

L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que le sucre se trouvant dans les hématies. pour les saccharides n'ayant pas une affinité envers la lectine , celle-ci reste libre pour qu'elle puisse reconnaître le sucre des érythrocytes, et donc provoquer une hémagglutination.

La lectine du gland du chêne-liège *Quercus Suber* a été spécifiquement inhibé par le monosaccharide le mannose et la glycoprotéine la caséine qui du fait qu'il n'aient pas donné lieu à une hémagglutination, probablement présentent une

spécificité vis-à-vis de nos lectines . Ce qui n'est pas le cas pour le (glucose ; galactose ; lactose ; BSA ; inoline ; caséine ; fructose) qui présentent aucune spécificité du fait de leur agglutination vis-à-vis des hématies.

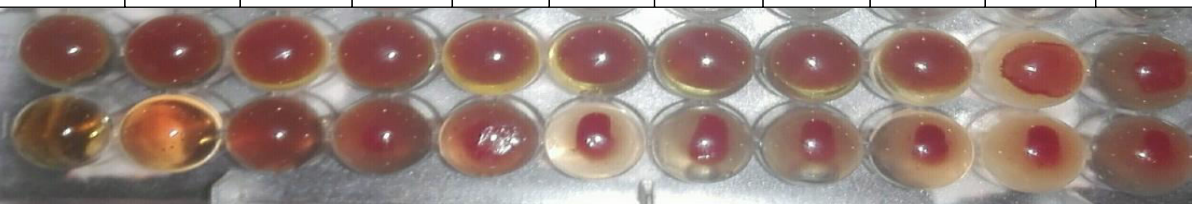
Cela révèle que la lectine n'est pas inhibée par les sucres simples uniquement mais par des glycoprotéines également.

On a comparé ces résultats avec l'extrait des fruits d'**Aegle marmelos** de class *Magnoliopsida* qui présente une affinité pour le mannose (Subramaniya, 2011). Et *Musa paradisiac* (banana) qui aussi inhibe par le mannose ( Koshte, 1990).

### 5. Effet de pH sur l'hémagglutination :

L'activité hémagglutinante de l'extrait brut des graines du gland du chêne a été testée à différents Ph ; les résultats obtenus est dans le tableau suivant :

**Tableau 12:** Effet de pH sur l'activité hémagglutinante.

ph	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E.B											
T-											
R	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+

**E.B** :extrait Brut (50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).

T- : témoin négatif (50 µl de PBS à différent ph +50 µl des hématies à 3%)

**R** : résultats

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination.

- : Absence d'agglutination

L'extrait brute du gland du chêne *Quercus Suber* montre une activité d'agglutination dans un intervalle large de [2 à 12]. La lectine a une faible activité à pH acide ; au-delà du pH 7 l'activité augmente jusqu'à atteindre d'une valeur maximale dans une zone basique de pH compris entre [7 et 10] pour revenir chuter à pH compris entre 11 et 12 ; Ceci montre que les lectines du gland du chêne *Quercus Suber* restent stables toute au long de la gamme du pH testé de [2 à 12]. Et qu'elles exercent mieux leur pouvoir hémagglutinant sur les érythrocytes à pH basique qu'à pH acide. Ces résultats ont été similaires à ceux de **Necib et al**, 2015 qui ont montré que la lectine de *Pterocladia capillacea* et *Cyperus rotundus* est stable au pH [2-12].

## 6. Effet de température sur l'hémagglutination :

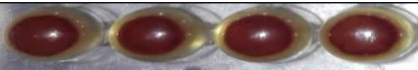




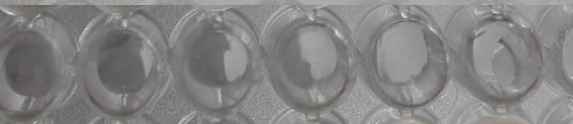


La plupart des molécules protéiques se dénaturent aux températures élevées et par conséquent elles perdent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle .

L'augmentation de la température provoque une rupture des interactions intermoléculaires ; comme les liaisons hydrogènes qui stabilisent la structure spatiale ou la forme tridimensionnelle native. Cette dénaturation entraîne la perte totale ou partielle de l'activité biologique. Dans le cas d'une lectine, la dénaturation détruit ses capacités d'hémagglutination.

Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différentes températures 40, 60, 80 et 90 °C. sont présentés dans le tableau suivant :



**Tableau 13: Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination .**

T°	EXTRAIT	Temoin	
40°C			++
60°C			++
80°C			++
90°C			+

T° : Température

{
   
 (++) : Forte agglutination
   
 {
   
 (+) : Faible agglutination

Le traitement thermique des lectines des graines du gland du chêne à différentes températures de **40, 60, 80, 90°C** pendant une heure, 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 *Pterocladia capillacea* et les racine des plantes *Cyperus rotundus*, *Pistacia Lentiscus* et *Ruta graveolens* pousse jusqu'à 100°C (Necib et al, 2015).

### 7. Précipitation des lectines au sulfate d'ammonium :

Différents niveaux de saturation  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ont été utilisés pour purifier partiellement l'extrait brut ; ensuite une centrifugation a été faite pour chaque fraction (0-30% ; 30-50% ; 50-70% ; 70-90%) on a obtenu 4 culots ; le tableau suivant présente la concentration en protéine pour chaque culot :



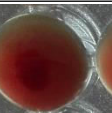
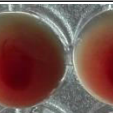


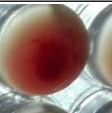


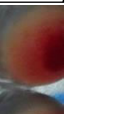

**Tableau 14 : dosage des protéines dans les culots de précipitation .**

<i>culots</i>	DO à $\lambda=260\text{nm}$ <i>dilution 1/100</i>	DO à $\lambda=280\text{nm}$ <i>dilution 1/100</i>	Concentration (mg/ml)
<b>0-30%</b>	<b>0.610</b>	<b>0.441</b>	<b>0.210</b>
<b>30-50%</b>	<b>0.682</b>	<b>0.473</b>	<b>0.214</b>
<b>50-70%</b>	<b>0.799</b>	<b>0.586</b>	<b>0.303</b>
<b>70-90%</b>	<b>0.711</b>	<b>0.543</b>	<b>0.301</b>



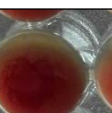
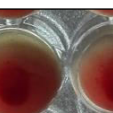
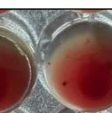
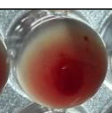
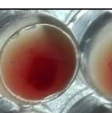
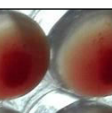

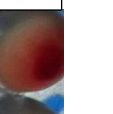

Nos résultats montrent que les quatre culots présentent des concentrations en protéines non négligeables, ensuite on fait le teste de la limite pour chaque culot.

**Tableau 15 : teste de la limite de différentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait**


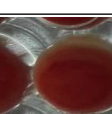
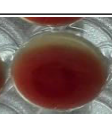
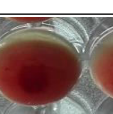
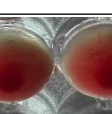
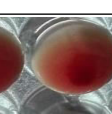
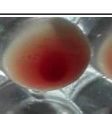
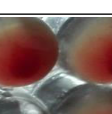

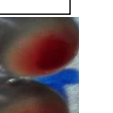

FRACTION 0-30%												
C 1												
	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FRACTION 30-50%												
C2												
	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

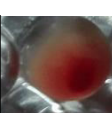

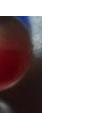
  

FRACTION 50-70%												
C3												
	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FRACTION 70-90%												
C4												
	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T			
---	---	---	---

**C** : culot

**T** : témoin négatif

**R : résultat**

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- : Absence d'agglutinations

le teste d'hémagglutination prouve la présence d'une faible activité agglutinante dans les quatre culots soumis au test ; et ce avec la même limite d'hémagglutination.

C'est uniquement pour cette raison là qu'on a pris l'initiative de mélanger les quatre culots afin d'enrichir notre échantillon qui servira pour la suite des opérations .

### 8-La Chromatographie sur colonne de sephadex G25 :

Les résultats de la mesure d'absorbance à 280 nm après la collection de 49 fractions sont réunis dans le tableau suivant :

**Tableau 16 :** l'absorbance en fonction de volume d'élution.

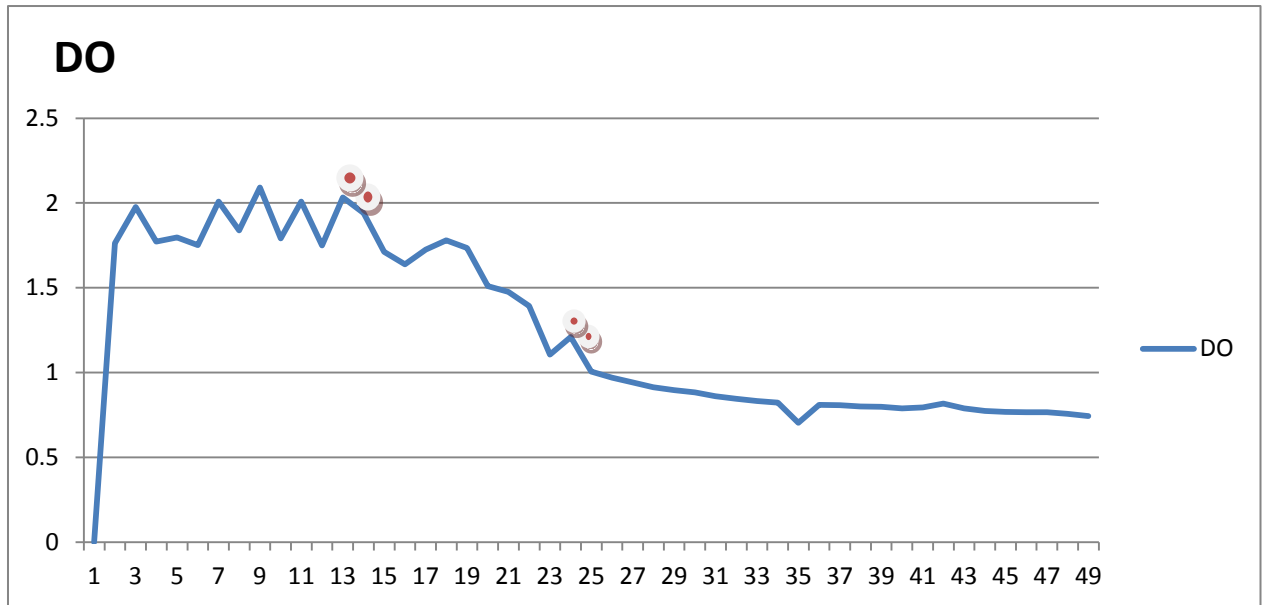
Tubes	DO	TUBES	DO	TUBES	DO	TUBES	DO	TUBES	DO
<b>1</b>	0.367	<b>12</b>	1.750	<b>23</b>	1.105	<b>34</b>	0.823	<b>45</b>	0.768
<b>2</b>	1.762	<b>13</b>	2.033	<b>24</b>	1.209	<b>35</b>	0.703	<b>46</b>	0.765
<b>3</b>	1.976	<b>14</b>	1.940	<b>25</b>	1.006	<b>36</b>	0.809	<b>47</b>	0.766
<b>4</b>	1.773	<b>15</b>	1.711	<b>26</b>	0.970	<b>37</b>	0.808	<b>48</b>	0.757
<b>5</b>	1.797	<b>16</b>	1.638	<b>27</b>	0.941	<b>38</b>	0.800	<b>49</b>	0.743
<b>6</b>	1.752	<b>17</b>	1.725	<b>28</b>	0.913	<b>39</b>	0.798		
<b>7</b>	2.008	<b>18</b>	1.779	<b>29</b>	0.897	<b>40</b>	0.788		
<b>8</b>	1.838	<b>19</b>	1.735	<b>30</b>	0.883	<b>41</b>	0.794		
<b>9</b>	2.092	<b>20</b>	1.509	<b>31</b>	0.860	<b>42</b>	0.816		
<b>10</b>	1.792	<b>21</b>	1.476	<b>32</b>	0.846	<b>43</b>	0.788		
<b>11</b>	2.009	<b>22</b>	1.393	<b>33</b>	0.831	<b>44</b>	0.774		

**Eluant :** PBS pH 7,4

**Absorbance** à 280nm

**Volume de fraction :** 2 ml

A l'aide de tableau précédent on a tracé la courbe représentant le profil d'élution ; l'absorbance a 280nm en fonction du volume d'élution :





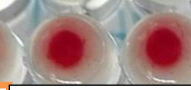


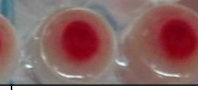

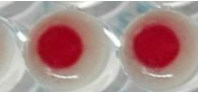

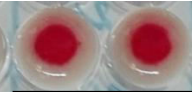




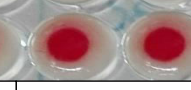







**Figure 13 :** Courbe représentant le profil d’élution de l’absorbance en fonction des tubes des différentes fractions protéiques.

**Tableau 17 :** représentation d’agglutination des fractions

F1	F2	F3	F4	F5	F6
-	-	-	-	-	-

F7	F8	F9	F10	F11	F12
-	-	-	-	-	-

F13	F14	F15	F16	F17	F18
					
+	+	-	-	-	-
F19	F20	F21	F22	F23	F24
					
-	-	-	-	+	+
F25	F33	F35	F36	F37	F40
					
-	-	-	-	-	-
F41	F42	F47	témoin négatif		
					
-	-	-	-		

La filtration du mélange des précipitatas sur colonne de sephadex G25 et la lecture à 280nm, la courbe a montré 9 pics (Figure00) ; Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces neuf tubes, un teste d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin. Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence de lectines dans 4 tubes (correspondant aux fractions **13**, **14**, **23** et **24**) avec une très forte hémagglutination , les autres 5 tubes correspondants a d'autres protéines ;C'est résultats diffèrent de celle de *Pterocliadiella capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 75 (Necib *et al.*, 2015), Par la suite les quatres tubes ont été mélangés et lyophilisés pour être utilisés dans l'électrophorèse

### 9- Electrophorèse SDS-PAGE :

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant nous a donné le profil électrophorétique suivant :

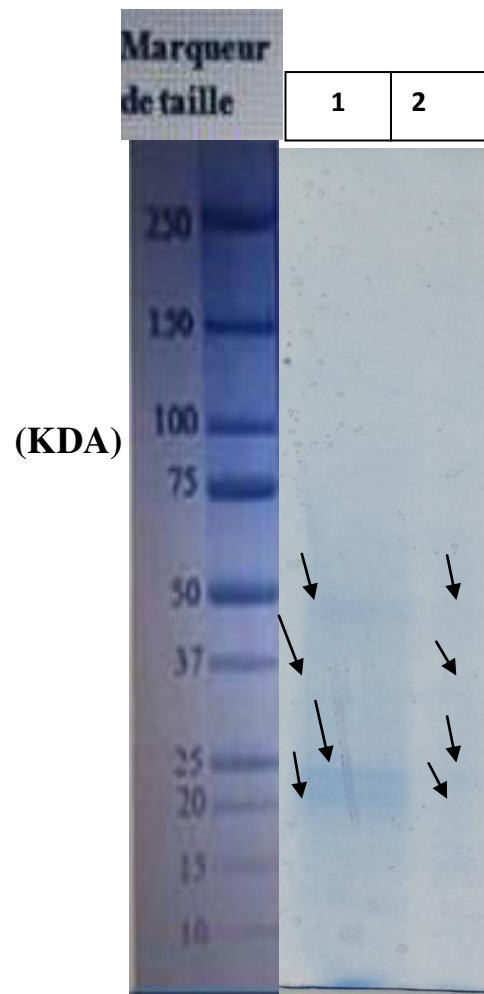


Figure 14 : profil électrophorétique des différentes fractions.

{ 1 : lyophilisat  
2: Extrait brut

La lecture de cet électro-phorégramme a pour but de relever la mobilité des bandes qui sont apparues en estimant les distances parcourues par chacune d'elles dans le gel de séparation, ceci permet d'évaluer la pureté et la masse moléculaire de chaque protéine en comparant avec la migration électrophorétique et la masse moléculaire d'un standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire connu (Precision Plus, protéine non colorée, Biorad).

Notre échantillons lyophilisat et extrait brut présentent respectivement 4 bandes dans des zones dont le poids moléculaire est proche de 23 KDa, 25 KDa , 35 KDa et 50 KDA .

Généralement la SDS-PAGE est utilisée pour séparer les protéines dénaturées afin de déterminer leurs poids moléculaires. Comme le SDS-PAGE n'est pas applicable directement pour les glycoprotéines, ces derniers se comportent anormalement lorsqu'on les compare directement avec les protéines standards, donc leurs mobilités seront faussées par la présence d'une quantité assez élevée d'hydrates de carbone (**Segrest and Jackson, 1972**).

La lectine du champignon *Chlorophyllum molybdites* purifiée a donné une seule bande avec une masse apparente de 16 kDa sur SDS-PAGE indépendamment de la présence ou de l'absence du 2-mercaptoéthanol (**Yuka Kobayashi et al.,2004**).

La lectine contenue dans les feuilles appartenant à une plante verte, *Ocimum Sanctum* purifiée a donné lieu à une seule bande de 66 KDa suggérant la pureté de la préparation. Des rapports antérieurs ont mis en évidence sur ces mêmes lectines sont des glycoprotéines constituées de sous-unités chacune ayant une masse moléculaire comprise entre 25 à 35KDa, réunies sous forme de dimères ou de tétramères et existant comme plusieurs isoformes partageant des



similarités dans les propriétés biochimiques. Cela suggère que l'*Ocimum Sanctum* purifié pourrait être une glycoprotéine dimérique avec des sous unités identiques de 33KDa (Praveen Kumar Vemuri et al.,2015).

## 10. Etude biologique :

### ➤ Analyse statistique :

**Tableau 18 : inhibition de l'œdème chez les différents lots de rats, en d'un prétraitement, par voie (ip), par l'extrait brut et de molécule de référence (diclofénac) et un lot témoin (formaldéhyde).**

Analyse de variance: un facteur						
RAPPORT DÉTAILLÉ						
Groupes	bre d'échanti	Somme	Moyenne	Variance		
Ligne 1	5	5	1	0		
Ligne 2	5	12,7	2,54	0,003		
Ligne 3	5	13,4	2,68	0,057		
Ligne 4	5	14,7	2,94	0,038		
Ligne 5	5	11,4	2,28	0,092		
Ligne 6	5	11,2	2,24	0,008		
Ligne 7	5	10,8	2,16	0,053		
Ligne 8	5	7	1,4	0,025		
Ligne 9	5	9,2	1,84	0,043		
Ligne 10	5	9,2	1,84	0,063		
Ligne 11	5	8,9	1,78	0,127		
ANALYSE DE VARIANCE						
ce des variat	mmme des car	egré de libertyenne des ca	F	Probabilité	ur critique pour F	
Entre Groupe	16,0712727	10	1,60712727	34,7316306	1,2514E-17	2,053901
A l'intérieur	2,036	44	0,04627273			
Total	18,1072727	54				

Toutes les données étaient normalement distribuées . Des comparaisons multiples dans des groupes ont été exécutées par des mesures répétées ANOVA .

Résultats :

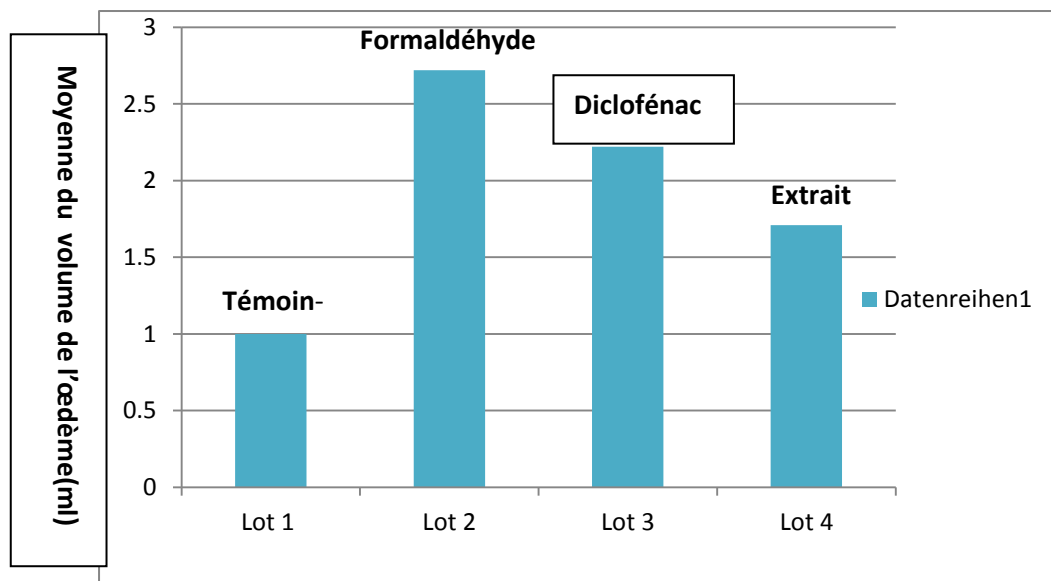
**Criblage de l'activité anti-inflammatoire :**

- Les résultats obtenus et affichés dans le (**tableau 18**) et (**la figure 15**) montrent qu'il y a une différence dans les moyennes du volume de l'œdème entre les groupes .
- L'analyse statistique de notre extrait de lectines sur l'activité anti-inflammatoire montre une forte inhibition du volume de l'œdème chez le lot référence et le lot essai est très hautement significative quand elle est comparée avec le lot témoin( +) .
- ❖ L'étude de l'activité anti-inflammatoire de notre extrait brut est réalisée par la mesure du volume de l'œdème induit par le formaldéhyde chez trois lots de rats ( témoin, essai et référence ) en présence et en absence d'un traitement anti-inflammatoire . les résultats sont représentés sous forme d'un histogramme mettant en valeur l'évolution du volume de l'œdème en fonction du temps . (**figure 15**) .

L'injection de **100 µl** de formaldéhyde à 2 % , au niveau de la patte postérieure du rat, provoque une inflammation , L'œdème augmente progressivement et atteint une intensité maximale au bout de 120 minutes ( la moyenne de volume de l'œdème des rats( **lot témoins +**) atteint les 2,7ml ) (**figure 15**) .

Administré préventivement , l'effet de la molécule de référence (**diclofénac**) se traduit par une réduction de l'œdème . l'effet inhibiteur du diclofénac se manifeste dès la première heure qui suit l'injection de formaldéhydes ; l'inhibition est remarquée durant deux heures (120 min ) avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 11,2 % (**figure 15**) .

Le prétraitement des rats par l'extrait brut entraîne un changement de l'évolution du volume de l'œdème qui a induit une forte inhibition de l'inflammation durant les 3 heures avec un pourcentage d'inhibition 27,2% , (le volume de l'œdème est de 1,7 ml ) (**figure 15**) .



**Figure 15 : Effet anti-inflammatoire d'un extrait de lectine après l'injection de formaldéhyde chez les rats**

L'analyse de ces résultats montre que notre extrait brut du gland de chêne-liège a montré un effet anti-inflammatoire qui a induit une forte inhibition de l'inflammation à la première heure

## **Conclusion :**

Nous avons extrait une substance à partir du gland du chêne-liège, cette molécule a une activité agglutinante sur les hématies, et que nous appelons lectine. c'est à partir de là que nous avons poussé nos recherches en effectuant plusieurs autres tests biologiques.

Nous avons démontré que ces lectines avaient une affinité avec des saccharides dont la caseine et le mannose.

La caséine qui est une glycoprotéine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines du gland.

Les lectines des graines du gland du chêne sont thermorésistantes jusqu'à la température 90 °C ; et ils sont différemment stables dans des pH neutre, alcalin et acide.

L'extrait brut des graines du gland du chêne a subi une précipitation graduelle par le sulfate d'ammonium à froid ; dans le but de purifier et concentrer la lectine ; les fractions précipitées montrent une faible activité agglutinante à toutes les saturations utilisées « 30%.50% .70%.90% »

La purification partielle par chromatographie sur colonne gel séphadex G25 de l'extrait brut donne 4 pics d'activité ainsi que 5 autres pics correspondants à d'autres protéines.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a permis d'estimer la pureté de notre lectine,

L'étude biologique sur 4 lots des rats a montré que notre extrait brut des graines du gland du chêne-liège a un effet anti-inflammatoire.

### ❖ Perspectives :

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Ce travail peut être la première étape d'une naissance des nouvelles lectines. Les résultats obtenus avec notre plante , encourageant la poursuivre des études par :

- Des tests de l'activité antivirale, l'activité anticancéreuse et l'activité immunomodulatrices.
- La purification des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC.
- La détermination des poids moléculaire des lectines par électrophorèse et leur séquençage.

### References

- ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A.** The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461.
- Ayméric J-L, Lefranc G. (2009).** Immunologie Humaine. De Boeck & Laccier S.A. Paris.24.
- ARAGAO. K. S.** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France, **2009**. Pp:17-27.
- ARAGAO. K. S.** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France, **2009**. Pp:17-27.
- ANDREW. S. A., RANDY. C. F., XIULI. D., YAU. S. C., WENLIANG. P., TZI. B. N.** Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**. 172: 672–686.
- ALENCAR. N. M., CAVALCANTE. C. F., VASCONCELOS. M. P., LEITE. K. B., ARAGAO. K. S., ASSREUY. A. M., NOGUEIRA. N. A., CAVADA. B. S. VALE. M. R.** Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*, **2005**. 57: 919-922.
- Budu, C. V. (1988)**, isolation of two lectins from fir (*Abies alba* mill) bark tissue on immobilized peroxidase and some of their properties. Preliminary study. *Rev. roumBiochim.*, 25 (1) :3-7.
- Boyd,W.C. and Shapleigh ,E (1954).**Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) *Science* ,119,419.
- Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954).** "Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). " *Science*, Vol. 119. (3091): 419.
- Barcate, A., Derdouri, R. (2016).** Etude de l'activité antioxydante in vitro et les propriétés immunitaires des lectines extraites des plantes d'origine Algérien. *Biochimie Moléculaire et santé*. Université des Frères Mentouri Constantine. Algérie. Pp : 1-18.
- Barcate, A., Derdouri, R. (2016).** Etude de l'activité antioxydante in vitro et les propriétés immunitaires des lectines extraites des plantes d'origine Algérien. *Biochimie Moléculaire et*

## Références et bibliographies

---

santé. Université des Frères Mentouri Constantine. Algerie. Pp : 1-18.

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

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

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

**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.

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

**Doumbia, M. (2004)**. Etudes de l'activité hématagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne. Faculté de Médecine de Pharmacie et Odontostomatologie. Mali. Pp : 34-41.

**DAM. T. K., BREWER. C. F.** Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev*, **2002**. 102: 387-429.

**De Hoff PL, Brill LM, Hirsch AM. (2009)** .Plant lectins : the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet.*

*Genomics* 282 , 1-5.

**DRICKAMER. K.** C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **1999**. 9: 585-590.

**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.

**Esmail, A. (2016)**. " Medical importance of Cupressus sempervirens". *International Organization of Scientific Research Journal Of Pharmacy*, Vol. 6. Pp. 66-76.

**GIANLUCA. C.** Etude structure-fonction des glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Biomolécules. Université de Joseph-Fourier - Grenoble I. France, **2006**. Pp: 15-39.

## Références et bibliographies

---

-Goldstein,IJ,Hughes.R.C.,Monsigny,M.,Osawa,T.and Sharon,N. What should be called a lectin?  
Nature 285 (1980) 66

**Gianluca Cioci** ;Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques.. Biomolécules. Université Joseph-Fourier -Grenoble I, 2006. French. <tel-00081084>

**GIANLUCA. C.** Etude structure-fonction des glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Biomolécules. Université de Joseph-Fourier - Grenoble I. France, **2006**. Pp: 15-39.

**GOLDSTEIN. I. J., HAYES.C.E.** the lectincarbogydrat binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohdr. Chem. Biochem*, **1978**. 35: 127-334.

**GOLDSTEIN. I. J., PORETZ. R. D.** isolation, physicochemical, characterization and carbhydat-binding spicificity of lectins in LIENER. I. E., SHARON. N., GOLDSTEIN. I. J. The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, Orlando, **1986**. 35-229.

**Gianluca, C. (2006)**. Etude structure-fonction de glycoconjuges et de lectines bactériennes et fongiques. Biochimie. Université Joseph-Fourier. France. Pp : 15-43.

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

**Goldstein I J , Hughes R C , Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980)**. What should be called a lectin? Nature.285, 66.

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

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

**Houles, C. (2001)**. Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes a la jacline. L'institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp : 11-35.

**HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S.** lectins : proteins with diverse application. *J. Appl. Pharm Sci*, **2013**. 31:93-103.

**Hirabayashi,J (2004)** Lectin-based structural glycomics:glycoproteomics and glycan Profiling

**Higuichi M., Fukumoto, y. And Iwai, K. (1988)**.Appearence of lectin in winged bean pods during seed development after flowering. *J. Agric. Food Chem.* 36 (3) : 534-53.  
.Glycoconj.J.,21,35-40.

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



## Références et bibliographies

---

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

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

**Kokourek, J. and Horejsi, V. (1981).** Defining a lectin. *Nature*, 290, 188.

**Kumar, K.K., Chandra, K.L.P., Sumanthi, J., Reddy, G.S., Shekar, P.C., Reddy, B.V.R. (2012).** "Biological role of lectins". *Journal of Orofacial Sciences*, Vol.4. Pp. 20-25

**KAWAMURA. T., OGAWA. Y., AOKI. R., SHIMADA. S.** Innate and intrinsic antiviral immunity

in skin. *J. Dermatol. Sci*, **2014**. 75 : 159–166.

**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. Belgrade* 62(4), 1027-1034.

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

**Koshte, V.L., Vandijk, W., Marleen, E.T., Vander, S., Rob, C. (1990).** "Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana)". *Biochemical journal*. Vol.272. Pp : 721-726.

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

**Lis ,H. and Sharon ,N.(1998)** Lectins carbohydrate-specific proteins that mediate cellular.

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

**Laemmli D. K. and Favre M. (1973).** Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*. 80, 575-599.

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

**Lenka, S., Imberty, A., Jaroslave, K. (2006).** Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. Université de Grenoble I. France. Pp : 56-58.

**MUKHERJEE. S., ZHENG. H., DEREBE. M. G., CALLENBERG. K. M., PARTCH. C.L.,**

## Références et bibliographies

---

- LEE. J. Y., KIM. J. Y., LEE. Y. G., BYEON. S. E., KIM. B. H., RHEE. M. H., CHO. J. Y.** In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **2007**. 30(11): 2043-2051
- LIS. H., SHARON. N.** Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev*, **1998**. 98: 637-674.
- LAM. S. K., NG. T. B.** Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, **2010**. 17: 457-462.
- LEFFLER. H., CARLSSON. S., HEDLUND. M., QIAN. Y., POIRIER. F.** Introduction to galectins. *Glycoconj. J*, **2004**. 19: 433-440.
- MURDOCK. L. L., SHADE. R. E.** Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food. Chem*, **2002**. 50 (22): 6605-661.
- MACEDO. M. R. L., OLIVEIRA. C. F. R., OLIVEIRA. C. T.** Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules*, **2015**. 20: 2014-2033.
- Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2014).** Immunomodulatory activity of lectin extracted from THE RED MARINE ALGA PTEROCLADIELLA CAPILLACEA .Volume 4. Issue 1, 1693-1706.
- Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2015).** comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Rutagraveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1720-1733.
- NACHBAR. M.S., OPPENHEIM. J. D.** Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1980**. 33: 2238-2345.
- Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008)** Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 1579-1591.
- PEUMANS. W. J., VAN DAMME. E. J.** lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, **1995**. 109:347-352.

## Références et bibliographies

---

- Praveen Kumar Vemuri 1, Bhavana Talluri, Ananya Sharma, Geethika Akkala and Vijaya Lakshmi Bodiga (2015).** Isolation and Characterization of a Lactose-Binding Lectin from *Ocimum sanctum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, ; V. 5 (10) : 113-117.
- Poiroux, G.M. (2011).** Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et Biochimie*. Université Toulouse. France. Pp : 35-45.
- QIU. Y., XI. J., DU. L., ROJE. S., POOVAIAH. B. W.** A dual regulatory role of arabidopsis calreticulin-2 in plant innate immunity. *Plant J*, **2012**. 69: 489–500.
- Rostislav, A., Alexender, L., Volodymer, A. (2016).** "Lectin purification from carp roe (*Cyprinus carpio* L.), investigation of its carbohydrate specificity and application in histochemistry". Department of Histology and Embryology. *Romania journal of Morphology and Embryology*, Vol.75. Pp : 985–994.
- RENATA. O. D., LEANDRO. S. M., LUDOVICO. M., OCTAVIO. L. F.** Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. *Molecules*, **2015**. 20: 519-541.
- RYDZ. N., SWYSTUN. L. L., NOTLEY. C., PATERSON. A. D., RICHES. J. J., SPONAGLE. K., BOONYAWAT. B., MONTGOMERY. R. R., JAMES. P. D., LILLICRAP. D.** 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*, **2013**. 121: 5228–5237.
- REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOYON. S. H.** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *The Journal of Phytopharmacology*, **2014**. 3(1): 44-51.
- RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G.** Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platyptero dium elegans vogel*. *Biologie Structurale et Nanobiologie*. France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Ceará, **2011**. p: 11.
- 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., GABIUS. H. J.** Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. *Glycoconj. J*, **2001**. 18: 589-613.
- pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, **2014**. 505: 103–107.
- . D., PROPHESTER. D. C., JIANG. Q. X.** Antibacterial membrane attack by a **ROLLINS**
- Raquel, L., Benevides, R.G. (2011).** Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platyptero dium elegans vogel*. . *Biologie Structurale et Nanobiologie*. Université de Grenoble et Universidade Federal do Ceará. France. Pp : 11-20.

## Références et bibliographies

---

- RENKONEN K. O.** Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, **1948**. 26: 66.
- Rüdiger, H. (1993)** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, pp.31-46.
- Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014)**. "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.
- Senjam, S. S., Hexiang, W., Yau S. C., Wenliang, P., Xiuli D., Cui M., Ouafae, A., Tzi B.,(2015)**. Lectins from Edible Mushrooms. *Molucules*, Vol.20.Pp : 446-469.
- Sharon,N. (2009)**. "lectines". Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. In: *Encyclopedia of Life Sciences* ,DOI: 10.1002/9780470015902.a0000708.pub2.
- Sharon, N., Lis, H. (2004)**." History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules". *Glycobiology*, Vol. 14. Pp. 53-62.
- Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936)**. "Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A". *Bacteriol*,Vol. 32. Pp. 227-237.
- SUTAPA. B. M., GOPA. R. P.** exploring plant lectines in diagnostic. Pophylaxis and therapie. *Journal of medicinal plants research*, **2013**. 7(47): 3444-3451.
- SHARON, N., and HALIMA, LIS. (2003)** Lectins. Kluwer Academic Publishers
- Sharon, N., and Halina, Lis. (2003)** Lectins. Kluwer Academic Publishers
- SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUEBARREIRA. M. C.** The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, **2013**. 30:641-657.
- Sharon N. (1983)**. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34. 213-291.
- segrest JP and jackson RL.(1972)**. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Pp. 54-62. In : methods in enzymology. V 28. Part B. V. Ginsburg (ed). New Yorck: Academic Press, Inc. 1057p
- SHARON. N.** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol*, **1996**. 408: 1-8.

## Références et bibliographies

---

- SHE. Q. B., NG. T. B., LIU. W. K.** A 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*, **1998**. 247: 106-111.
- SZE. S. C. W., HO. J. C. K., LIU. W. K.** *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *J. Cell. Biochem.y*, **2004**. 92: 1193-1202.
- SOMERS. W.S., TANG. J., SHAW. G. D., CAMPHAUSEN. R. T.** Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe<sup>x</sup> and PSGL-1. *Cell*, **2000**. 103: 467-479.
- Subramaniya, B.R., Malliga, R.M., Nirmal, K.K., Sivasitambaram, N.D. (2011).** " Isolation and Partial Characterisation of a Novel Lectin from *Aegle marmelos* Fruit and Its Effect on Adherence and Invasion of *Shigellae* to HT29 Cells". *Plos one*.
- TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A., ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A.** Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**. 106: 15633- 15638.
- TOPFER- PETERSEN. E., ROMERO. E., VARELA. P. F., EKHLASI-HUNDRIESER. M., DOSTALOVA. Z., SANZ. L., CALVETE. J. J.** Spermadhesins: a new protein family. *Facts, hypotheses and perspectives. Andrologia*, **1998**. 30: 217-224
- TANNE. A., NEYROLLES. O.** C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence*, **2010**. 1: 285–290.
- Van Liempt, E., et al. (2006)** Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucosecontaining glycans. *FEBS Lett*, 580, 6123-6131.
- VAN DAMME. E. J., PEUMANS. W. J., BARRE A., ROUGÉ. P.** Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **1998**. 17(6): 575-692.
- WILEY. D. C., SKEHEL. J. J.** The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza. *Annu. Rev. Biochem*, **1987**. 56: 365-394.
- WEIS. W. I., BRUNGER. A. T., SKEHEL. J. J., WILEY. D. C.** Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, **1990**. 212: 737-761.

## Références et bibliographies

---

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

XU. S., WANG. L., WANG. X. W., ZHAO. Y. R., BI. W. J., ZHAO. X. F., WANG. J. X. L-type lectin from the kuruma shrimp *marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol*, **2014**. 44: 397–405.

YukaKobayashi, KoujiKobayashi,KanakoUmehara, HideoDohra,TakeomiMurata, Taic hiUsui and HirokazuKawagishi (2004).Purification, Characterization, and Sugar Binding Specificity of an *N*-Glycolylneuraminic Acid-specific Lectin from the Mushroom *Chlorophyllummolybdites*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.,

Ynalavez, R.A., Fuentes, L.M., Sanchez, C.V. (2011). " Comparison and temperature study of lectin activities in texas live Oak ( *Quercus fusiformis*) crude extracts". *journal of Plant sciences*.Vol.6.Pp :124-134.

Zitouni, A. (2015). Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de *Terfèzia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara).Thèse de doctorat. Université Frère Mentouri Constantine. Algérie.Pp : 21-38.

-ZHANG. H., PEATMAN. E., LIU. H., FENG. T., CHEN. L., LIU. Z. 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.

# **Annexe**

## Annexe

---

### Annexe 1 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1M ; pH = 7,4).

Pour 1000ml de PBS

Réactif	Concentration	Quantité
Phosphate di-sodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10 mM	1,44g
Phosphate de mon potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 mM	0,24g
Chlorure de Sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de Potassium (KCl)	2,7 mM	0,2g
Eau distillée		1L

### Annexe 2 : Préparation de NaCl à 0.9%

Chlorure de Sodium (NaCl)	Eau distillée
0,9g	100ml

### Annexe 3 : Préparation des monosaccharides

Sucre	NaCl
0,1g	1ml



## Annexe

---

### Annexe 4 : Solutions préparées pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

- Solutions mère d'acrylamide à 40% :

Acrylamide	Eau distillée
40g	100ml

- Solution mère de Bisacrylamide à 2% :

Bisacrylamide	Eau distillée
2g	100ml

- Solution stock de SDS à 10% :

Sodium dodécylsulfate (SDS)	Eau distillée
10g	100ml

- Solution d'Ammonium persulfate APS à 1% :

## Annexe

---

<b>APS</b>	<b>Eau distillée</b>
0,1g	10ml

- **Tampon Tris HCl pH = 8,8 :**

<b>Tris</b>	<b>Eau distillée</b>
60,57g	400ml
Ajuster le pH à 8,8 et compléter le volume jusqu'à 500ml avec de l'eau distillée	

- **Tampon Tris HCl pH = 6,8 :**

<b>Tris</b>	<b>Eau distillée</b>
30,285g	200ml
Ajuster le pH à 6,8 et compléter le volume jusqu'à 250ml avec de l'eau distillée	

- **Tampon d'électrophorèse :**

<b>Réactif</b>	<b>Quantité</b>
Glycine	70,55g
Tris	15g
SDS	5g

## Annexe

---

Eau distillée	5000ml
---------------	--------

**Annexe 5 : Préparation du gel de séparation (T : 12,52% ; C : 0,97%)**

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2,4
Eau ditillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	1
TEMED	0,02

**Annexe 6 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)**

## Annexe

---

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2,4
Eau ditillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	1
TEMED	0,02

### Annexe 7 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1
Bisacrylamide 2%	0,3
Eau ditillée	10,2
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14

## Annexe

---

APS 1%	0,7
TEMED	0,014

**Annexe 8** : Préparation d'une solution de Coloration pour le gel d'électrophorèse

<b>TCA 60%</b>	<b>Solution mère de bleu de Coomassie R250</b>	<b>Eau distillée</b>
50ml	12,5ml	250ml

○ **Solution mère de Bleu de coomassie R250 :**

<b>Bleu de Coomassie R250</b>	<b>Ethanol 95°</b>
5g	500ml

L'éthanol est soumis à une agitation, le bleu de coomassie est ensuite ajouté, afin qu'il ne prenne pas de masse, le laisser sous agitation au minimum deux heures, la solution est ensuite filtrée

## **Annexe**

---

**Annexe 9** : Composition de l'alimentation des souris.

<b>Matière alimentaire</b>	<b>Quantité en g/kg d'aliment</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Amidon(Mais)</b>	<b>420</b>	<b>42</b>
<b>Saccharose</b>	<b>210</b>	<b>21</b>
<b>Huile</b>	<b>20</b>	<b>2</b>
<b>Soja</b>	<b>260</b>	<b>26</b>
<b>Son</b>	<b>60</b>	<b>6</b>
<b>CMV</b>	<b>30</b>	<b>3</b>

**Purification et caractérisation partielle et effet anti-inflammatoire des lectines du gland de chêne-liège (*Quercus Suber L*)**

Mémoire de fin d'étude de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie de la nutrition et de santé

**Résumé :**

Les lectines sont des substances de nature protéique extraits de plantes , d'animaux ou d'insectes. Ces substances sont capables de se fixer de façon spécifique et réversible à des résidus osidiques des membranes cellulaires sans montrer d'activité enzymatique .

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les graines de chêne- liège (*Quercus suber L*) pour cela ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante suivi par un test de la limite de cette dernière , rendre compte de leur ph qui été stable dans la gamme du ph 2 à 12 , leur thermo-stabilité de 40°C jusqu'à 90°C qui n'à été pas suffisante pour leur inactivation aussi un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents sucres qui a montré qui' il y'a une spécifié seulement pour la caséine , le mannose .

- La purification de nos protéines est réalisée par chromatographie sur gel de Séphadex G25, puis une lyophilisation a été réalisé aux 4 fractions obtenus de cette dernière qui ont une activité hémagglutinante.. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

l'étude des propriétés anti-inflammatoires sur un lot de 20 souris traitées avec (formaldéhyde, diclofénac et notre extrait brut et un lot témoin) et cela par deux types de traitement

( injection sous cutané / l'aponévrose de la plante du pied) . les résultats montrent que cet extrait inhibe l'œdème de la patte alors il possède un pouvoir anti-inflammatoire .

**Mots clés :** lectines; activité agglutinante; inhibition; purification; effet anti-inflammatoire.**Laboratoire de recherche :** BIOCHIMIE.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Zitouni N ( Pr- UFM- Constantine ),**Rapporteur :** Hafi A ( MAA- UFM- Constantine ) ,**Examineur :** Necib Y ( Pr- UFM Constantine ),**Date de soutenance :** 01/07/2018