



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث 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 عاوم الطبيعة و الحياة

قسم: قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département : 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 appliquée

Intitulé:

Purification partielle, caractérisation et effet anti-inflammatoire des lectines extraites à partir du champignon (*Lepista seava*) et du gland du chêne vert (*Quercus suber*).

Présenté et soutenu par :

- BOUTELDJA HADJER
- YNINEB LYNA ELBETOUL

Le 17.07.2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr Necib .Y

Professeur - UFM Constantine1

Rapporteur : Mr Zitouni.A

Maitre de conférence B- UFM Constantine 1

Examineur : Mr Nouadri .T

Maitre de conférences A - UFM Constantine 1

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie le bon Dieu, tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné du courage, de la patience pour pouvoir réaliser ce modeste travail, et de la volonté pour aller jusqu'au bout de mes rêves et de les réaliser, et sans la force qu'il me procure à chaque moment de faiblesse, je ne serais jamais arrivée là. J'aimerais transmettre ma haute considération et mes plus chaleureux remerciements à Monsieur A.Zitouni, notre encadreur qui a toujours répondu présent pour nous aider, pour sa patience et ses encouragements, sans qui notre travail n'aurait jamais vu le jour. On ne le remerciera jamais assez...

J'aimerais également remercier les membres du jury, le Professeur Necib Youcef, et Monsieur Nouadri Tahar pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à notre recherche en acceptant de présider et d'examiner notre travail.

Mes remerciements s'étendent également au Docteur Inès Bellil qui nous a dirigé et permis de réaliser au sein de son laboratoire une technique indispensable à notre recherche, sans oublier Monsieur Belbekri Nadir pour sa générosité et son aide.

Un merci pour le futur Docteur Toumi Seddik Eddine pour son aide et ses conseils.

Mes vifs remerciements vont à la Doctorante Nesrine, pour sa générosité et sa disponibilité.

Mes remerciements vont également à :

A ma très chère maman Naili Rachida, cette douce créature aussi dévouée et attentionnée que toi. Je ne cesserais de te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout l'amour que tu me procures et appris, pour ta générosité, pour ton soutien, et pour m'avoir toujours poussé vers l'avant. Merci pour être tout simplement ma mamounette d'amour. Je t'aime plus que tout.

Quant à toi tendre papa, l'homme de ma vie, merci d'avoir toujours cru en moi et soutenu à chaque pas que je fasse. Mon ange gardien, je t'aime.

Chères Nona et Mey mes douces sœurs, ma source de bonheur, que serais je sans vous !! Vous êtes mes âmes sœurs, mes chéries d'amour et tout ce qu'il y'a de beau dans ma vie. Merci d'avoir été toujours à mes cotés dans le meilleur comme dans le pire. Je vous adore.

Mon doux et unique frère Borhen, et sa femme Amina, merci pour tout ce que vous faites pour moi.

Rafik, mon très cher beau frère, un deuxième frère pour moi, merci pour tout.

A mon très cher Abdelmouaiz, my partner in crime, mon bras droit et mon confident, pour sa présence à mes cotés, son soutien, et sa douceur inégalable, merci d'être là pour moi, merci de supporter mes sauts d'humeur.

Sans oublier les petits bébés de la famille Yanou et Doudou, mes bouts de choux.

Une pensée particulière à mon cher oncle défunt Naili Abdelkarim qui est toujours présent dans mon cœur.

A ma meilleure amie Khaoula, ma sœur de cœur, pour son sincère dévouement à résoudre certains de mes soucis et pour son grand tendre cœur.

A ma collègue Hadjer, merci pour tout ces souvenirs et aventures qu'on a pu vivre ensemble cette année, pour tout les fous rires qu'on s'est partagé. Je te souhaite une vie pleine de succès et d'amour.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Lyna

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. En second lieu je tiens à remercier notre encadreur monsieur Zitouni abd elbaki, pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions .

Un grand merci à ma mère hichour zahia et mon père stofa pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui m'a permis de réaliser les études que je voulais et par conséquent ce mémoire .Bref Merci d'être mes parents, de m'avoir donné des racines et des ailes, de m'avoir supporté et appuyer durant toutes ces années, de m'avoir inculqués de vraies valeurs et de m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui.

Mon unique sœur Khaoula, Je ne trouve pas toujours les mots pour te remercier de l'amour que tu m'as témoigné au cours des années,des paroles d'encouragement que tu as su prononcer et du soutien extraordinaire que tu m'as offert.

Je tiens à remercier également tout les membres de ma famille surtout mes oncles Yazid ,abd el-Kader et hamoudi ,mes tantes chafya nora , soumia ratiba et fadila, mes cousin Djamel eddin et son épouse INES ,hamza ,abd eldjilil, khaled et bilbel , Sara ,Anfel, Safa , Maroua et Amina. Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Un merci pour le futur Docteur Toumi Seddik Eddine pour son aide et ses conseils , ainsi que monsieur bahri pour ses conseils

Je tiens à remercier également la future Doctorante Nesrine, pour tout l'aide qu'elle nous a attribué, et tout les conseils et moral, merci de nous avoir soutenu jusqu'au bout

Hadjer.

Résumé

Les lectines sont dites agglutinines ou hémagglutinines. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaire, polyvalentes et sont d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale mais jamais immunitaire. Elles sont caractérisées par leur capacité de distinguer et de se fixer de façon réversible aux hydrates de carbone présentes sur les membranes externes des cellules ou se trouvant en solution ce qui va provoquer l'agglutination de diverses cellules ou l'hémagglutination dans le cas des hématies. Les champignons y compris les moisissures et les levures font partie d'une grande division d'organisme qui présente dans ces dernières années un intérêt de très grande importance dans plusieurs domaines biotechnologiques et médicaux. Notre but se concrétise par la caractérisation et la purification partielle des lectines extraites à partir du champignon dit pied violet « *Lepista seava* » et celles extraites du gland du chêne vert « *Quercus suber* » récoltés tout deux de la forêt de Djebel Ouahch bien connue de la ville de Constantine.

Ces lectines, après extraction ont révélé une activité hémagglutinante appréciable, avec un pH optimum pour le champignon pied violet proche de 7, et d'une zone de PH tampon allant de 2 à 7 pour le gland du chêne vert. Elles ont montré une thermo-stabilité à des températures élevées allant jusqu'à 100°C pour les deux échantillons. Aucune affinité envers les sucres et protéines utilisés, et aucune spécificité envers tous les groupes sanguins du système ABO n'ont été observées.

Leur profil électrophorétique réalisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), dans des conditions dénaturantes révéla l'existence de bandes protéiques dont les PM se situent dans un intervalle compris entre 15 et 90 KDa avec une légère différence pour une bande protéique de 3.5KDa.

De plus, la lectine extraite à partir du champignon « *Lepista seava* » a manifesté un effet anti-inflammatoire non négligeable.

Mots Clés : Lectines ; Extraction ; Agglutination ; Hémagglutination ; purification ; Effet anti-inflammatoire ; Œdème.

ملخص

تسمى اللاكتين agglutinins أو haemagglutinins هي بروتينات في كل مكان أو بروتين سكري ، متعدد التكافؤ وهي من أصل حيواني أو نباتي أو بكتيري أو فيروسي ولكنها ليست مناعة أبدًا. تتميز هذه الخلايا بقدرتها على التفريق والربط بشكل عكسي بالكربوهيدرات الموجودة على الأغشية الخارجية للخلايا أو في محلول والذي سيؤدي إلى تراص الخلايا المختلفة أو التراص الدموي في حالة خلايا الدم الحمراء. تشكل الفطريات ، بما في ذلك الفطريات والخمائر ، جزءًا من التقسيم الكبير للكائنات التي كانت في السنوات الأخيرة ذات أهمية كبيرة في العديد من مجالات التكنولوجيا الحيوية والطبية. يتمثل هدفنا في توصيف وتنقية جزئية من المحاضرات المستخرجة من ما يسمى الفطر البنفسجي "*Lepista seava*" وتلك المستخرجة من بلوط البلوط الأخضر "*Quercus suber*" اللذين يتم حصادهما من غابة جبل وحش المعروفة جيدًا بمدينة قسنطينة.

أظهرت هذه المحاضرات ، بعد الاستخراج ، نشاطًا ملموسًا للتخثر ، مع درجة الحموضة المثلى لفطريات القدم الأرجواني القريبة تتراوح من 2 إلى 7 و 7 لحشوات البلوط الأخضر. أظهروا ثبات حراري في درجات حرارة مرتفعة تصل إلى 100 درجة مئوية لكلا العينات. لم يلاحظ أي تقارب للسكريات والبروتينات المستخدمة ، ولا خصوصية لجميع مجموعات الدم

نفذ ملف التعريف الكهربائي الخاص بهم باستخدام الكهربائي بولي هلام الأكريلاميد في وجود SDS (SDS-PAGE) ، تحت ظروف تغيير طبيعة كشفت عن وجود عصابات البروتين مع PM في حدود 15 إلى 90 KDa مع اختلاف طفيف لفرقة البروتين من 3.5 KDa.

بالإضافة إلى ذلك، أظهر اللقاح المستخرج من الفطريات "*Lepista seava*" تأثيرًا مهمًا مضادًا للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: اللاكتين. استخلاص؛ التلصيق الدموي. تنقية؛ تأثير مضاد للالتهابات ، وذمة

Abstract

Abstract

Lectins are called agglutinins or haemagglutinins. They are ubiquitous proteins or glycoproteins, polyvalent and are of animal, vegetable, bacterial or viral origin but never immune. They are characterized by their ability to differentiate and reversibly bind to the carbohydrates present on the outer membranes of cells or in solution which will cause the agglutination of various cells or haemagglutination in the case of red blood cells. . Fungi, including molds and yeasts, are part of a large division of organisms that in recent years has been of great importance in several biotechnological and medical fields. Our aim is concretized by the characterization and the partial purification of the lectins extracted from the so-called violet fungus "Lepista seava" and those extracted from the acorn of the green oak "Quercus suber" both harvested from the forest of Jebel Ouahch well known to the city of Constantine.

These lectins, after extraction, showed appreciable haemagglutinating activity, with an optimum pH for the purple foot fungus close to 7, and a buffer PH area ranging from 2 to 7 for the green oak glans. They showed thermostability at elevated temperatures of up to 100 ° C for both samples. No affinity for the sugars and proteins used, and no specificity for all blood groups in the ABO system were observed.

Their electrophoretic profile using SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions revealed the existence of protein bands with PM in the range 15-90. KDa with a slight difference for a protein band of 3.5KDa.

In addition, the lectin extracted from the fungus "Lepista seava" showed a significant anti-inflammatory effect.

Key Words : Lectins; Extraction; Agglutination Haemagglutination; purification; Anti-inflammatory effect, edema.

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
I- Généralité sur les lectines	3
I-1 Définition	3
I-2 Historique	4
I-3 Structure des lectines	6
• I.3.1 Les lectines simples	6
• I.3.2 Les lectines en mosaïque	7
I.3.3 Les assemblages macromoléculaires.....	8
I.3.4 Structure tridimensionnelle	8
I-4 Spécificité et affinité des lectines	9
I-5 Site de liaison	10
I-6 Propriétés des lectine.....	11
• I-6-A Propriété biologique	11
• B- Propriété médicale	13
I-7 Rôle biologique des lectines	14
I-8 Utilisation et application des lectines.....	17
• A-Domaine biomédical	17
• B- Domaine agronomique	18
I-9 Classification des lectines	18
• I-9-1 Chez les végétaux	19
• I-9-2 Chez les animaux	22
• I-9-3 Les lectines des microorganismes	23
• I-9-4 Chez les champignons	24
I-10 Lectines les mieux connues	25
II- Système ABO	27
II-1 Définition.....	27
II-2 L'intérêt du système ABO	27
II-3 Les groupes sanguins	27
II-3-1 Définition	27
II-2-2 Lectines spécifiques des groupes sanguins.....	28
IV- Matériel et méthode	29
IV-1 Matériel.....	29
IV-1-2 Matériel végétal	29

Table des matières

IV-1-2 Matériel sanguin	30
IV-2 Méthode	31
IV-2-1 Extraction des lectines	31
IV-3 Dosage des protéines.....	33
IV-4 Test d'héماغglutination.....	33
▪ IV-4-1 Préparation des hématies à 3%	34
▪ IV-4-2 Lavage des hématies	34
▪ IV-4-3 Dilution des hématies.....	34
▪ IV-4-4 Technique d'héماغglutination	34
IV-5 Test de la limite d'héماغglutination.....	35
▪ IV-5-1 Technique du test de la limite d'héماغglutination	35
IV-7 Effet de la température sur l'héماغglutination	35
• IV-7-1 effet de la température sur la limite d'héماغglutination	35
IV-8 Effet du pH sur l'héماغglutination	36
IV-9 Test d'héماغglutination sur les érythrocytes humains du système ABO	36
• IV-9-2 technique.....	36
IV-6 Test d'inhibition de l'héماغglutination.....	36
▪ IV-6-1 technique du test d'inhibition d'héماغglutination	37
IV-7 Précipitation au sulfate d'ammonium.....	37
▪ IV-7-1 Technique de la précipitation au sulfate d'ammonium	37
▪ IV-7-2 Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium	38
IV-8Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	38
➤ IV-8-1 Principe.....	38
IV-8-2 Préparation de la colonne G25.....	39
➤ IV-8-3 Test d'héماغglutination après dessalage.....	39
IV-9 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	40
▪ IV-9-1 Technique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide	40
IV-10 Lyophilisation.....	41
IV-10-1 Technique	41
IV-11 Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon « <i>Lepistaseava</i> » chez les rats WISTAR	41
IV-11-1 Matériels biologique et condition d'élevage.....	42
IV-11-2 Induction de l'inflammation par le formaldéhyde.....	42
V- Résultats et discussion	47

Table des matières

V-1 Dosage des protéines	47
V-2 Teste d'héماغglutination.....	48
➤ V-2-1 Test d'héماغglutination réalisé après fractionnement des protéines	48
➤ V-2-2 Test de la limite d'héماغglutination	50
V-2-3 Test de l'effet de température sur l'héماغglutination.....	55
III-2-4 Effet du pH sur le test d'héماغglutination	60
III-2-5 Test d'héماغglutination sur le système ABO	62
V-3 Test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines	63
V-8 Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium	66
III-4-2 Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	68
V-9 Résultats de la lyophilisation.....	74
V-10 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	75
V-11 Etude des propriétés anti-inflammatoire du champignon « <i>Lepistaseava</i> » chez les rats <i>WISTAR</i>	78
VI- Conclusion	81
Références bibliographiques	93
Annexes.....	105

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de Concanavoline A de <i>canavaliaensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde	7
Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique	7
Figure 3 : Lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc.....	8
Figure 4 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb3chb)	8
Figure 5 : L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-IIL	11
Figure 6 : Inhibition des lectines par les sucres.....	11
Figure 7 : Mécanisme d'action des lectines.	12
Figure 8 : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire	16
Figure 9: Classification des lectines selon le nombre des chaînes polypeptidiques	21
Figure 10: Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl Lewis X (PDB 1G1T).....	22
Figure 11: (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH en complexe avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)	23
Figure 17 : Courbe représentant l'élution de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénéat C4 sur colonne de sephadex G25.	68
Figure 18: Courbe représentant l'élution de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénéat S4 sur colonne de sephadex G25.....	69
Figure 19 : Courbe représentant l'élution de précipité C85% obtenu à partir de.....	69
Figure 20: Courbe représentant l'élution de précipité C'50% obtenu à partir de l'homogénéat S'4 sur colonne de sephadex G25.	69
Figure 21 : Courbe représentant l'élution de précipité C'50% obtenu à partir de l'homogénéat C'4 sur colonne de sephadex G25.....	70
Figure 22: Courbe représentant l'élution de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénéat S'4 sur colonne de sephadex G25.	70
Figure 23: Courbe représentant l'élution de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénéat C'4 sur colonne de sephadex G25.....	70
Figure 24 : Courbe représentant l'élution de précipité S'85% obtenu à partir de l'homogénéat C'4 sur colonne de sephadex G25.....	71

Liste des figures

- Figure 25:** Profil électrophorétique de *Lepistaseava* dans des conditions dénaturantes 76
- Figure 26:** Profil électrophorétique de *Quercus suber* dans des conditions dénaturantes 77
- Figure 27:** Histogramme de l'évolution de volume de l'œdème en fonction du temps..... 79

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1: Historique et propriétés des lectines les plus connues.....	5
Tableau 2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines.....	9
Tableau 3 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines.....	10
Tableau 4 : Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent	14
Tableau 5 : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant.....	15
Tableau 6 : Classification structurale des lectines des plantes	21
Tableau 7 : Lectines des champignons connus	24
Tableau 8: lectines importantes.....	26
Tableau 9: Les groupes sanguins	28
Tableau 10: Exemples des lectines spécifiques des groupes sanguins.....	28
Tableau 11: Les quantités des échantillons et les volumes du PBS utilisés dans la macération.	31
Tableau 12: Nomenclature de fractions obtenues après la centrifugation.....	32
Tableau 13: Les fractions obtenues après la deuxième ultracentrifugation.....	32
Tableau 14: les sucres utilisés pour le test d'inhibition d'héماغglutination.	36
Tableau 15: Intervalle de fractionnement du gel séphadex G25.....	39
Tableau 16: la composition des lots et les volumes des substances injectées.	45
Tableau 17: Absorbance des protéines à 280nm et 260nm et leurs concentrations.	47
Tableau 18: résultats du test d'héماغglutination après première centrifugation.....	48
Tableau 19: Résultats du test d'héماغglutination après deuxième centrifugation	49
Tableau 20 : Test de la limite d'héماغglutination des fractions du champignon frais obtenues après les différentes centrifugations.....	50
Tableau 21 : Test de la limite d'héماغglutination des fractions du champignon sec obtenues après les différentes centrifugations	51
Tableau 22: Test de la limite d'héماغglutination des fractions du chêne obtenues après les différentes centrifugations.	52
Tableau 23: Absorbance des protéines des homogénats du Champignon fraisà 280nm et 260nm et leurs concentrations	53
Tableau 24: Absorbance des protéines des homogénats du Champignon sec à 280nm et 260nm et leurs concentrations.	53
Tableau 25 : Absorbance des protéines des homogénats du gland du chêne à 280nm et 260nm et leurs concentrations.	54
Tableau 26: Test de la limite d'héماغglutinationdes homogénats du champignon frais.	54

Liste des tableaux

Tableau 27 : Test de la limite d'héماغglutination des homogénats du Gland du chêne vert.	55
Tableau 28 : Test de la limite d'héماغglutination des homogénats du champignon sec.	55
Tableau 29 : L'effet de la température sur l'activité héماغglutinante de l'homogénat du champignon « <i>Lepistaseava</i> »	56
Tableau 30 : Effet de la température sur l'activité héماغglutinante de l'homogénat du	56
Tableau 31 : Effet de la température sur la limite de l'activité héماغglutinante de l'homogénat du champignon « <i>Lepista seava</i> ».	57
Tableau 32 : Effet de la température sur la limite de l'activité héماغglutinante de l'homogénat du gland du chêne vert « <i>Quercus suber</i> ».	59
Tableau 33 : Effet du pH sur l'héماغglutination des lectines extraites à partir du champignon pied violet « <i>Lepista seava</i> »	60
Tableau 34 : Effet du pH sur l'héماغglutination des lectines extraites à partir du gland du chêne vert « <i>Quercus suber</i> ».	60
Tableau 35 : Effet du pH sur la limite d'héماغglutination des lectines extraites à partir du champignon pied violet « <i>Lepista seava</i> »	61
Tableau 36 : Effet du pH sur la limite d'héماغglutination des lectines extraites à partir du gland du chêne vert « <i>Quercus suber</i> »	62
Tableau 37 : Test d'héماغglutination sur le système ABO.....	63
Tableau 38 : résultat du test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines pour l'échantillons champignon frais « <i>Lepista seava</i> »	64
Tableau 39 : résultat du test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines pour l'échantillon le gland du chêne vert « <i>Quercus suber</i> ».	65
Tableau 40 : Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium à partir du champignon	66
Tableau 41 : Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium à partir du gland du chêne.....	67
Tableau 42 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénat	72
Tableau 43 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C50% obtenu à partir de l'homogénat C4	72
Tableau 44 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C85% obtenu à partir de l'homogénat S4.	72
Tableau 45 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4.....	73
Tableau 46 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4.	73

Liste des tableaux

Tableau 47 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4.....	73
Tableau 48 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4.	73
Tableau 49 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4.....	74
Tableau 50 : Concentrations des fractions des deux échantillons soumis à l'électrophorèse	75
Tableau 51 : Variation du volume du pied des rats témoins et traités.....	78
Tableau 52 : Variation du volume de l'œdème chez les rats témoins et traités.	78
Tableau 53 : Résultats du dosage de la CRP chez les rats.....	80

Liste des photos

Liste des photos

Photo 01 : Rats <i>Wister</i> utilisés dans l'étude des propriétés anti-inflamatoire.....	49
Photo 02 : Injection intra péritonéal.....	50
Photo 03 : Injection dans l'aponévrose Plantaire du pied.....	50
Photo 04 : Mesure de l'œdème du pied du rat.....	52
Photo 05 : Prélèvement oculaire de l'œil du rat.....	53

Liste des abréviations

Liste des Abréviations

AAL : Aleuria aurantia

ABL : Agaricus bisporus

ACG : Agrocibe cylindracea

CGL2 : Coprineus cinerea

ConA : Concanavaline A lectin

CRD : Carbohydrates

CRP : Protéine C réactive.

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique.

Fuc : Fucose.

FVL : Flammulina velutipes.

Gal : Galactose.

GlcNAc : N-acétylglucosamine.

Glu : Glucose.

KDa : Kilo Dalton.

LSL : Laetiporus sulphureus.

Man : Mannose.

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique.

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns.

PBS : Phosphate buffer saline.

PVL : Psathyrella velutina.

Rip : Ribosom inactivating proteine.

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

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

XCL : Xerocomus chrysenteron.

Introduction

Introduction

Les lectines sont une classe de protéines ou de glycoprotéines qui ont la capacité de se fixer spécifiquement et de façon réversible à certains glucides et d'induire par la suite l'agglutination de diverses cellules. Elles jouent un rôle dans différents processus biologique, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (ex : lors des réponses immunitaires, et d'infections). (**Amit, 2016**).

elles possèdent plusieurs sites de liaison des saccharides. Cette structure polyvalente confère aux lectines la capacité d'agglomérer des cellules présentant sur leur surface externe les fractions saccharidiques adéquates (comme les hématies). Les lectines sont des molécules ubiquitaires, parce qu'elles sont présentes dans un large éventail d'organisme, chez les plantes, chez les animaux, chez les microorganismes (virus, bactéries), et chez les insectes. (**Goldstein, 1978; Pusztai et al. ,1983; Etzler, 1985 ; Kocourek, 1983 ; Liener et al. ,1986**).

L'activité hémagglutinante de ces protéines est inhibée par l'ajout de certains glucides lors de l'interaction, ce qui permet de déterminer leur spécificité. (**Van Damme et al, 1998**).

La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène. (**Kocourek and horejsi, 1981**). Les lectines sont, comme les immunoglobulines des substances présentes naturellement dans les organismes, par contre les anticorps, ne sont synthétisés que lorsqu'il y'a un stimulus, (**Nultsch, 1998**). Leurs capacités à reconnaître le soi du non-soi rend partie du système de l'immunité innée (**Yang et al. 2011**).

Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des lectines (**Ng, 2004**). Au cours de ces dernières années, l'intérêt montré pour les lectines de champignons est principalement entrainé par la découverte que es dernières ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (**She, 1998; Sze, 2004**). L'abondance de lectines dans les champignons est remarquable et un test d'agglutination réalisé sur plus de 400 spécimens a permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés (**Pemberton, 1994**). Leur abondance ainsi que leur facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées comme des outils dans plusieurs domaines de la recherche biologique. Tels que l'immunologie, recherche sur le cancer, biologie cellulaire et le génie génétique.

Introduction

❖ Objectif du travail

Notre étude consiste en une purification et caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon sec et frais « *Lepistaseava* » dont la bibliographie ne rapporte que des informations infimes, et du gland du chêne vert « *Quercus suber* ».

Le protocole expérimental et les méthodes utilisées sont les suivantes :

- Extraction et fractionnement des protéines à partir des champignons et du gland du chêne broyés dans de l'azote liquide et dilués dans un tampon PBS suivis de filtrations et de centrifugations.
- Tests d'hémagglutination sur les hématies de lapin 3% afin de déterminer l'activité hémagglutinante des protéines.
- Tests de l'effet de la température et du pH sur l'hémagglutination en présence des lectines afin de déterminer leur thermo-sensibilité et leur pH optimum.
- Tests d'agglutination sur le système sanguin ABO afin de déterminer leurs spécificités aux groupes sanguin.
- Tests d'inhibition d'hémagglutination en présence de différents mono et di saccharides et des glycoprotéines pour la détermination de leur spécificité envers un sucre.
- Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium.
- Purification partielle sur une colonne G25
- Contrôle de la pureté et estimation des poids moléculaires par SDS-PAGE.
- Lyophilisation de l'extrait brut du champignon sec « *Lepistaseava* ».
- Effet anti-inflammatoire du champignon sec sur des rats *WISTAR*.

Notre travail est divisé en trois parties :

- ✚ Une partie qui se concentre sur l'étude bibliographique des lectines.
- ✚ Une partie qui présente le matériel et les méthodes utilisés lors des expérimentations.
- ✚ Une partie qui expose les résultats ainsi que leurs interprétations en discussion.

Dans notre recherche, nous avons travaillé sur un champignon pied violet et sur le gland du chêne vert afin d'analyser si ils ont un bon rendement en lectines. On a effectué des testes sur le champignon « *Lepistaseava* » et sur le gland du chêne « *Quercus suber* ». L'extraction des lectines a été effectuée dans un tampon PBS après macération qui a duré 24H.

I- Généralité sur les lectines

I-1 Définition

L'étymologie du nom Lectine est établie en 1954 par Boyd .Le mot Lectine est dérivé du latin «lectus» qui est le participe passé du verbe «legere», qui signifie «sélectionner» ou «choisir ».

(Lieneret al., 1986).

Les lectines sont une classe de protéines, leur seule caractéristique commune étant la capacité de se lier spécifiquement aux hydrates de carbone et d'agglutiner les cellules.**(Kocourek et Horejsi, 1981).**

Elles sont définies comme des protéines ou des glycoprotéines d'origine non-immune « virale, bactérienne, végétale ou animale ». **(Goldstein et al, 1980).** Elles se lient de façon spécifique et réversible aux glucides. **(Peumans et Van Damme, 1995).**

Ces protéines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD, Habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques. **(Ghopkins et Evrard, 2003).**

Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand. **(Lis and Sharon, 1998).**

Les lectines sont initialement connues sous le terme d'hémagglutinine, elles possèdent la propriété d'agglutiner les érythrocytes **(Berk, 1993)**, cette possibilité s'explique par leur pouvoir d'établir des liaisons croisées avec les résidus glucidiques de plusieurs globules rouges. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses. **(Lieneret al, 1986).**

Elles sont également impliquées dans la reconnaissance hôte-pathogène, telle que l'hémagglutinine du virus *Influenza* qui permet l'adhésion du virus aux cellules cibles et initie l'infection, elles possèdent aussi des mécanismes de défense en agglutinant les agents pathogènes chez certains invertébrés, les lectines interviennent notamment dans l'établissement de symbiose entre les bactéries du sol du genre *Rhizobium* et les légumineuses. Elles favorisent la reconnaissance des leucocytes sur les cellules endothéliales pour provoquer la réponse immunitaire dans les phénomènes d'immunité innée. Mais les lectines n'appartiennent pas au système immunitaire de l'hôte même si elles ont des actions dans les phénomènes de l'immunité innée, à la différence des anticorps. Cette distinction permet de

Généralité sur les lectines

faire la différence entre lectines et immunité innée et anticorps et immunité acquise. **(Mathieu S,2011)**

Les lectines ont été utilisées comme outils pour identifier les glycanes aberrants exprimés par des cellules néoplasiques et vérifier les interactions entre les agents pathogènes et les glucides des cellules hôtes et déterminer l'étiologie des maladies microbiennes **(BENNET *et al*, 2005)**.

Les lectines provoquent l'atrophie de la rate et du thymus ainsi que l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas, ces effets néfastes sont inactivés par le traitement thermique dont l'efficacité est en fonction de la température et la durée du traitement. **(Kokourek et Horejsi, 1981)**.

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.

I-2 Historique

L'existence des protéines dites hémagglutinines c'est-à-dire molécule capable d'agglutiner naturellement les érythrocytes ou les hématies est mise en évidence à la fin du XIX^{ème} siècle.

Peter Hermann Stillmark est le premier à avoir décrit une de ces protéines durant sa thèse de doctorat en 1888 à l'université de Dorpat (aujourd'hui Tartu en Estonie) où il réalisa une extraction d'une hémagglutinine très toxique à partir des graines du ricin (*Ricinus communis*), nommée Ricine.

En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isola la première hémagglutinine pure, la concanavaleine A à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) **(Sumner 1919)**. Vingt ans après, en 1936 d'autres découvertes ont suivi, la spécificité de ces protéines pour les sucres est mise en évidence avec l'inhibition de l'hémagglutination de la Concanavaleine A par du saccharose **(Sumner and Howell 1936)**. En 1940, après la découverte du système ABO par Karl Landsteiner, William C. Boyd et Karl O. Renkonen démontrent la spécificité de ces hémagglutinines pour les différents groupes sanguins humains et leur capacité à agglutiner les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes. Cette découverte amène Boyd à remplacer le terme d'hémagglutinine par celui de lectine (de latin, légère : choisir – préférer) **(Sharon et Lis, 2007)**. Avec l'introduction des chromatographies d'affinité pour la purification de lectines par Irwin J. Goldstein et Bipin B. L. Agrawal de l'université du Michigan **(Agrawal et Goldstein 1965)**.

Généralité sur les lectines

Tableau 1: Historique et propriétés des lectines les plus connues (**Renato DE A, Moreira. 1991**).

Année	Chercheur	Découverte
1884	Warden&waddel / Bruyllant&Venneman	La toxicité de la graine de <i>l'Arbusprecatorius</i>
1886	Dixon	Toxicité de la graine de <i>Ricinuscommunis</i>
1888	Stillmark	Activité hémagglutinine de la graine de <i>Ricinuscommunis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinine de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner &Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques
1908	Landsteiner &Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes a hémagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1917	James B. Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A (Con A)
1926- 1927	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1936	Summer&Howell	La spécificité de la concavoline au sucre
1947- 1949	Boyd &Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de <i>PhaseolusVulgaris</i>
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolusvulgaris</i>
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin

Généralité sur les lectines

1954	Boyd&Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolusvulgaris</i>
1965	Agrawal &Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi&Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'E.Coli
1988	D'Oliveira et al	Usage des lectines dans le traitement des pathologies pancréatiques
1995	HIROKAZU KA WAGISHI	Les lectines chez les champignons (MUSHROOM LECTINS.2015)
2002	Hexiang Wang et al	L'isolement d'une nouvelle heterodimeriquelectine avec une activité mitogenique à partir d'un champignon : <i>Agrocybecylindracea</i>
2003	M.W. Turner	Le rôle de la lectine liant le mannose dans le traitement et les maladies
2004	Ilka M. Vasconcelos José &Tadeu A. Oliveira	L'activité anti-nutritionnelle des lectines végétales (Antinutritionalproperties of plant lectins -Toxicon 44 (2004) 385–403)
2011	POIROUX Guillaume	Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photo chimiothérapie
2015	Yau Sang Chan &Tzi Bun Ng	Lectine avec un grand potentiel d'inhibition des cellules cancéreuses mammaliennes du champignon comestible de l'espèce : <i>Dioscoreaopposita cv.</i> de la région Nagaimo au japon

I-3 Structure des lectines

En 1972, Concanavaline A fut la première structure cristalline d'une lectine qui a été déterminée par diffraction des rayons X. (**Edelman 1972; Hardman 1972**). Depuis cette date à nos jours, plus de 500 structures cristallines de lectines ont été déterminées. (**Gianluca, 2006**). Les lectines présentent une très grande variété et diversité structurale, selon leur topologie elles sont classées en trois grandes classes :

- **I.3.1 Les lectines simples**

Ces lectines sont constituées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), généralement leur masse moléculaire n'excède pas 40KDa. Cette classe comprend

Généralité sur les lectines

pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales solubles possédant une affinité pour les glycoconjugués contenant des B-galactosides). (Lenka s, et al 2006). (Figure 01)

La protéine est représenté par un ruban rouge pour les hélices α , un ruban bleu pour les brins β et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule. (Lenka, 2006).

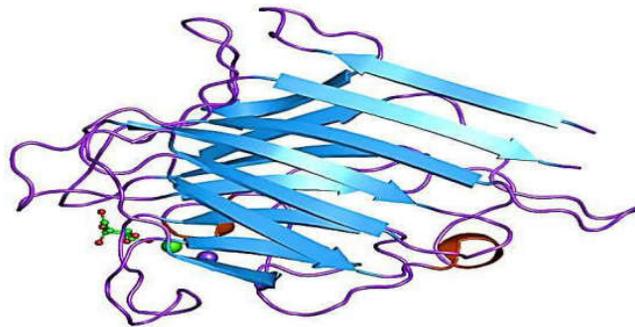


Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de Concanavalline A de *canavaliaensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006)

- **I.3.2 Les lectines en mosaïque**

Diverses protéines de différentes origines (virus, animaux) sont classées dans ce groupe. Ces lectines sont des molécules complexes composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison. (Lenka et al., 2006) (Figure 02)

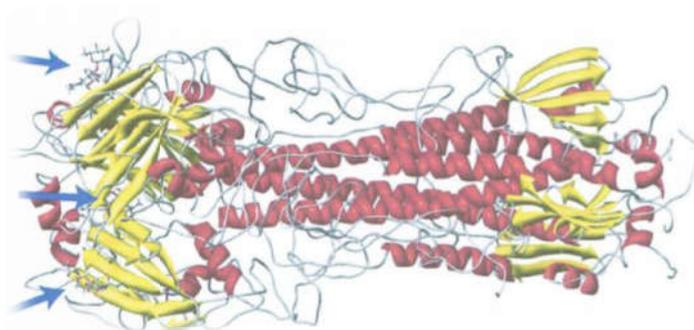


Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al. 2006)

I.3.3 Les assemblages macromoléculaires

Elles se trouvent fréquemment chez les bactéries ; formant des structures filamenteuses dont leur diamètre varie de 3 à 7 nm et d'une longueur de 100 nm ; 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. Le site de liaison pour les glucides est présent sur un seul type d'unités (généralement une composante minoritaire). Ce dernier est donc responsable de la capacité d'adhésion du fimbrial (Lenka *et al.* 2006). (Figure 03).

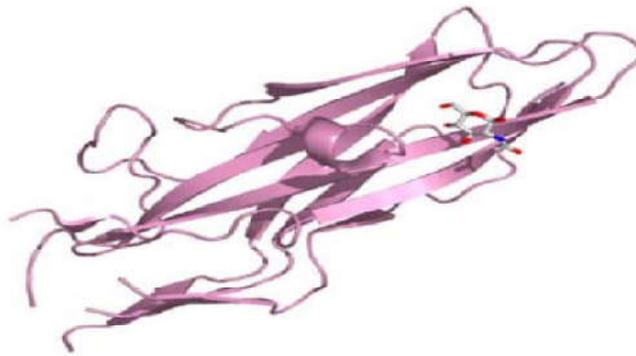


Figure 3 : Lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (Gianluca, 2006).

I.3.4 Structure tridimensionnelle

L'organisation tridimensionnelle des lectines est constituée de feuilles β reliés par un nœud formant des chaînes antiparallèles avec des hélices α , les interactions hydrophobiques et hydrogènes assurent la stabilité des dimères (Sharon & Lis, 1990). Trois régions d'interactions et des ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) nécessaires à ces interactions peuvent être regroupés dans le site de liaison avec les carbohydrates (CRD), 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).

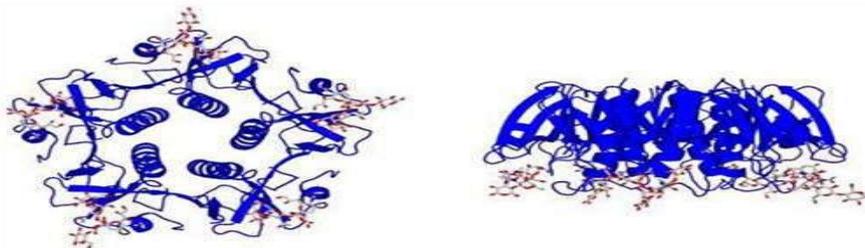


Figure 4 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb3chb) (Merritt, E.A., and Hol, W.G.J. 1995)

Tableau 02 :

Tableau 2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines. (Karolina, 2006).

Origine	Exemples des lectines	Native	Complexe	Total
Plante	Con A ricine	106	201	307
Bactérie	PA-IL de pseudomonas toxine de cholera	37	79	116
Animeaux	E-selectin Helixpomatia Agglutinine	80	152	232
Virus	Hémagglutinine de Virus	43	25	68
Champignon	Lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9
Total		285	487	772

I-4 Spécificité et affinité des lectines

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (Robert, 2008), ces sucres se trouvent surtout sous forme de glycoconjugués, présents dans et sur la surface des cellules. Par rapport à leur spécificité on peut distinguer deux classe de lectines : celle qui reconnaissent un monosaccharide et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Kumaret al, 2012).

La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais pour certains oligosaccharides leur affinité sera en général plus forte. La constante de dissociation pour les monosaccharides est de l'ordre du milli molaire (mM), par contre, pour les oligosaccharides elle est de l'ordre du micro molaire (uM). (Dam et Brewer 2002).

Les lectines reconnaissent de façon spécifique des mono et oligosaccharides. Concernent leur spécificité pour des monosaccharides, elles sont divisées en cinq groupes selon le glucide pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le mannose (Man), legalactose (Gal)/ N-

Généralité sur les lectines

acétylgalactosamine (GalNAc), le glucose (Glu)/le N-acétylglucosamine(GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique), ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopesglycaniques des surfaces cellulaires (**Lis et Sharon, 1998**).

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

ESPECES	SPECIFICITE
Abrus precatorius	Gal
Adeniadigitata	Gal
Aleuriaaurantiaca	L-Fuc
Canavaliabrasilensis	Man >Glc
Canavaliaensiformis	Man >Glc
Dolichosbiflorus	GalNAc
Phaseolusvulgaris	GalNAc
Vicia sativa	Man
Ulexeuropaeus 1	L-Fuc
Momordicacharantia	GalNAc
Cytissussessilifolia	GlcNAc>Fuc>Gal
Datura stramonium	GalNAc

I-5 Site de liaison

Toutes les informations disponibles sur les modes de reconnaissance ont été établies sur la base de l'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre. Pour les lectines spécifiques des monosaccharides, les sites de liaison sont généralement des concavités peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, les lectines spécifiques pour les oligosaccharides, leurs sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (**figure 05**)(**Gianluca, 2006**).

Les liaisons hydrogène, ionique et Van Der Wals entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).

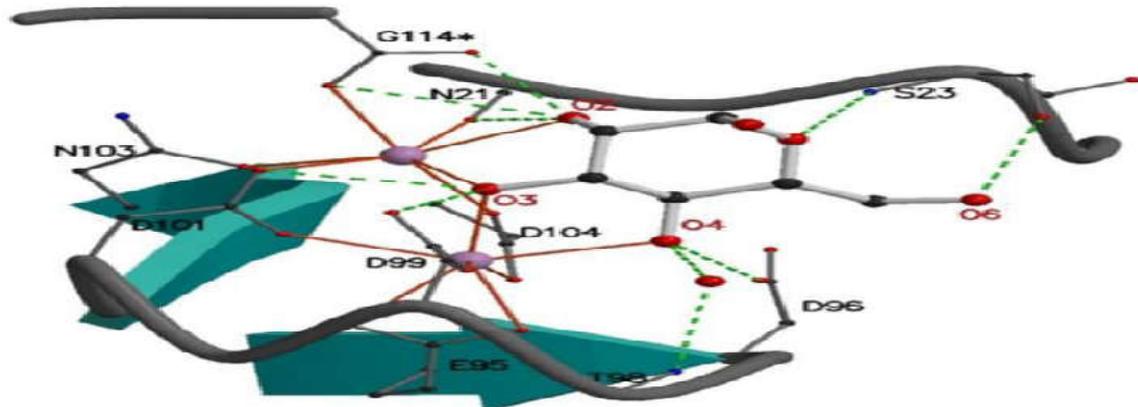


Figure 5 : L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-III (Gianluca, 2006)

I-6 Propriétés des lectine

Leslectines possèdent des propriétés biologiques et médicinales multiples et variées :

✚ I-6-A Propriété biologique

- A-1L'interaction lectine–glucide

Cette interaction est spécifique et propre à chaque lectine, la mise en évidence de l'activité de la lectine est conditionnée par la connaissance du sucre spécifique.(Myoshi et Al, 1982).Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation. Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leurs spectre de spécificité. (Karoline 2008)

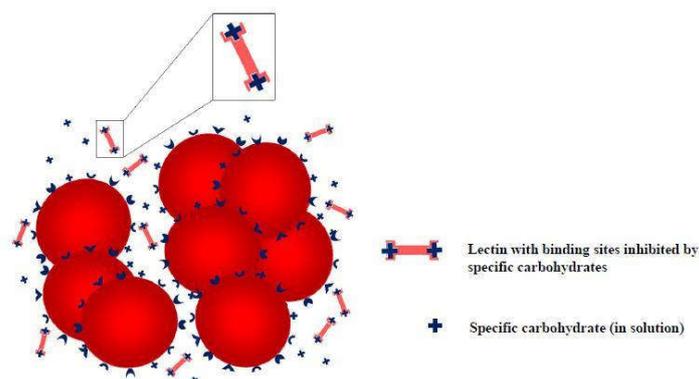


Figure 6 : Inhibition des lectines par les sucres (Santos *et al*, 2014).

La cavité de reconnaissance glycanique qui constitue les lectines possède une plasticité leur permettant d'interagir de manière plus spécifique avec certains glycoconjugués que d'autres (Jain *et al*, 2001), les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la

Généralité sur les lectines

lectine interagissent avec ces glycanes par des liaisons non-covalentes. (Jeyaprakashet al, 2003).

Plusieurs lectines possèdent des sites de liaison pour les glucides. L'interaction qui se produit entre les lectines et les glucides présents sur la surface des hématies résulte en une agrégation d'un grand nombre de ces cellules, cette caractéristique est typique des lectines. (Karoline, 2008).

- A-2 L'agglutination des cellules

Il s'agit du processus le plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'il se produise, les lectines doivent avoir au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides qui se trouvent sur la surface des cellules animales ou autres (bactérie, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines avec un seul site de reconnaissance dites monovalentes ne provoquent pas d'agglutination. (Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998).

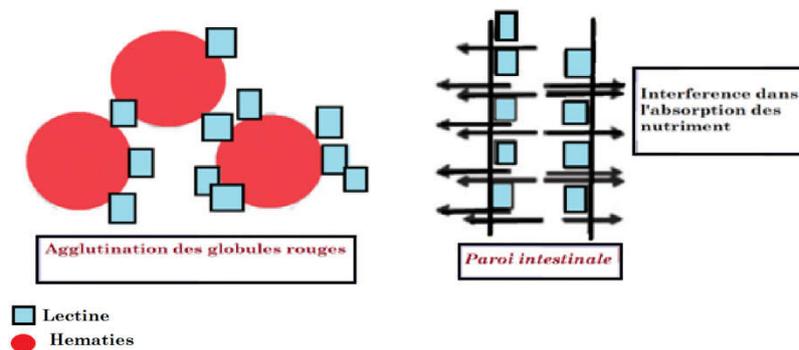


Figure 7 : Mécanisme d'action des lectines. (Makkaretal., 2007)

- A.3.L'activité mitogène

Les lectines possèdent un pouvoir mitogène qui ne s'exerce généralement que sur les lymphocytes T. Cette propriété transforme les petits lymphocytes sanguins en cellules blastiques. (Nachbarett Oppenheim, 1980 ; Falasca, 1989 ; Babosa, 2001).

Elle possède la capacité d'activer diverses lymphocytes. (Widmer, 1996).

- A.4.Effets mimétiques des hormones

Généralité sur les lectines

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

✚ B- Propriété médicinale

- **B-1 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses**

En 2003, Valentier et coll suggèrent que les lectines alimentaires pourraient avoir la capacité d'inhiber la croissance cellulaire des cellules cancéreuse du sein de l'homme in vitro. Les lectines peuvent induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses en les injectant dans la circulation sanguine à des doses non toxiques (Poiroux, 2011). Ils inhibent également leur migration. (Banwell, 1983)

- **B-2 Propriété antivirale**

Les lectines interviennent dans la fixation et l'inhibition de la réplication des virus au cours des infections virales. (Xu et al ,2014), ils sont également impliqués dans la détection des molécules pathogènes tel que les (PAMPs) associées au virus (Kawamura et al, 2014). Ces protéines sont aussi capables d'inhiber l'enzyme rétro transcriptase du VIH-1 et par conséquent bloquer l'infection induite par ce dernier. (Tanaka et al ,2009 ; Hamid et al ,2013)

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius*. (Zitouni, 2015).

- **B-3 La propriété antibactérienne**

Cette propriété permet aux lectines de réguler la migration et l'adhésion des cellules bactériennes. (Tanne et Neyrolles, 2010).

Généralité sur les lectines

- **B-4 Propriété antifongique**

L'activité antifongique concernent que les lectines possédant un domaine catalytique, elles appartiennent généralement à la classe 1 des chitinases.(Andrew et al, 2014)

- **B-5 Propriété immuno-modulatrice**

Un grand nombre de lectines ont la capacité de produire une activité immuno-modulatrice lors de la première interaction des glycanes présent à la surface des cellules immunitaires. (Abdeljalil et al, 2014)

Tableau 4 : Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent (d'après Lis & Sharon, 1986).

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

I-7 Rôle biologique des lectines

Les lectines sont capables de produire une variété d'événements et de fonctions dans les organismes vivants en interagissant avec des systèmes biologiques vivants (**figure 08**). Ces interactions présentent une grande importance du fait qu'elles sont impliquées dans les

Généralité sur les lectines

processus biologiques ainsi que dans les processus pathologiques également. (**Lis et Sharon, 1998**).

Parmi ces rôles on retrouve ;

Les lectines se trouvant à la surface des bactéries, virus ou des parasites intestinaux facilitent les processus de colonisation et d'infection après avoir reconnu les glycoconjugués présents sur les cellules épithéliales. (**Rudiger et Gabius, 2001**).

Les lectines des plantes ont un rôle qui reste toujours une énigme qui n'est pas encore résolue. Probablement ce rôle réside dans la défense du végétal contre les phytopathogène ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de plante. (**Rudiger et Gabius, 2001**).

Les lectines interviennent dans le système immunitaire, 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 jouent un rôle très important dans le contrôle du niveau des protéines dans le sang (**Rydzet al, 2013**) puisqu'elles sont responsables de leur transport ainsi que le transport des peptides et les médicaments natifs. (**Sutapa et Gopa, 2013**).

Lors de la fertilisation, le processus de reconnaissance s'accomplie par l'interaction entre une lectine dite (spermadhesine) du spermatozoïde avec un glycoconjugué présent sur les ovocytes. (**Topfer Petersen et al., 1998**).

Tableau 5 : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant. (Guillot, J., Kanska G., 1997)

Généralité sur les lectines

	Lectine	Rôle
Bactérie	Lectinesfimbriales	Adhésion,infection
	Lectinessolubles	Adhésion,infection, formationde biofilm
	Toxines	Adhésion,infection
Virus	Influenzahémagglutinine	Adhésion,infection
Amoeba	Lectinesdesurface	Adhésion
Plantes	Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
	Galéctines	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire
	Autres	Défense

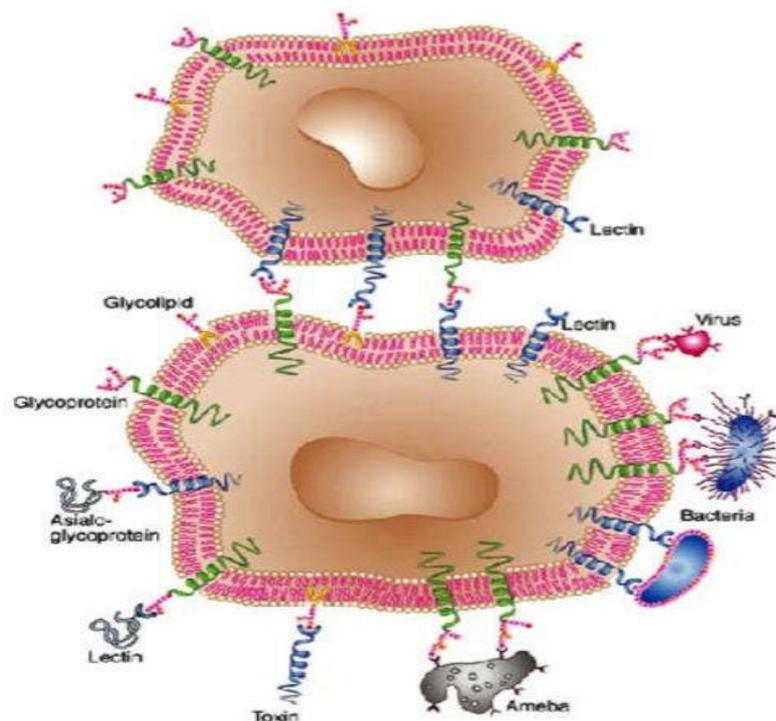


Figure 8 : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire (Gianluca, 2006)

I-8 Utilisation et application des lectines

Aujourd'hui, les lectines sont des outils qui sont beaucoup utilisés dans la recherche, ils sont largement appliqués dans le secteur biomédical ainsi que dans le domaine agronomique.

✚ A-Domaine biomédical

Le changement de l'état de glycosylation des cellules permettait de découvrir les états physiologiques et pathologiques ceci fut possible grâce à l'utilisation des lectines. **(Raquel et Benevides, 2011).**

- **A-1 Immunologie**

Quelques lectines extraites et purifiées à partir des graines de légumineuse tropicales possèdent des propriétés anti-inflammatoires. **(Alencar et al., 2005 ; Gomes et al., 2012)**

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

Des travaux in vitro ont démontré que la BanLec (lectine de banane) présente une activité anti-VIH, en se liant à la protéine gp120 de la capsid virale du VIH en l'empêchant de se lier avec la cellule hôte et donc bloquer son entrée dans les cellules. **(Swansaon et al., 2010; Gupta, 2012).**

De nombreuses lectines sont utilisées comme des inhibiteurs viraux, tel que la lectine extraite de la racine de *l'Ortie urtica*. **(Suttisrisung et al., 2011)**

- **A-2 Hématologie**

Certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour l'identification ou le typage des groupes sanguins humains en reconnaissant spécifiquement les antigènes de ces derniers. **(Boyd et Shapleigh, 1954).** En 2008, Goker donne comme exemple la lectine d'haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) qui se lie à N-acétyl-Dgalactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A. **(Goker et al., 2008)**

- **A-3 Biologie cellulaire**

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

Les lectines ont également été utilisées pour isoler et analyser des glucides complexes et pour séparer des cellules isolées en se basant sur la présence de glucides spécifiques sur leurs surfaces. (**Ghopkins et Evrard, 2003 ; Genten et al, 2010**).

- **A-4 Cancérologie**

Certaines lectines extraites et purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont des marqueurs histo-chimique puisque certaines pathologies tel que le cancer sont associé à une modification des glycannes présents à la surface des cellules. (**Guillot et al. 2004, Zang et al. 2010**).

En 2001, Kenoth démontre que les lectines présentent une agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, et donc suggérées comme un moyen de transport des drogues et des produits pharmaceutique qui les dirige vers les cellules cancéreuses. (**Kenoth, 2001**).

La lectine dans le son de riz est capable d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses humaines in vitro, cette lectine pourrait rester active chez l'humain et donc conserver ses propriétés puisqu'elle résiste bien à son passage dans l'estomac. (**Jodoïn, 2010**).

- **B- Domaine agronomique**

Dans le secteur agronomique les lectines peut être utilisées pour lutter contre les agents nuisibles des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui perpètrent d'immenses dégâts dans des cultures. (**Murdock et Shade, 2002**).

I-9 Classification des lectines

Les lectines sont présentes chez tous les organismes vivants en grande variété et diversité structurale. Ces protéines sont dites ubiquitaires.

Généralité sur les lectines

En 1980, les études de biochimie structurale ont mis en évidence l'oligomérisation des lectines. Certaines sous-unités sont responsables de la reconnaissance glycanique et d'autres ont une activité catalytique cytotoxique. Grâce à ces avancées scientifiques la classification des lectines a été faite selon leur structure quaternaire (**Van Damme et al, 1998**) :

- ❖ Les mérolectines (monovalentes et donc non agglutinantes)
- ❖ Les hololectines (di ou multivalentes, concernent la plupart des lectines végétales)
- ❖ Les chimérolectines (protéine de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique et une activité cytotoxique)
- ❖ les superlectines (oligomères poly spécifiques constitués de plus de quatre monomères).

La banque de données des lectines comprend ainsi 48 familles différentes selon la structure, on trouve 6 familles d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1 famille d'algues. (**Karolina, 2008**).

I-9-1 Chez les végétaux

Chez les plantes, les lectines ont été trouvées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermatophytes mais elles sont détectées le plus souvent dans les légumineuses et les Euphorbiacées. (**Grant, 1991; Renkonen, 1948**).

Les lectines végétales qui présentent des homologies de séquences et des similarités structurales proviennent de la même famille taxonomique (ex. les lectines de légumineuse, de céréales, etc.). Historiquement, la première lectine de légumineuses qui a été caractérisée fut la Concanavaleine A (ConA), et c'est la première structure cristallographique qui a été déterminée en 1972 (**Edelman et al, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**).

Les protéines de cette classe sont repliées d'une façon appelée « B Jelly roll » et sont formées par deux feuillettes B superposées et bien conservées dans de nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent 2 à 2 de sept manières différentes et donc peuvent former une variété d'assemblages macromoléculaires sous forme de dimères ou de tétramères (**Sinha et al, 2007**).

Le site de fixation présente un ion de manganèse et un ion de calcium qui sont proches du ligand glucidique mais qui n'interagissent pas directement avec lui. Les acides aminés autour

Généralité sur les lectines

du site de reconnaissance sont variés ce qui permet l'apparition de la spécificité pour différents monosaccharides et oligosaccharides (**Loris et al, 1998**).

Les Graminea (céréales) sont une autre grande famille des lectines d'origine végétale qui a pu être détectées et à laquelle appartient la lectine du germe de grain de blé (WGA). Ces protéines présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi dites domaine hévéine. Première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (**Wright, 1980**).

En 1995, Peumans et Van Damme ont proposé une classification des lectines végétales en prenant compte de leurs structures moléculaires ainsi que leurs réactivités. On trouve quatre groupes (mérolectines, hololectines, chimérolectines, et superlectines) (**Houls, 2001**).

➤ I-9-1-1 Les mérolectines

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides, dit monovalentes (ex. hévéine, protéines d'orchidées) (**Doumbia, 2004**), et ils sont, non agglutinants car ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules (**Peumans et Van Damme, 1995**).

➤ I-9-1-2 Les hololectines

Les hololectines sont di ou multivalentes, pouvant contenir deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi- identiques ou du moins très similaires. Cette classe comprend toutes les lectines qui possèdent plusieurs sites de liaison et peuvent précipiter les glycoconjugués et agglutiner les cellules. Elles présentent la majorité des lectines de plantes (ex. ConBr la lectine de *Canavaliabrasiliensis*) (**Van Damme et al. 1998**).

➤ I-9-1-3 Les chimérolectines

Les chimérolectines sont des protéines de fusion possédant un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides et donc présentent une activité de reconnaissance glycanique, elles possèdent aussi un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant

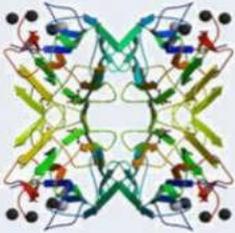
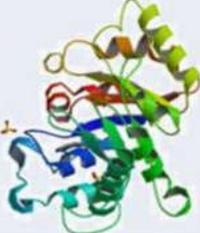
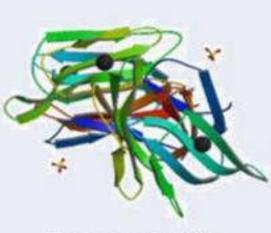
Généralité sur les lectines

indépendamment du site de liaison (Van Damme *et al.*, 1998). Les chimérolectines peuvent se comporter comme des mérolectines selon le nombre de liaisons aux glucides (ex. chitinase classe I) ou comme des hololectines (ex. type 2-Rip ribosominactivating protéine ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (Peumans *et Van Damme*, 1995).

➤ I-9-1-4 Les superlectines

Les superlectines sont des oligomères poly-spécifiques composés de quatre monomères ou plus, ces protéines sont considérées comme un groupe spécial de chimérolectines constitué de deux domaines qui sont différents au niveau structurel et fonctionnel (Van Damme *et al.*, 1998), elles peuvent être aussi prises comme des hololectines présentant plus de deux sites de reconnaissance des glycanes dont chaque site a la capacité de reconnaître des structures glycaniques différentes (Peumans *et Van Damme*, 1995).

Tableau 6 : Classification structurale des lectines des plantes (Van Damme *et al.*, 1998).

Les mérolectines	Les hololectines	Les chimérolectines	Les superlectines
			
Heveína (1HEV)	ConBr (3JU9)	PPL2 (2GSJ)	Banana lectin (2BMY)

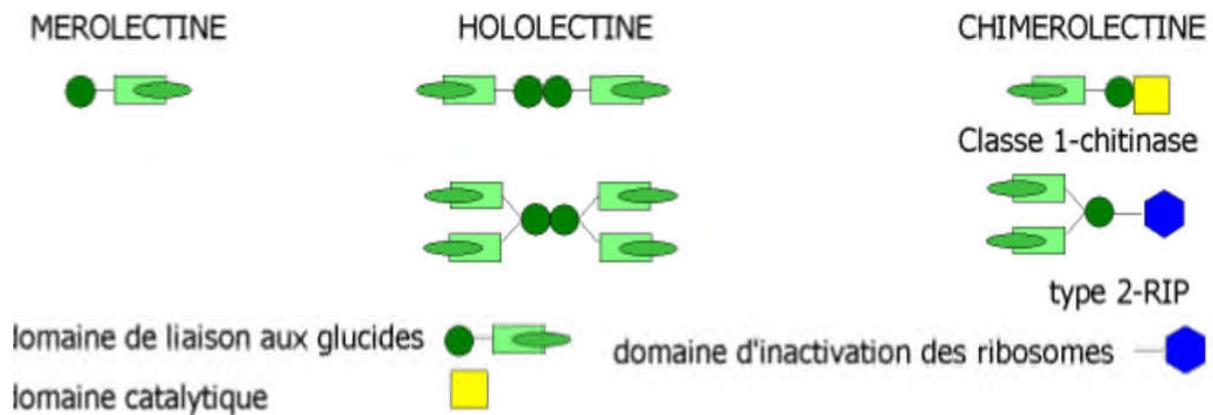


Figure 9: Classification des lectines selon le nombre des chaînes polypeptidiques. (Peumans *et al.*, 1995).

Généralité sur les lectines

✚ I-9-2 Chez les animaux

Chez les animaux, les lectines se lient aux glucides exprimés dans divers tissus. Elles sont soit excrétées ou bien elles sont des protéines membranaires. **(Bianchet et al, 2009).**

Il existe 13 familles de lectines, on peut les diviser en deux catégories :

➤ I-9-2-1 Lectines intracellulaires

Cette catégorie de lectines est composée de quatre groupes :

- Les calnexines
- Les lectines de type M
- Les lectines de type P
- Les lectines de type L

Ces lectines ont des rôles importants impliqués dans le trafic intracellulaire, tel que l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation. **(Chabrol et al, 2012).**

➤ I-9-2-2 Lectines extracellulaires

Les lectines extracellulaires regroupent toutes les lectines restantes, tel que les lectines de type C et R, ainsi que les galéctines, elles sont impliquées dans la signalisation, l'adhésion cellulaire, et la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance de certaines pathologies. **(Chabrol et al. 2012).**



Figure 10: Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) **(Somers, et al. 2000).**

Généralité sur les lectines

Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

✚ I-9-3 Les lectines des microorganismes

Les lectines de cette classe sont utilisées par des microorganismes pathogènes, virus, bactérie, champignons, ou parasites eucaryotes, afin de reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôtes. Cette interaction lectine-sucre s'implique aussi dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies digestives, respiratoires ou dans l'appareil urogénital (Imberty, et al.2005) (Sharon, N.1996).

➤ I-9-3-1 Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes se trouvent généralement sur la surface de la bactérie ou dans le cytosol, elles jouent des rôles essentiels dans la reconnaissance des glycoconjugués localisés à la surface des cellules hôtes lors de la première étape du processus d'infection, (Sharon, N.1996). Les lectines les plus connues de ce groupe peuvent être classées en trois familles :

- les lectines fimbriales. (figure 11).
- les toxines.
- Les lectines solubles. (Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M.2005)

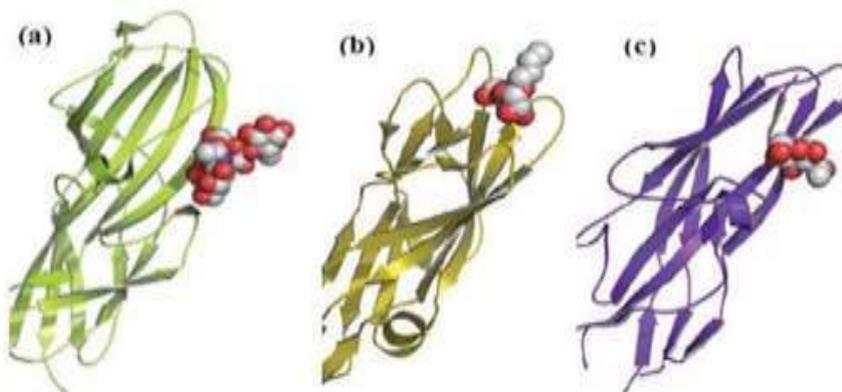


Figure 11: (a) Récepteur PAPG complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH complexe avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-A complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)

I-9-4 Chez les champignons

Les champignons, y compris les moisissures font partie d'une importante classe d'organismes. De par leurs propriétés nutritionnelles, les champignons ont toujours gardé une place importante dans notre alimentation, dans nos traditions gastronomiques mais également dans la médecine, spécialement dans la médecine traditionnelle orientale. Les champignons ne peuvent synthétiser eux-mêmes leur propre matière organique Ils doivent la trouver dans leur environnement. Ils ont donc développé trois modes de vie : saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, sont très riches en métabolites et en protéines qui leur procurent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques. Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines antifongiques, des ribonucléases, des protéines de type ubiquitine, des lectines, des cellulases, des xylanases, des laccases, des invertases et des tréhaloses phosphorylases (Ng, 2004).

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons a été principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (She, 1998 ; Sze, 2004)

Les lectines des champignons joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la morphogénèse du corps fructifère ou comme protéines de défense immunitaire. Chez les saprophytes, les lectines pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats nutritifs. Par contre, chez les champignons qui adoptent un mode de vie parasitaire ou symbiotique avec d'autres organismes, les lectines sont probablement impliquées dans les processus de reconnaissance de l'hôte ou dans les premières étapes de la mycorrhization (Giollant, 1993).

Tableau 7 : Lectines des champignons connus (Permberton 1994).

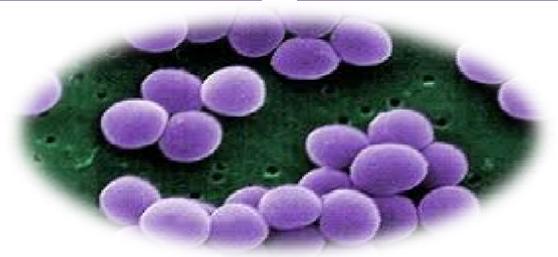
Généralité sur les lectines

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
Aleuria aurantia (AAL)	2003	Fucose β -propeller à 6 lames
Flammulina velutipes (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
Xerocomus chrysenteron (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
Coprineus cinerea (CGL2)	2004	GalGaléctine
Agrocibecylindracea (ACG)	2005	GalGaléctines
Agaricus bisporus (ABL)	2005	T-antigène Domaine similaire aux actinoporines
Laetiporus sulphureus (LSL)	2005	LacNAc Undomaine ricine et undomaine type pore
Psathyrella velutina (PVL) 3116	2006	GlcNAc/NeuNAc β -propeller à 7 lames

I-10 Lectines les mieux connues

Généralité sur les lectines

Tableau 8: lectines importantes (Mancheno j. Tatenno H ; Goldstein I.J., Martinez-Ripoll M. Hermoso J., 2005)

Agglutinine du germe de Blé		Utilisé dans l'étude des surfaces membranaires des cellules normales et cancéreuse
Ricine		Glycoprotéine cytotoxique provenant des graines de ricin
Toxine bactérienne		Entérotoxine thermolabile d'E. coli et toxine du choléra
Hémagglutinine du virus de la grippe		Responsable de l'attachement à la cellule hôte ainsi que la fusion membranaire
Lectine de type S		Lectine animales se liant avec les β-galactose, elles ont aussi des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

II- Système ABO

II-1 Définition

Le système ABO est un système de reconnaissance des globules rouges étrangers à l'organisme grâce à la présence des antigènes à la surface de ces cellules. Chacun de ces antigènes (A, B) a son anticorps respectif, et qui constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de Mendel (**Ramata, 2010**).

II-2 L'intérêt du système ABO

La notion de l'immunogénétique est née par la découverte du système ABO, ce dernier a été à l'origine des progrès considérable en médecine en permettant d'envisager des transfusions compatible chez l'homme. Le système ABO représente aussi l'antigène d'histocompatibilité majeur en transplantation des organes, ceci est due de sa large distribution tissulaire (**Ramata, 2010**).

II-3 Les groupes sanguins

II-3-1 Définition

La découverte de l'agglutination d'hématies par les sérums signe la date de naissance de la notion de groupe sanguin. Il peut s'agir d'une allo-agglutination (**Landsteiner, 1900**) ou d'une hétéro agglutination (**Landsteiner et Alexander, 1940**).

Le système ABO est le système majeur le plus important de tous les systèmes de groupes sanguins et le plus connu. Cette primauté a été conservée en raison des anticorps naturels qui correspondent aux antigènes absents des globules rouges. La présence sur les globules rouges d'un antigène exclu la présence dans le plasma de l'anticorps qui lui correspond. (**Ramè et Naccache, 2001**) On peut ainsi déterminer quatre phénotypes courants :

- Le groupe A, l'antigène A est seul présent sur les hématies.
- Le groupe B, l'antigène B est seul présent sur les hématies.
- Le groupe AB, les antigènes A et B sont tous présents.
- Le groupe O, aucun antigène n'est présent (ni l'antigène A, ni l'antigène B).

La structure de base des antigènes du système ABO est constituée de lipide céramide auquel est attaché un oligosaccharide composé d'un glucose (Glu), d'un galactose (Gal), d'une N-acétyl-galactosamine (GalNac), d'un galactose (Gal) et d'une fucose (Fuc) (**Parham, 2000**).

Système ABO

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

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

Tableau 9: Les groupes sanguins (Ramata, 2010)

Groupe	Antigène	Sérum	Fréquence
O	Ni A, ni B	Anti A et anti B	43%
A	A	Anti B	45%
B	B	Anti A	9%
AB	A et B	Ni anti-A, ni Anti-B	3%

II-2-2 Lectines spécifiques des groupes sanguins

Plusieurs lectines agglutinent les hématies des fois avec une spécificité de groupe sanguin (Bird, 1974).

Tableau 10: Exemples des lectines spécifiques des groupes sanguins

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

IV- Matériel et méthode

Il s'agit d'une étude réalisée aux laboratoires de Biochimie du biopole science de la nature et de la vie de ChaabatRessas de l'université des frèresMentouri 1 de Constantine.

IV-1 Matériel

IV-1-2 Matériel végétal

Nos travaux ont été réalisés sur trois échantillons :

Champignon frais (pied violet) « *Lepistasaeva* » a été récolté fin janvier 2019 dans la forêt de Djbel Ouahch de la région de Constantine. Représenté sur la photo ci-dessous.

Classification :

- ❖ **Régne :** *Fungi*
- ❖ **Division :** *Basidiomycota*
- ❖ **Classe :** *Agaricomycetes*
- ❖ **Sous-classe :** *Agaricomycetidae*
- ❖ **Ordre :** *Agaricales*
- ❖ **Famille :** *Tricholomataceae*



- ❖ Champignon sec (pied violet) « *Lepistasaeva* » a été récolté fin janvier 2019, soumis à un séchage à l'air libre pendant 21 jours. Représenté sur la photo ci-dessous.



- ❖ Gland sec provenant du chêne vert « *Quercus suber* » a été récolté de la forêt de Djbel Ouahch de Constantine.

➤ **Classification du gland du chêne vert**

- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous-classe** : Apétales
- **Ordre** : Fagales
- **Familles** : Fagacées
- **Sous-famille** : Quercoideae
- **Genre** : Quercus
 - **Espèce** : Suber L.1753

IV-1-2 Matériel sanguin

Les hématies issues du sang de lapin ont été récoltées par un prélèvement sanguin oculaire.

Les hématies humaines collectées au niveau du centre de transfusion du CHU de Constantine.

IV-2 Méthode

IV-2-1 Extraction des lectines

L'extraction des lectines a été faite selon la méthode de (budu1988 et de cammue et al 1985)

Broyage

Chacun de nos échantillons ont été écrasés manuellement à l'aide d'un pilon en fer dans un mortier avec de l'azote liquide afin de les transformer en poudre.

Extraction des lectines

❖ Principe

Cette opération est réalisée afin de récupérer des substances hydrosolubles à partir d'une poudre des échantillons à l'aide d'une solution tampon phosphate di-sodique (PBS).

❖ Technique

La poudre des échantillons résultant du broyage a été diluée dans du tampon phosphate (PBS) (0,1M ; pH=7,4) (**Annexe 1**) (Les quantités ainsi que les volumes utilisé sont mentionnées dans le tableau ci-dessous).

Tableau 11: Les quantités des échantillons et les volumes du PBS utilisés dans la macération.

Echantillon	Champignon Frais	Champignon Sec	Chêne
Volume PBS (ml)	200	800	250
Quantité (g)	25	96,6	30

La suspension de chaque échantillon a été ensuite homogénéisée grâce à un blender ultra turax (DAIHAN SCIENTIFIC & Co), et a été agité pendant 24H sur un agitateur (VELP SCIENTIFICA). Puis on l'a fait passer à une centrifugation de 4000 tours pendant 25minutes à 4°C et on obtenu un surnageant et un culot. Leur nomenclature est présentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12: Nomenclature de fractions obtenues après la centrifugation

Echantillon	Champignon frais	Champignon sec	Chêne
Surnageant	S1	S''1	S'1
Culot	C1	C''1	C'1

Les culots de chaque échantillon ont été dissous dans du tampon (PBS).

Un dosage des protéines suivi d'un teste d'hémagglutination ont été faites pour le surnageant 1 et culot 1 de chaque échantillon. Pour le champignon sec on s'arrête à une seule centrifugation. Quant aux culots 1 (dissous dans du PBS) ainsi que les surnageants 1 du champignon frais et du chêne ont subi une deuxième ultra-centrifugation à 13000 tours/min pendant 30 minutes à 4°C, dont on a obtenu :

Tableau 13: Les fractions obtenues après la deuxième ultracentrifugation

	Champignon frais	Chêne
Culot 1	C2 + S2	C'2+S'2
Surnageant 1	C3+S3	C'3+S'3

Les culots de chaque échantillon ont été dissous dans du tampon (PBS).

On a dosé la concentration des protéines poursuivi d'un teste d'hémagglutination pour chaque culots et surnageants obtenus.

Par la suite :

- Pour le champignon frais on a mélangé le C2 et le C3 ensemble puisqu'ils présentent une bonne absorption à 280nm et une forte activité hémagglutinante, l'homogénat récupéré est appelé C4. On a fait la même chose pour les surnageants S2 et S3 et on a obtenu un mélange nommé S4.
- Pour le chêne on a homogénéisé le C'2 et le C'3 qui manifeste une concentration en protéine appréciable ainsi qu'une bonne activité hémagglutinante, on a appelé l'homogénat obtenu C'4. Les surnageant S'2 et S'3 ont subi la même chose, on a obtenu un homogénat S'4.

Les quatre homogénats sont ensuite filtrés à travers des membranes millipores et des filtres à seringues conçu pour des seuils de filtrations de 0,45µm de diamètre facilitant ainsi la récupération des protéines pour des applications critiques.

Les filtrats sont conservés au froid.

IV-3 Dosage des protéines

Principe

En 1941, **Warburg et Christian** ont étudié les propriétés spectrales des protéines ainsi que les acides nucléiques et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde: à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation ci-dessous:

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

Manipulation

Dans cette étape nous avons mesuré les absorbances par spectrophotométrie de nos différents extraits (surnageant et culot) à deux longueurs d'onde différentes : à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques présents dans nos solutions et qui contaminent souvent les préparations de protéines, et peuvent donc fausser les résultats. Cette technique s'effectue en versant nos solutions qui parfois nécessitent des dilutions (quand la solution est colorée et qu'elle ne peut être lue dans l'ultra-violet) dans une cuve et la placer dans un spectrophotomètre afin de lire les absorbances et de calculer par la suite la concentration des protéines.

IV-4 Test d'hémagglutination

Ce test est effectué afin de mettre en évidence la présence des lectines dans les extraits aux différents niveaux du processus de purification des lectines. C'est le test d'interaction le plus utilisé pour la détection et la caractérisation des lectines en mesurant l'activité hémagglutinante. (**Goldstein et al 1980 ; Rödiger1993**).

Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes.

Le test d'hémagglutination se repose sur l'observation de l'agglutination, et donc de la précipitation des hématies en présence de lectine.

Dans ce test on a utilisé des érythrocytes du lapin à 3%. Il est réalisé sur des microplaques de titration. L'agglutination des globules rouges par les lectines est visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse. Par contre en absence de ces protéines les hématies se tassent par gravité au fond des puits de la microplaque

▪ **IV-4-1 Préparation des hématies à 3%**

Les hématies du lapin collectées suite à un prélèvement sanguin à partir de l'œil du lapin ont été au préalable soumises à un lavage puis à une dilution.

▪ **IV-4-2 Lavage des hématies**

On a préparé plusieurs tubes à essai contenant chacun 3,5ml du sang après les avoir bien fermé on les a centrifugé à une vitesse de 4000 tours pendant 10 minutes à température ambiante. Après 10 minutes écroulées de centrifugation on a obtenu un culot et un surnageant qui, ensuite a été remplacé par un sérum salé 0,9% (**Annexe 02**), puis mélangé doucement et enfin recentrifugé, cette opération de lavage a été reprise quatre fois dans les mêmes conditions que la précédente.

▪ **IV-4-3 Dilution des hématies**

Après le quatrième lavage, le culot récupéré contenant les globules rouges a été dilué avec du chlorure de sodium (NaCl) 0,9%, à raison de 1,5 ml d'hématie dans un volume de 48,5 ml d'eau physiologique afin d'obtenir des érythrocytes à 3%.

▪ **IV-4-4 Technique d'hémagglutination**

Dans chaque puits d'une microplaque de titration on a déposé à l'aide d'une micropipette (P100) 50 µl d'extrait auxquels on ajoute 50 µl des érythrocytes de lapin à 3%. On réserve

trois puits pour les témoins négatifs dans lesquels on ajoute uniquement 50 µl de solution tampon (PBS) et 50µl d'hématies à 3% sans ajouter l'échantillon.

On laisse incuber pendant une heure de temps à température ambiante, la lecture est réalisée à l'œil nu.

IV-5 Test de la limite d'hémagglutination

L'objectif de ce test est de connaître la concentration minimale de lectine montrant une agglutination évidente c'est-à-dire dans laquelle une hémagglutination est encore visible, on appelle ceci point d'équivalence la concentration en lectine de ce puits correspond à une limite d'hémagglutination (UH).

▪ IV-5-1 Technique du test de la limite d'hémagglutination

Ce test est effectué sur une microplaque de titration. Dans une première étape on a déposé 50 µl de tampon phosphate dans tout les puits, suivi d'un dépôt de 50 µl d'échantillon uniquement dans le premier puits, ensuite une double dilution en série a été réalisée jusqu'au 12ème puits, par la suite on ajoute 50 µl du sang. La lecture de la limite de l'activité hémagglutinante a été réalisée après 1 heure d'incubation à température ambiante. On réserve à chaque fois trois puits pour le témoin sur la ligne qui suit la ligne qui a subi une double dilution dans laquelle on ajoute 50 µl de tampon (PBS) et 50 µl du sang.

IV-7 Effet de la température sur l'hémagglutination

Une aliquote de l'extrait brut (Surnageant 1 + Culot 1) de chaque échantillon ont été placés chacun dans des tubes à visse, qui ensuite ont été incubé à des températures différentes (40, 60, 80, 100 °C) dans un bain marie pendant une durée de 45 min. Après le temps requis, on refroidi nos extraits brutes à température ambiante pendant 30 minutes, enfin le test d'hémagglutination a été fait.

• IV-7-1 effet de la température sur la limite d'hémagglutination

On réalise ce test uniquement avec les échantillons qui ont montré une résistance aux températures dans lesquelles ils ont été incubés. Des cascades de double dilution ont été effectuées selon la même méthode décrite précédemment.

IV-8 Effet du pH sur l'hémagglutination

Pour ce test on a choisi de tester différentes valeurs de pH, des valeurs acides et d'autres basiques (2, 4, 5, 9) pour chacun de nos échantillons.

Dans 5 tubes à essai une quantité de 1g de poudre de notre échantillon a été mise tout en ajoutant 4ml de chaque solution tampon qui correspond à chaque pH décrits. Après une agitation et 24H d'incubation à 4°C, on soumit les 5 tubes de chaque échantillon à une centrifugation de 7000 tours/minute pendant 30 minutes. Le test de l'hémagglutination a été réalisé uniquement sur le surnageant obtenu.

IV-9 Test d'hémagglutination sur les érythrocytes humains du système ABO

L'objectif de ce test est de révéler la spécificité des différents extraits aux groupes sanguins, il a été effectué sur les antigènes présents sur la surface des globules rouges humains appartenant au système du groupe sanguin ABO.

- **IV-9-2 technique**

Dans trois puits d'une microplaque ont été déposés 50 ul d'extrait des chaque échantillons suivi d'un dépôt de 50ul d'hématies d'un groupe du sang humain donné. La lecture à l'œil nu est réalisée après 1H de temps à température ambiante.

IV-6 Test d'inhibition de l'hémagglutination

Le but de ce test est la détermination de l'affinité des lectines aux glucides, il se repose sur la capacité d'une série de saccharides à inhiber l'agglutination des hématies du lapin. La réalisation de ce test a été faite sur 13 sucres.

Tableau 14: les sucres utilisés pour le test d'inhibition d'hémagglutination.

Type de sucre	Les noms	Poids moléculaire (g/mol)
Monossacharide	Galactose	180.156
	Glucose	180.156
	Glucosamine (Hcl)	179.17

	Manose	180.156
	Manitol	182,172
Dissacharide	Saccharose	342.3
	Cellobiose	342,3
	Arabitol	152,14
	Xylitol	152,1458
Glycoprotéine	BSA	66.3 KDA
	Ovalbumine	45 KDA
	Albumine	65 KDA
	Caseine	373.7966

▪ IV-6-1 technique du test d'inhibition d'hémagglutination

Dans trois puits d'une microplaque, 50ul de solution de saccharide ou de glycoprotéine (**Annexe 03**) sont ajoutées à 50 ul d'extrait. Le mélange est incubé pendant une heure à température ambiante, cela va permettre aux lectines de reconnaître le sucre. Ensuite 50 ul d'érythrocytes du lapin 3% ont été ajoutés, après une incubation qui a duré une heure de temps l'observation de l'inhibition a été effectuée à l'œil nu tout en comparant avec deux témoins, dont le premier est dépourvu d'inhibiteur (sucre), et le deuxième témoin ne contient que le tampon et le sang.

IV-7 Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Chaque protéine est plus ou moins soluble selon sa composition, donc on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite lorsqu'on change la force ionique de la solution qui les contient. Certaines protéines précipiteront très facilement alors que d'autres seront résistantes. C'est cette différence de la solubilité qui permet de les séparer.

▪ IV-7-1 Technique de la précipitation au sulfate d'ammonium

On utilise la table monogramme de Cooper (**Annexe 4**) qui donne les quantités de sulfate d'ammonium nécessaires pour atteindre le niveau de saturation à 0°C, ainsi que la quantité de sel ajoutée à une solution qui en contient déjà.

Nous avons choisi pour nos différents extraits les précipitations relatives à 50% et à 85% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et effectuer le test d'hémagglutination à chaque degrés de saturation afin de vérifier la présence ou l'absence des lectines dans les différents culots. Après l'ajout de la quantité nécessaire du sel à nos extraits, le mélange est soumis à une agitation à froid avec un agitateur électrique pendant 20min jusqu'à ce que le sel soit dissous dans la solution. Après la précipitation, le mélange est soumis à une ultra-centrifugation à une vitesse de 13000 tours / minute pendant 30 minutes.

Les surnageants récupérés après précipitation à 50% ont été conservé pour subir une seconde précipitation à 85%.

Le culot est récupéré après chaque précipitation (50%, 85%) et dissout avec 4ml du tampon phosphate. Un test d'agglutination est ensuite réalisé, par la suite on conserve les culots à 4°C jusqu'à une nouvelle utilisation.

▪ **IV-7-2 Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium**

Ce test est réalisé afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des lectines dans les culots précipités, et connaître également la concentration minimale dans laquelle une agglutination est encore visible.

On dépose dans le premier puits 50 µl du tampon PBS puis 50 µl de l'extrait précipité (Culot 50%, Culot 85%) ; ensuite une série de concentration par double dilution a été effectué dans les puits qui suivent. Puis, l'observation de l'activité agglutinante a été réalisé à l'œil nu après 1 heure du dépôt de 50 µl des hématies du lapin 3% dans tout les puits.

On réserve trois puits qui serviront de témoin après chaque ligne dans laquelle on a effectué la double dilution. Ce témoin comprend 50 µl du tampon phosphate et 50 µl du sang de lapin 3%.

IV-8 Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire

Le but de cette technique est d'éliminer les sels de nos solutions, et de purifier partiellement les protéines.

➤ **IV-8-1 Principe**

La filtration sur gel est une technique de fractionnement des extraits qui sont souvent très sensibles à la dénaturation. Elle repose sur la séparation selon la masse molaire. Ainsi, les

particules de poids moléculaire élevés sont trop grosse pour pénétrer à travers aucun pore du gel pour cela elles sont les premières à être recueillies, les particules suffisamment petites pour diffuser dans certaines billes mais trop grosse pour pénétrer dans d'autres sortiront en deuxième lieu, finalement les petites particules seront les dernières à sortir de la colonne.

IV-8-2 Préparation de la colonne G25

A) Description

La hauteur de la colonne utilisée est de 30 cm avec un diamètre de 1.5cm d'où un volume de 210 ml environ.

B) Remplissage

La colonne a été remplie avec une préparation du gel sephadex G25 (**Annexe 05**) après l'avoir lavé avec du tampon phosphate pendant 24H.

C) Dépôt de l'échantillon

A l'aide d'un compte goutte 5ml d'extrait sont déposés dans la colonne à travers une pompe réglée à 2ml/6min avec un débit de 0.33ml/min.

Tableau 15: Intervalle de fractionnement du gel séphadex G25.

Type de gel séphadex	Domaine de fractionnement(Da)	Application
G-25	1000-5000	Dessalage de protéines et acide nucléique

Après la séparation de nos différents échantillons on a recueillie 60 fractions dont chacune comprend un volume d'élution qui varie entre 2 à 4 ml. Elles feront l'objet d'un dosage des protéines à 280nm et à 260nm pour les acides nucléiques (**Annexe 06**). Une courbe d'étalonnage est réalisée pour sélectionner les fractions qui possèdent une concentration en protéines élevées (le cas des pics les plus élevés), qui seront par la suite soumis à un test d'hémagglutination.

➤ IV-8-3 Test d'hémagglutination après déssalage

Ce test a pour but de mettre en évidence la présence des lectines dans les fractions élues qui présentent une forte concentration en protéines.

D'abord on dépose 50 µl de tampon PBS et 50 µl de chaque fraction choisie dans chaque deux puits de la microplaque, ensuite 50 µl de sang de lapin sont ajoutées. Un seul puits de la microplaque a été réservé pour le témoin négatif contenant uniquement 50 µl de tampon et 50 µl d'hématies. La lecture des résultats a été effectuée à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

Les fractions qui révèlent la présence de lectines feront l'objet d'une électrophorèse.

IV-9 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

C'est une technique réalisée sur un gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Elle a pour objectif d'analyser la pureté des fractions ayant donné une forte agglutination, déterminer les fractions contenant la protéine recherchée et estimer la masse moléculaire de nos protéines.

Cette méthode est dénaturante, elle dissocie les complexes protéiques non-covalents, et donc permet une analyse et une séparation des protéines en fonction de la masse moléculaire de leurs chaînes peptidiques.

▪ IV-9-1 Technique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

A- Préparation de l'échantillon

D'abord les protéines sont incubés à 65°C dans une solution d'extraction spécifique aux protéines contenant le Tris HCl d'un pH de 6,8 ; bleu de bromophénol ; glycérol ; SDS (détergeant fort qui permet de procurer une charge nette négative aux protéines) ; et le β mercaptoéthanol (agent réducteur qui coupe les ponts disulfures et transforme les protéines sous forme d'une chaîne peptidique monomérique). (**Annexe 07**)

B- Préparation des moules d'électrophorèse

Deux types de gels sont utilisés : Le premier gel qui a été coulé dans le moule de l'électrophorèse s'agit d'un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation des protéines en fonction de leur tailles appelé gel de séparation avec un pH : 8,8 (**Annexe 08**), suivi d'un dépôt de gel de concentration (stacking gel) avec un pH de 6,8 (**Annexe 09**) moins dense permettant de concentrer l'échantillon avant d'arriver dans la partie

de séparation et retenir les impuretés, ce qui permet une bonne séparation et par conséquent l'apparition des bandes de protéines bien focalisés.

Les deux gels sont coulés entre deux plaques de verre séparés par un espaceur fixés sur un support, un peigne est enchâssé entre ces plaques. Après la polymérisation du gel, le peigne est retiré doucement formant ainsi des puits dans lesquels on dépose les échantillons.

C- Dépôt des échantillons et révélation de leur migration

Les échantillons des protéines dénaturés sont déposés dans les puits du gel à raison de 50 ul par puits.

Après le dépôt des échantillons, les plaques de verre contenant le gel sont placées dans une cuve d'électrophorèse contenant un tampon Tris (pH= 8,8) d'électrophorèse conducteur la migration est effectuée sous l'action d'un champ électrique de 29,5 mA pendant une nuit.

Après la migration le gel est démoulé, les protéines sont révélées par une coloration avec le bleu de coomassie (**Annexe 10**). Après une nuit, une décoloration est faite avec l'eau de robinet à maintes reprises.

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa.

Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électrophorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad (Précision plus, proteinunstained, Biorad).

IV-10 Lyophilisation

C'est une technique qui déshydrate des extraits initialement liquide et les transforme en poudre (lyophilisat) dans des conditions de basse température et sous vide.

IV-10-1 Technique

Différents volumes d'échantillon (champignon sec *Lepistaseava*) ont été tout d'abord ajoutés dans des boîtes de pétri en verre, puis mis au congélateur pendant 24h avant de les placer au lyophilisateur. Le lyophilisat obtenu est testé sur des hématies du lapin 3%.

IV-11 Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon « *Lepistaseava* » chez les rats Wistar

Matériels et méthodes

Pour cette étude nous avons suivi la technique décrite par (Agbonob et al, 2001) modifiée.

Afin d'estimer le volume du pied des rats, nous avons utilisé le dispositif de (Bhatt et al, 1977) modifié.

L'objectif de ce travail se concentre sur l'étude de l'effet anti-inflammatoire des lectines partiellement purifiées extraites à partir du champignon pied violet « *Lepistaseava* » sur l'inflammation produite par le formaldéhyde afin d'évaluer et de valoriser l'utilisation de ce champignon.

IV-11-1 Matériels biologique et condition d'élevage

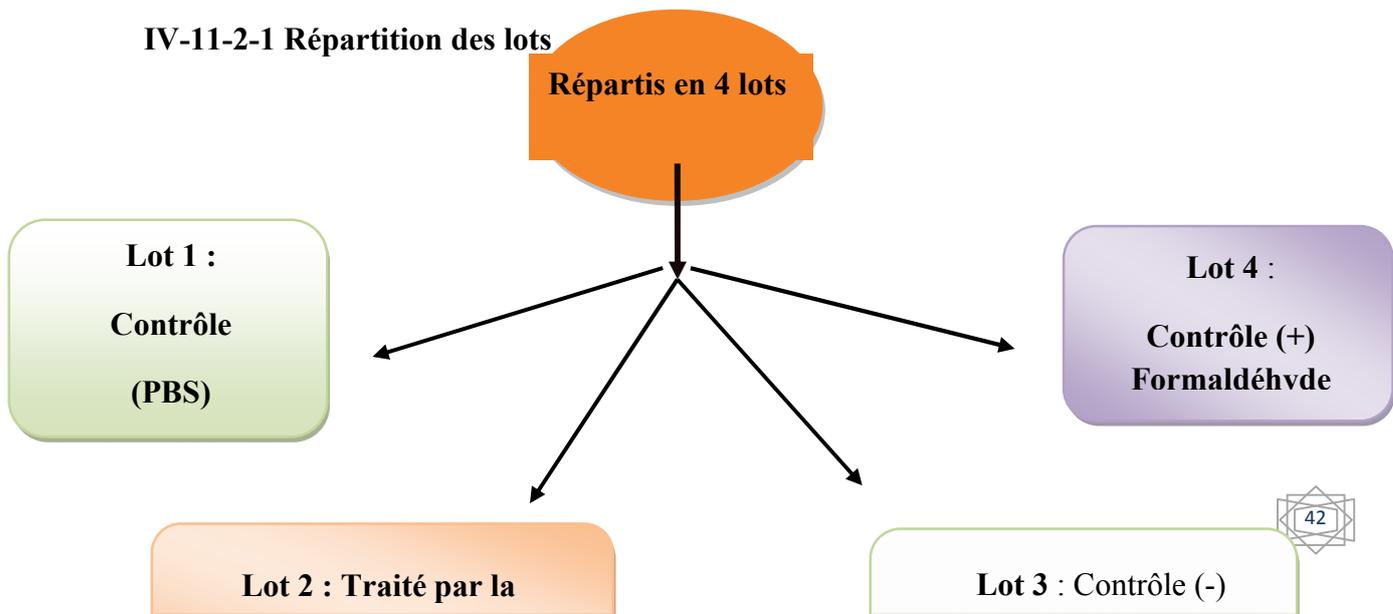
Nous avons travaillé sur 12 rats blancs de la souche *Wistar* (Photo 01), provenant de l'institut de pharmacie Constantine. Agés de 2 mois, d'un poids vif moyen de 200g. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation qui a duré environ deux mois, aux conditions de l'animalerie de ChaabatRessas l'université des frères Mentouri 1 Constantine. A température moyenne ou égale à 24°C, les animaux reçoivent de la nourriture et de l'eau à volonté. Leur alimentation est composée de maïs (48%), blé (42%), poisson (22%), huile d'arachide (5%) et un supplément de sels minéraux et de vitamines.



Photo 01 : Rats *Wister* utilisés dans l'étude des propriétés anti-inflammatoire.

IV-11-2 Induction de l'inflammation par le formaldéhyde

IV-11-2-1 Répartition des lots



L'étude est réalisée sur 12 rats privé de nourriture pendant 24H et répartis en 4 lots pendant une journée :

- **Lot 1** : Témoin, comprend 2 rats qui ont reçu uniquement une seule injection de tampon PBS.
- **Lot 2** : Traité, contient 4 rats qui ont été traité par la lectine + le formaldéhyde.
- **Lot 3** : Contrôle (-), comprend 3 rats injectés par du diclofénac + formaldéhyde.
- **Lot 4** : Contrôle (+), comprend 3 rats injectés par du formaldéhyde.

IV-11-2-2 Induction et détermination du volume de l'œdème

30 minutes avant d'induire l'œdème, on injecte les rats traité du deuxième lot par une injection intra péritonéale la lectine du champignon *Lepistaseava*(**Photo02**),une fois le temps requis on provoque l'œdème par une injection dans l'aponévrose de la plante du pied des rats par du formaldéhyde 4% (**Photo 03**). Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 minutes. Le tampon (PBS) est utilisé comme produit de référence à la dose de 1ml et sera injecté uniquement pour les rats du lot 1 témoin.



Photo 03 : Injection dans l'aponévrose **Photo 02** : Injection intra péritonéal.

Plantaire du pied.

Matériels et méthodes

Dans le lot 3 qui sert de contrôle négatif les rats ont reçu le formaldéhyde ; trente minute après l'injection du Diclofénac avec une concentration de (10 mg /2 ml tampon PBS), ce dernier est un anti-inflammatoire utilisé comme référence à notre lectine, les mesures de l'inflammation sont effectuées à 30 ; 60 ; 90 ; 120 minutes.

Le lot 4 qui sert de contrôle positif reçoit une seule injection du formaldéhyde 4% dans l'aponévrose de la plante du pied.

Le volume du pied est évalué par son immersion dans un tube conique gradué, cela provoque une augmentation du niveau d'eau. Le volume du pied correspond à la quantité d'eau déplacée lu sur le tube conique. **(Photo 04)**

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

$$VT = Vt - V_0$$

-**V₀** : Le volume initial du pied.

-**V_t** : Le volume du pied au temps t.

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

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (VT_f - V_{ta}) / VT_f$$

-**VT_f** : Le volume de l'œdème chez les rats témoins ayant reçu uniquement le formaldéhyde.

-**VT_a** : Le volume de l'œdème chez les rats traités avec les extraits de *Lepistaseava*.



Photo 04: Mesure de l'œdème du pied du rat

✚ Composition des lots

Tableau 16: la composition des lots et les volumes des substances injectées.

				Volume injectée μL
Lot 01	Témoin	Tampon PBS	Rat 1	1000
			Rat 2	1000
Lot 02	Traité	Lectine+ formaldéhyde	Rat 1	98 + 25
			Rat 2	98 + 25
			Rat 3	98 + 25
			Rat 4	96,4 + 25
Lot 03	Contrôle -	Diclofénac+ formaldéhyde	Rat 1	99,6 + 25
			Rat 2	100,8 + 25
			Rat 3	102 + 25
Lot 04	Contrôle +	Formaldéhyde	Rat 1	25
			Rat 2	25
			Rat 3	25

Après l'inflammation on effectue un prélèvement oculaire pour chaque rat (**Photo 05**), le sang est déposé dans des tubes hépariné afin d'éviter la coagulation du sang et étiqueté, ensuite il a été soumis à une centrifugation de 3000 tours/min pendant 10 minutes, le surnageant qui est le

Matériels et méthodes

sérum est récupéré et subira par la suite un dosage de la protéine C réactive (CRP), cette dernière sert de marqueur biologique dans le cas des réactions inflammatoires.



Photo 05 : Prélèvement oculaire de l'œil du rat.

V- Résultats et discussion

V-1 Dosage des protéines

Les absorbances sont mesurées pour les trois échantillons (champignon frais, champignon sec et le gland du chêne vert) aux longueurs d'onde $\lambda = 280\text{nm}$ pour les protéines et $\lambda = 260\text{nm}$ pour les acides nucléiques qui pourraient contaminer nos solutions et donc fausser les résultats. Le calcul des concentrations a été effectué selon la méthode de Warburg et Christian avec l'équation ci-dessous.

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

Le calcul des concentrations est mentionné dans le tableau ci-dessous :

Tableau 17: Absorbance des protéines à 280nm et 260nm et leurs concentrations.

Echantillon	Culot et surnageant	Absorbance à 280nm	Absorbance à 260nm	Concentration (mg/ml)
Champignon frais	C1	0,281	0,340	1,7715
	S1	0,267	0,362	2,7746
	C2	0,396	0,614	1,4716
	S2	0,255	0,383	2,0834
	C3	0,681	0,792	18,1452
	S3	0,333	0,414	4,0302
Chêne	C'1	0,369	0,454	181,528
	S'1	0,376	0,454	190,208
	C'2	0,509	0,773	40,294
	S'2	0,551	0,821	69,027
	C'3	0,379	0,574	30,242
	S'3	0,663	0,964	162,2555
Champignon sec	C''1	0,841	0,893	10,88
	S''1	0,206	0,411	3,08

Résultats et discussion

A partir des résultats de concentration des protéines mentionnées dans le tableau, les surnageants 1 et culot 1 de chaque échantillon présentent des concentrations en protéine relativement appréciable, plus élevées pour le chêne et pour le champignon sec que pour le champignon frais.

Afin d'éclater plus de cellules et d'en extraire le maximum de leur contenu plus particulièrement la protéine recherchée qui est la lectine, on a soumis les surnageants 1 et le culot 1 du champignon frais « *Lepistaseava* » et du gland du chêne vert « *Quercus suber* » uniquement à une deuxième ultra-centrifugation à 13000 tours/minute pendant 30 minutes. Tandis que le surnageant et culot 1 du champignon sec ne subissent pas une deuxième centrifugation, ils ont été mélangés pour donner un homogénat appelé H qui ensuite sera soumis à un dosage de protéine ainsi qu'un test d'hémagglutination et sa limite, et par la suite être lyophilisé pour faire l'objet de l'étude des propriétés anti-inflammatoires chez les rats.

Après la deuxième et dernière ultra-centrifugation qui a résulté le surnageant 2 et culot 2 à partir du culot 1 et le surnageant 3 et le culot 3 à partir du surnageant 1 pour chaque échantillon, on remarque que la concentration en protéine du chêne est toujours plus élevée par rapport à celle du champignon frais. Un test d'hémagglutination a été réalisé afin de confirmer que ces protéines sont effectivement des lectines.

V-2 Teste d'hémagglutination

➤ V-2-1 Test d'hémagglutination réalisé après fractionnement des protéines

Après chaque centrifugation de chaque échantillon les fractions obtenus (culot et surnageant) sont soumis tout d'abord à un dosage de protéines suivi d'un teste d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence des lectines. Les résultats sont mentionnés dans le **tableau 18**.

Tableau 18: résultats du test d'hémagglutination après première centrifugation

		Surnageant 1	Culot 1	Témoin
Champignon frais	Photo			
	Lecture	+++	+++	-
Champignon sec	Photo			
	Lecture	+++	+++	-
Gland du chêne vert	Photo			

Résultats et discussion

- (+++): Très forte agglutination
 (++) : Forte agglutination
 (+) : Faible agglutination
 (-) : Absence agglutination

Les résultats obtenus montrent que les surnageants et les culots des trois échantillons ont donné une forte activité hémagglutinante vis-à-vis les hématies du lapin. et donc il y'a une hémagglutination positive, ces résultats nous confirme la présence de notre protéine cible qui est la lectine. Cette dernière réunit les érythrocytes de manière à former une masse compacte. La lectine permet donc la formation d'un réseau entre elles et les hématies.

Dans le cas contraire, lorsque les lectines sont absentes les érythrocytes placés dans un puits sédimente naturellement et conduit à un dépôt de globules rouge au fond du puits et forme un point rouge dense comme le montre le témoin. Ces Résultats sont semblables à ceux des lectines extraites à partir 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'hématies de lapin (Necibet *al*, 2014) par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que *Sinapis alba* et *Brassicafruticulosa*(Deekshaet *al*., 2015).

❖ Après la deuxième centrifugation

Tableau 19: Résultats du test d'hémagglutination après deuxième centrifugation

	Champignon frais		Chêne		Témoin	
	Photo	Lecture	Photo	Lecture	Photo	Lecture
Surnageant 2		+++		+++		-
Culot 2		+++		+++		-
Surnageant 3		+++		+++		-
Culot 3		+++		+++		-

- (+++): Très forte agglutination
 (++) : Forte agglutination
 (+) : Faible agglutination
 (-) : Absence agglutination

Les résultats obtenus démontrent clairement le pouvoir agglutinant de nos lectines qui est réellement très important ce qui a conduit à l'hémagglutination des érythrocytes par les différentes fractions contenant les lectines obtenus après la deuxième centrifugation.

➤ V-2-2 Test de la limite d'hémagglutination

L'expression de la limite d'hémagglutination s'effectue en fonction du rapport de dilution pour lequel une hémagglutination est toujours visible. L'unité de l'hémagglutination (UH) est définie comme étant le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Les résultats de ce test sont mentionnés dans les tableaux ci-dessous.

❖ Champignon frais « *Lepistaseava* »

Tableau 20 : Test de la limite d'hémagglutination des fractions du champignon frais obtenues après les différentes centrifugations.

Dilution		1/2	1/4	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192
S1	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
C1	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+/-	-	-	-
S2	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
C2	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+/-	-	-	-
S3	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	++	++	++	+/-	-	-	-	-	-
C3	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Témoin													
	Photo												
	Lecture	-											

Les résultats mentionnés sur le tableau mettent en évidence l'activité hémagglutinine pour les érythrocytes du lapin en présence de lectines. Elle est plus forte pour les culots C2 et C3 jusqu'au 5ème puits avec respectivement une concentration en $\mu\text{g/ml}$ (22 ;567). Concernant le C1 elle est plus forte à partir du premier puits jusqu'au 3ème correspondant à une concentration de $110\mu\text{g/ml}$.

Résultats et discussion

L'agglutination des hématies commence à diminuer à partir du 4^{ème} puits pour les C1 et disparaît au niveau du 9^{ème} puits avec une concentration de **1,72 UH**.

En ce qui concerne la disparition de l'activité hémagglutinine pour les C2 et C3 qui correspond respectivement à des dilutions de 1/1024 et 1/128 avec des concentrations $\mu\text{g/ml}$ respectives de **(0,71 ; 283)**.

Concernant les surnageant, on observe qu'il y'a une forte hémagglutination également, très forte pour le S1 à partir du premier jusqu'au 5^{ème} puits puis diminue dans le 7^{ème} puits et disparaît dans le 8^{ème} puits avec une concentration de **2,7 $\mu\text{g/ml}$** . Pour le S2 elle est très forte dans le premier au 6^{ème} et commence à diminuer jusqu'au 8^{ème} puits avec une concentration de **2,03 $\mu\text{g/ml}$** , pour le S3 elle est très forte dans les 3 premiers puits ensuite elle commence à disparaître progressivement à partir du 4^{ème} puits jusqu'à dernier avec une concentration de **251 $\mu\text{g/ml}$** .

❖ Champignon sec « *Lepistaseava* »

Tableau 21 : Test de la limite d'hémagglutination des fractions du champignon sec obtenues après les différentes centrifugations.

Dilution		1/2	1/4	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/80192
S	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-

Témoin	Photo	
	Lecture	-

A partir des résultats ci-dessus on observe une très forte agglutination commençant du premier jusqu'au 6^{ème} puits pour le surnageant, qui disparaît à partir du 8^{ème} avec une concentration de **12,03 $\mu\text{g/ml}$** . Pour les culots elle est très forte uniquement dans les 5 premiers puits, après ce dernier elle n'est plus observée à partir du 6^{ème} puits qui correspond à une concentration de **170 $\mu\text{g/ml}$** .

disparaît progressivement à partir du 3^{ème} puits correspondant à une concentration de **3780 µg/ml**.

Les résultats du dosage des protéines ainsi que les tests d'hémagglutination montrent que nos différentes fractions sont riches en lectine, et donc cela nous a guidé à mélanger le S 2 et S 3 du champignon frais qui a abouti à un homogénat appelé S4, et le C2 avec le C3 qui a donné un homogénat le C4. Même chose faite pour le gland du chêne vert dont on a obtenu un S'4 à partir du S'2 et S'3, et un C'4 provenant du mélange de C'2 et du C'3. Cela est effectué fin d'enrichir la solution de chaque échantillon en lectine.

Les quatre homogénats obtenus subiront un dosage de protéine suivi d'un test de la limite d'hémagglutination.

❖ Dosage des protéines des homogénats

Champignon frais « *Lepistaseava* »

Tableau 23: Absorbance des protéines des homogénats du Champignon frais à 280nm et 260nm et leurs concentrations

	Absorbance		Concentration (mg/ml)
	260nm	280nm	
Surnageant 4	0,395	0,480	4,949
Culot 4	0, 650	0, 780	16,58

Champignon sec « *Lepistaseava* »

Tableau 24: Absorbance des protéines des homogénats du Champignon sec à 280nm et 260nm et leurs concentrations.

	Absorbance		Concentration (mg/ml)
	260nm	280nm	
Homogénat	0,226	0,159	26,141

➤ Gland du chêne vert « *Quercus suber* »

Tableau 25 : Absorbance des protéines des homogénats du gland du chêne à 280nm et 260nm et leurs concentrations.

	Absorbance		Concentration (mg/ml)
	260nm	280nm	
Surnageant '4	0,330	0,420	153,84
Culot'4	0,501	0,769	38,422

➤ Test de la limite des homogénats

Champignon frais

Tableau 26: Test de la limite d'hémagglutination des homogénats du champignon frais.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/1048	1/4096		
S4	Photo													
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	
C4	Photo													
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	
			Témoin	Photo										
				Lecture	-									

Les résultats contenu dans le tableau démontrent que le surnageant et le culot de l'homogénat du champignon frais « *Lepistaseava* » possèdent une très forte agglutination des hématies du lapin à partir du 1^{er} jusqu'au 6^{ème} puits qui s'absente à partir du 7^{ème} puits correspondant à une concentration de **38,6µg/ml** pour le S4. Et à partir du 1^{er} jusqu'au 8^{ème} il y'a une très forte hémagglutination pour le C4 qui commence à disparaître à partir du 9^{ème} puits avec une concentration de **32,3 µg/ml**.

➤ Gland du chêne vert

Tableau 27 : Test de la limite d'hémagglutination des homogénats du Gland du chêne vert.

Dilution		½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/12048	1/4096
S4	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
C4	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
				Témoin	Photo								
					Lecture	-							

Les résultats que montre le tableau ci-dessus montrent qu'il y'a une très forte agglutination des hématies par les lectines présente dans le S4 du gland du chêne vert qui commence du 1^{er} jusqu'au 6^{ème} puits (dilution 1/64) correspondant à une concentration de **403 µg/ml** et disparaît ensuite. Pour le C4 elle est très forte qu'au niveau du 1^{er} au 7^{ème} puits sa concentration est de **300µg/ml**.

Champignon sec

Tableau 28: Test de la limite d'hémagglutination des homogénats du champignon sec.

Dilution		½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/12048	1/4096
H	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-
				Témoin	Photo								
					Lecture	-							

Les résultats démontrent que l'homogénat du champignon sec présente une très forte activité commençant du 1^{er} au 6^{ème} puits correspondant à une concentration de **408µg/ml**.

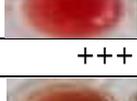
V-2-3 Test de l'effet de température sur l'hémagglutination

Les homogénats des deux échantillons champignon « *Lepistaseava* » et le gland du chênevert « *Quercus suber* » ont été incubé à différents degrés de température (40°C, 60°C, 80°C et 100°C) pendant 45minutes. Une expérience d'hémagglutination a été faite ensuite afin de

Résultats et discussion

constater à quel degrés les lectines présents dans nos échantillons pourraient résister. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 29 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'homogénat du champignon « *Lepistaseava* »

T		Homogénat	Témoin
TA °C	Photo		
	Lecture	+++	---
40°C	Photo		
	Lecture	+++	---
60°C	Photo		
	Lecture	+++	---
80°C	Photo		
	Lecture	+++	---
100°C	Photo		
	Lecture	++	---

(+++): Très forte hémagglutination.

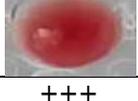
(++): Forte hémagglutination.

(---): Absence d'hémagglutination.

T : Température.

TA : Température ambiante.

Tableau 30: Effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'homogénat du gland du chêne vert « *Quercus suber* »

T		Homogénat	Témoin
TA °C	Photo		
	Lecture	+++	---
40°C	Photo		
	Lecture	+++	---
60°C	Photo		
	Lecture	+++	---

80°C	Photo		
	Lecture	+++	---
100°C	Photo		
	Lecture	++	---

L'activité hémagglutinante de la lectine du champignon « *Lepista seava* » ainsi que celle du gland du chêne vert « *Quercus suber* » n'a pas été influencée par le traitement thermique effectué à des degrés de température croissantes (40°C, 60°C, 80°C, 100°C), cette dernière n'a pas été suffisante pour inactiver carrément l'activité lectinique de nos échantillons. Les résultats observés montrent que nos hémagglutinines ont joué parfaitement leur rôle d'agglutination, cela indique qu'elles sont résistantes à la chaleur et donc elles sont thermorésistantes.

Les extraits de nos deux échantillons contiennent des lectines résistantes à des températures élevées pouvant aller jusqu'à 80°C. On observe qu'il y'a une très forte agglutination des érythrocytes du lapin à 40°C, 60°C et à 80°C et commence à diminuer à 100°C, dans cette dernière notre protéine commence à être dénaturée et perd progressivement son pouvoir hémagglutinant.

▪ Effet de la température sur la limite d'hémagglutination

Cette approche a été effectuée avec les homogénats de nos deux échantillons incubés à 40°C, 60°C, 80°C, et à 100°C, c'est les températures dans lesquelles nos lectines ont résisté.

Tableau 31: Effet de la température sur la limite de l'activité hémagglutinante de l'homogénat du champignon « *Lepista seava* ».

Dilution		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/521	1/1024	1/2048	1/4096
TA	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
40°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
60°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-

Résultats et discussion

80°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
100°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Témoin												
	Photo												
	Lecture	-											

(-) : Absence d'agglutination.

(+++): Très forte agglutination.

(++) : Forte agglutination.

(+) : Faible agglutination.

TA : Température ambiante.

La température ambiante sert de référence afin de comparer l'évaluation de l'effet de la température sur la limite d'hémagglutination à différents degrés croissants.

Les lectines extraites à partir du champignon pied violet « *Lepista seava* » ont montré une thermo-stabilité à des températures élevées allant jusqu'à 100°C avec une concentration de **3267 µg/ml**.

A 40°C, il y'a une présence d'une forte activité hémagglutinante dans les 5 premiers puits qui après diminue et commence à disparaître dans le 6ème puits (dilution 1/64) correspondant à la concentration de : **408 µg/ml**.

A 60°C, il y'a une forte hémagglutination dans le 1^{er}, le deuxième, le troisième et le quatrième puits qui diminue et commence à disparaître dans le 5ème puits (dilution 1/32) correspondant à une concentration de : **816 µg/ml**.

A 80°C, une forte activité hémagglutinante est observée dans les 4 premiers puits qui disparaît à partir du 5ème puits (dilution 1/16) correspondant à une concentration de : **1633 µg/ml**.

A 100°C, les deux premiers puits présentent une forte agglutination des érythrocytes qui commence à diminuer dans le troisième puits et qui diminue totalement au niveau du quatrième (dilution 1/8) avec une concentration de : **3267 µg/ml**.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les lectines extraites à partir du champignon pied violet « *Lepista saeva* » peuvent résister à une température pouvant aller jusqu'à 100°C. Ces résultats sont semblables aux études menées sur les lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* et les racines des plantes *Cyperus rotundus*, *Pistacia Lentiscus*

Résultats et discussion

et *Ruta graveolens* qui elles aussi résistent à des degrés de température allant jusqu'à 100°C (Necib et al, 2015).

Tableau 32: Effet de la température sur la limite de l'activité hémagglutinante de l'homogénat du gland du chêne vert « *Quercus suber* ».

Dilution		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/521	1/1024	1/2048	1/4096
TA	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
40°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
60°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
80°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	--	-	-	-	-	-	-	-
100°C	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

Témoin	Photo	
	Lecture	-

(-) : Absence d'agglutination.

(+++): Très forte agglutination.

(++) : Forte agglutination.

(+) : Faible agglutination.

TA : Température ambiante.

Pour ce test on a choisi d'évaluer la résistance des lectines présentes dans l'homogénat C4.

La température ambiante sert de référence afin de comparer l'évaluation de l'effet de la température sur la limite d'hémagglutination à différents degrés croissants. Dans cette dernière il y'a une très forte agglutination dans les 4 premiers puits et qui commencent à diminuer dans le 5ème puits (dilution 1/32) correspondant à une concentration de : **1200µg/ml**, et disparaît après ce dernier.

D'après les résultats l'extrait de chêne vert « *Quercus suber* » a montré une très forte agglutination qui a diminué d'un seul puits par rapport à la température ambiante. Et donc la

Résultats et discussion

lectine extraite à partir du chêne vert « *Quercus suber* » n'a pas été influencée par la chaleur à des degrés élevés et reste stable tout au long de l'incubation.

La lectine du « *Quercus suber* » est donc thermorésistante.

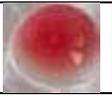
III-2-4 Effet du pH sur le test d'hémagglutination

Une quantité de 1g de poudre de chacun de nos échantillons ont été ajoutés dans des volumes de 4ml de tampon à différents pH, après une macération qui a duré 24H on les a soumis à une centrifugation. Seul le surnageant a fait l'objet de ce test. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 33: Effet du pH sur l'hémagglutination des lectines extraites à partir du champignon pied violet « *Lepista seava* »

pH		2	4	5	9
A	Photo				
	Lecture	+++	+++	+++	+++
Témoin	Photo				
	Lecture	-	-	-	-

Tableau 34: Effet du pH sur l'hémagglutination des lectines extraites à partir du gland du chêne vert « *Quercus suber* »

pH		2	4	5	7	9
A	Photo					
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++
Témoin	Photo					
	Lecture	-	-	-	-	-

(+++): Forte activité hémagglutinante.

(-): Absence totale d'hémagglutination.

pH=2 : Glycine Hcl. pH=4 : Citrate buffer. pH=5 : Sodium acétate

pH=7 : tampon PBS.

pH=9 : Glycine NaOH.

L'activité hémagglutinante de l'extrait du *Quercus suber* reste stable tout au long de la gamme du pH utilisée [2, 4, 5, 7 et pH=9], donc les résultats nous indiquent que notre extrait a résisté aux différentes valeurs de pH.

▪ Effet du pH sur la limite d'hémagglutination

Tableau 35 : Effet du pH sur la limite d'hémagglutination des lectines extraites à partir du champignon pied violet « *Lepista seava* »

Dilution pH	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/521	1/1024	1/2048	1/4096	
2	Photo												
	Lecture	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-
7	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
9	Photo												
	Lecture	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

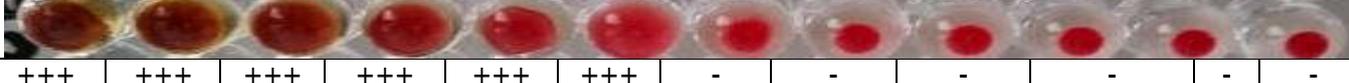
		2	4	5	7	9
Témoin	Photo					
	Lecture	-	-	-	-	-

Les résultats observés démontrent que notre lectine présente des activités hémagglutinante à différents pH allant du milieu acide vers un milieu basique.

D'après les résultats on remarque que notre lectine extraite à partir du champignon « *Lepista seava* » a résisté aux différentes gammes de pH acide ou alcalin. Mais l'activité hémagglutinante diminue dans les deux milieux et reste stable et forte quand le pH est neutre c'est-à-dire équivalent à pH=7. C'est le pH optimal dans lequel l'hémagglutination est optimale.

Résultats et discussion

Tableau 36: Effet du pH sur la limite d'hémagglutination des lectines extraites à partir du gland du chêne vert « *Quercus suber* »

Dilution pH	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/521	1/1024	1/2048	1/4096
2												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
4												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
5												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
7												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
9												
	Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-

		2	4	5	7	9
Témoin	Photo					
	Lecture	-	-	-	-	-

(+++): Forte hémagglutinante.

(-): Absence totale d'hémagglutination.

pH =2 : Glycine Hcl ; pH =4 : Citrate buffer ; pH=5 :Sodium d'acétate ; pH=7 : tampon PBS ; pH=9 : Glycine NaOH.

activité

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, on remarque que la lectine extraite à partir du gland du chêne vert « *Quercus suber* » présentent des activités hémagglutinante relativement forte et stable dans les différentes gammes de pH.

Cette lectine est plus résistante que celle extraite à partir du champignon pied violet « *Lepistaseava* » aux différentes valeurs de pH utilisées.

III-2-5 Test d'hémagglutination sur le système ABO

Ce test permet d'étudier la spécificité des lectines présentes dans nos extraits des deux échantillons à des hématies humaines et d'en trouver un extrait spécifique à un seul groupe et par conséquent, leur utilisation comme un nouveau réactif de groupage, nous avons réalisé le test d'agglutination sur les hématies humaines du système (ABO). Les résultats sont mentionnés sur le tableau.

Tableau 37: Test d'hémagglutination sur le système ABO

E G	Champignon Sec « <i>Lepistaseava</i> »		Gland du chêne vert « <i>Quercus suber</i> »		Témoin	
	Photo	Lecture	Photo	Lecture	Photo	Lecture
A		+++		+++		-
B		+++		+++		-
O		+++		+++		-
AB		+++		+++		-

(+++): Très forte hémagglutination.

(-): Absence d'hémagglutination.

Nos résultats démontrent que les deux homogénats des deux échantillons : Champignon pied violet « *Lepistaseava* » et le gland du chêne vert « *Quercus suber* » agglutinent assez fortement tous les types de groupe sanguins humains, ceci explique que les lectines extraites à partir des deux échantillons possèdent une grande affinité vis-à-vis des globules rouges humains. Nos résultats sont identiques aux études réalisées sur « *Geotrupes stercorarius* » et sur « *Diplotaxis assurgens* et *Raphanus sativus* » qui possèdent la même propriété (Deviet *al.*, 2014 ; Deeksha *et al.*, 2015). Pour cela les lectines extraites à partir de « *Lepistaseava* » et de « *Quercus suber* » peuvent être classées dans la catégorie des lectines qui agglutinent les hématies de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique à un groupe sanguin donné.

Nos résultats indiquent qu'on ne pourra pas utiliser les lectines de « *Lepistaseava* » et de « *Quercus suber* » comme réactif de groupage pour la détermination des groupes ABO.

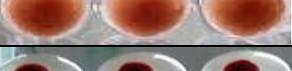
V-3 Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

L'activité hémagglutinante des lectines est inhibée par les glucides qui entrent en compétition avec les hématies afin de gagner les sites de liaisons de la molécule de lectine, ce qui interfère l'attachement de ces dernières sur la structure glucidique présente à la surface des hématies (Daoudi *et al.*, 2014). Afin d'étudier cette propriété et de déterminer la spécificité de nos différents extraits vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de

Résultats et discussion

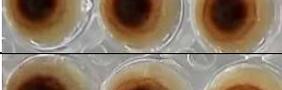
l'hémagglutination en utilisant 9 sucres (mono et dissaccharides) et 4 glycoprotéines. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 38, 39**.

Tableau 38: résultat du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines pour l'échantillons champignon frais « *Lepista seava* » .

Type de sucre	Les noms	Photo	Lecture
Monossacharide	Galactose		---
	Glucose		---
	Glucosamine (Hcl)		---
	Manose		---
	Manitol		---
Dissacharide	Saccharose		---
	Cellobiose		---
	Arabinol		---
	Xylitol		---
Glycoprotéine	BSA		---
	Ovalbumine		---
	Albumine		---
	Caseine		---
Témoin	Tampon + sang		
	Tampon+ sang+lectine		

✚ Chêne

Tableau 39: résultat du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines pour l'échantillon le gland du chêne vert « *Quercus suber* ».

Type de sucre	Les noms	Photo	Lecture
Monossacharide	Galactose		---
	Glucose		---
	Glucosamine (Hcl)		---
	Manose		---
	Manitol		---
Dissacharide	Saccharose		---
	Cellobiose		---
	Arabinol		---
	Xylitol		---
Glycoprotéine	BSA		---
	Ovalbumine		---
	Albumine		---
	Caseine		---
Témoin	Tampon + sang		
	Tampon+ sang+lectine		

Selon les résultats mentionnés dans les deux tableaux, on remarque qu'il y a une absence totale de l'inhibition du test d'hémagglutination par les sucres utilisés, ces derniers n'ont pas influencé l'agglutination des hématies du lapin par nos deux lectines extraites à partir du

Résultats et discussion

champignon « *Lepestista seava* » et du gland du chêne vert « *Quercus suber* », puisqu'ils n'ont aucune affinité envers elles.

V-8Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

On a opéré sur deux extraits sur le gland du chêne vert « *Quercus suber* » et sur le champignon frais « *Lepistaseava* » une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium à deux pourcentages de saturation 50% et 85%, après chaque précipitation on a fait une centrifugation dont on a obtenu :

❖ A partir du champignon

- Trois fractions à partir de l'homogénat S4 (C 50%, C85% et S 85%)
- Trois fractions à partir de l'homogénat C4 (C 50%, C85% et S 85%)

❖ A partir du chêne

- Trois fractions à partir de l'homogénat S'4 (C' 50%, C'85% et S' 85%)
- Trois fractions à partir de l'homogénat C'4 (C' 50%, C'85% et S' 85%)

On a fait passer par la suite toutes ces fractions au test d'hémagglutination afin de pouvoir identifier la fraction qui donne une très forte agglutination.

III-4-1Test de la limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium

Tableau 40: Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium à partir du champignon

H	Dilution Fraction		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/521	1/1024	1/2048	1/4096
S4	C50 %	Photo												
		Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
	C85%	Photo												
		Lecture	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	S85%	Photo												
		Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	C50%	Photo												
		Lecture	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C85%	Photo												
		Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S85%	Photo												
		Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

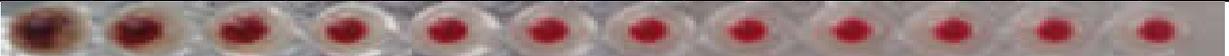
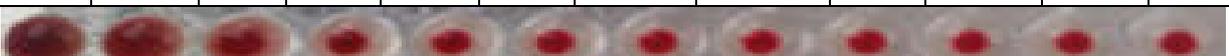
Résultats et discussion

Témoin	Photo	
	Lecture	-

D'après les résultats obtenus on observe que :

- C50% obtenu à partir de l'homogénat S4 : Présente une très forte activité dans les 4 premiers puis ensuite elle disparue.
- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : Activité est très forte dans les 3 premiers puis ensuite elle diminuée jusqu'à la disparition totale a partir du 4^{em} puis.
- S85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : Cette fraction ne présente aucune activité hémagglutinante.
- C50% obtenu à partir de l'homogénat C4 : On observe une agglutination que dans les 3 premiers puis.
- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : Ne montre aucune hémagglutination.
- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : Ne montre aucune hémagglutination.

Tableau 41: Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium à partir du gland du chêne

H	Dilution Fraction		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
S'4	C'50%	Photo												
		Lecture	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C'85%	Photo												
		Lecture	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S85%	Photo												
		Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C'4	C'50%	Photo												
		Lecture	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	C'85%	Photo												
		Lecture	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S'85%	Photo												
		Lecture	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Témoin	Photo												
		Lecture	-											

Les résultats présentés dans le tableau montrent que:

- C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : Présente une très forte activité dans le premier puis, ensuite elle diminuée un peu dans 2^{em} puis et disparate a partir du 3^{em} puis.
- C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : Activité est très forte dans les 2 premiers puis ensuite elle diminuée jusqu'à la disparition totale a partir du 4^{em} puis.
- S'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : Cette fraction ne présente aucune activité hémagglutinante.
- C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : On observe une très forte hémaagglutination que dans les 2 premiers puis ensuite elle diminuée puis disparue a partir du 4^{em} puis.
- C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : Hémagglutination se révèles que dans les 2 premiers puis.
- C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : Présente une hémagglutination dans les 5 premier puis.

III-4-2 Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire

L'objectif de cette étape est la purification partielle des différents échantillons contenant une activité hémagglutinante qu'on a obtenus après la précipitation de nos homogénats est d'en extraire 60 fractions. Toutes les fractions obtenues sont soumises à un dosage des protéines (**annexe 06**) dont les résultats de cette opération sont relatés sur les graphes suivants :

❖ Champignon

- C50% obtenu à partir de l'homogénat C4.

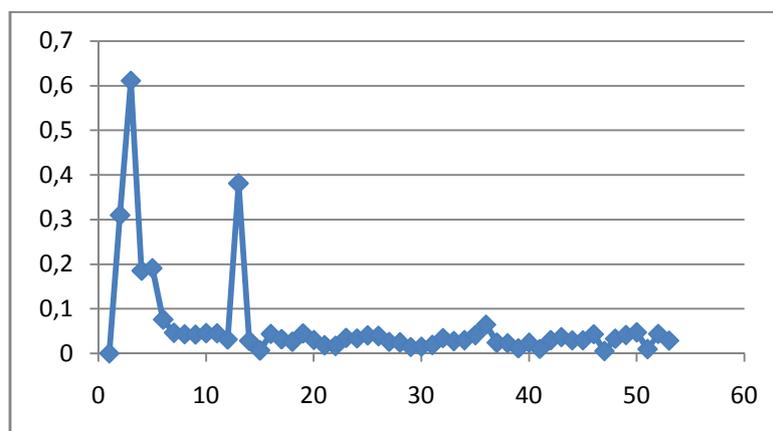


Figure 12 : Courbe représentant l'éluion de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénat C4 sur colonne de sephadex G25.

- C50% obtenu à partir de l'homogénat S4

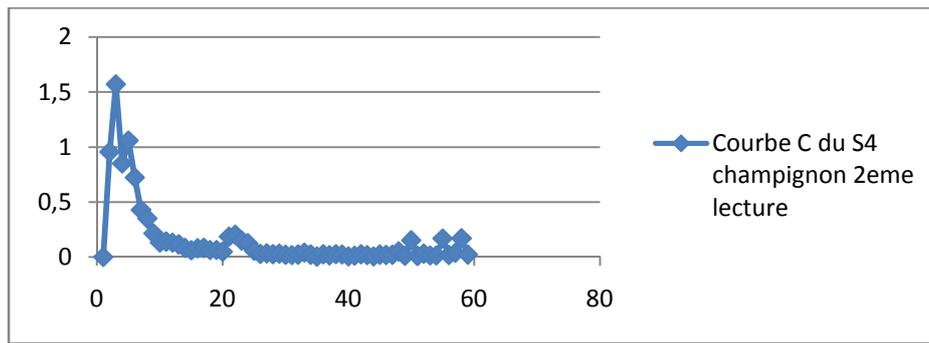


Figure 13: Courbe représentant l'élution de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénat S4 sur colonne de sephadex G25.

- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 (**Figure19**)

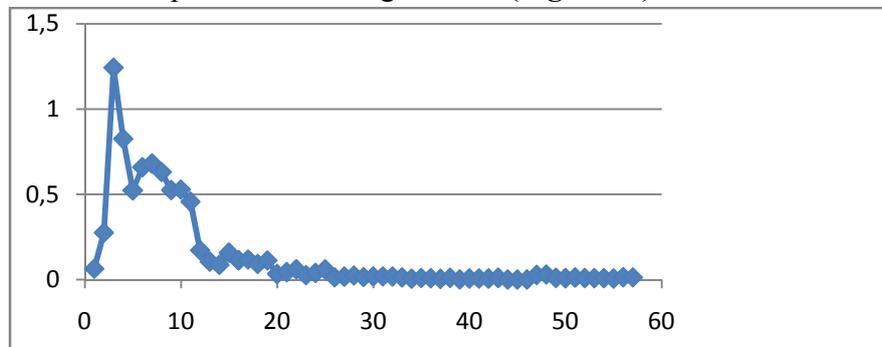


Figure 14 : Courbe représentant l'élution de précipité C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 sur colonne de sephadex G25.

❖ Chêne

- C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4

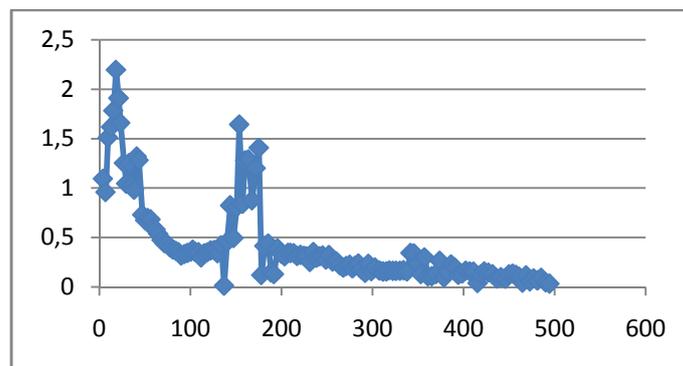


Figure 15: Courbe représentant l'élution de précipitaC'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4 sur colonne de sephadex G25.

➤ C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4

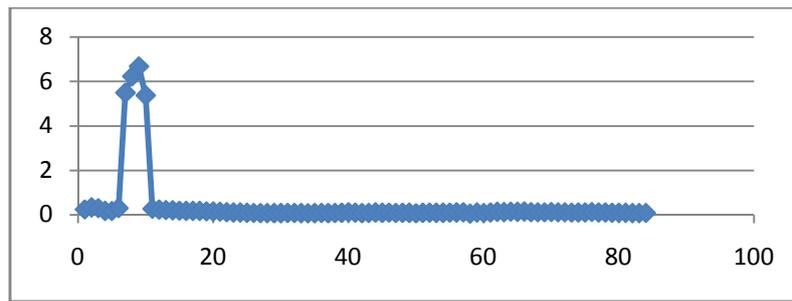


Figure 16 : Courbe représentant l'élution de précipita C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4 sur colonne de sephadex G25.

➤ C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4

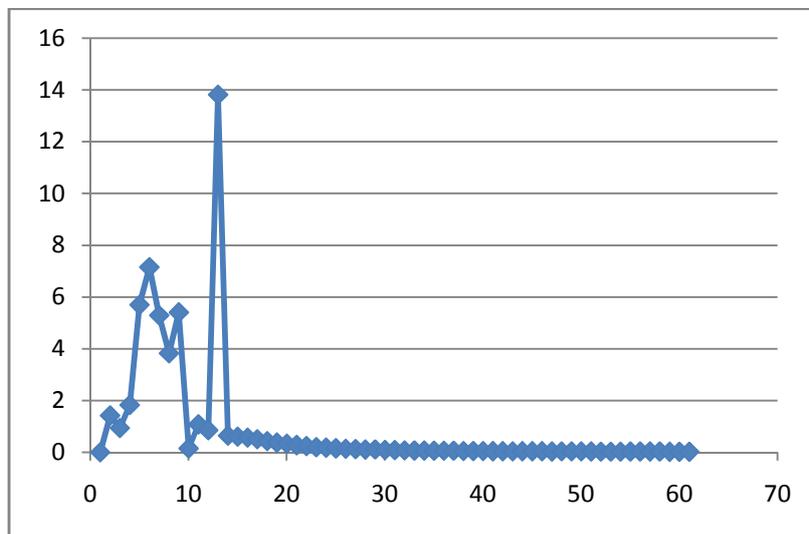


Figure 17: Courbe représentant l'élution de précipita C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 sur colonne de sephadex G25.

➤ C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4

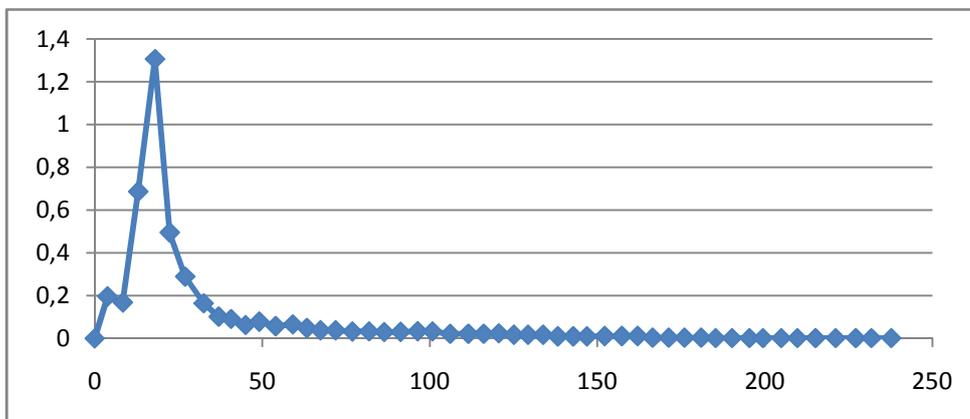


Figure 18: Courbe représentant l'élution de précipita C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 sur colonne de sephadex G25.

- S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4

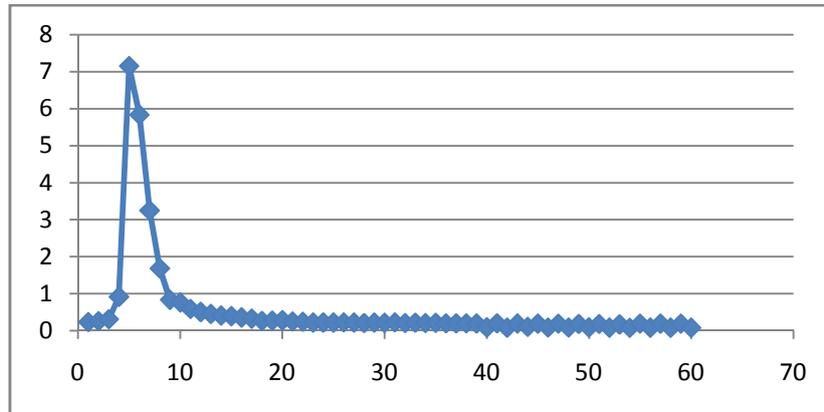


Figure 19 : Courbe représentant l'élution de précipita S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 sur colonne de sephadex G25.

D'après les courbes on remarque qu'on a des pics majeurs pour chaque précipita ; suivant ces pics on a choisis les tubes qui doivent subir le test d'hémagglutination.

✚ Les fractions choisis

❖ Pour le champignon

-C50% obtenu à partir de l'homogénat S4 :du 1^{er} tube jusqu'au 12^{em} et du 21^{em} tubes jusqu'au 59^{em} tube .

- C50% obtenu à partir de l'homogénat C4 :du 1^{er} jusqu'au 7^{em} tubes ainsi que les tubes 12,13,14,et 36.

- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : du 1^{er} jusqu'au 15^{em} tubes.

❖ Pour le chêne :

- C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : du 1^{er} jusqu'au 22^{em} tubes et du 53^{em} tubes jusqu'au 68^{em} tube.

- C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : du 1^{er} jusqu'au 22^{em} tubes et du 53^{em} tubes jusqu'au 60^{em} tube.

- C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : du 1^{er} jusqu'au 15^{em} tubes.

- C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : du 1^{er} jusqu'au 10^{em} tubes.

- S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : du 1^{er} jusqu'au 17^{em} tubes.

✚ Test d'hémagglutination après dessalage

Résultats et discussion

Un teste d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit dans le chapitre précédent afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces fractions, les résultats obtenus sont mentionnés dans les tableaux ci-dessous :

❖ Champignon :

Tableau 42 : Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C50% obtenu à partir de l'homogénat

tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	21	22
lecture	+++	++	+++	-	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-
tube	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	51	52	53	54	55	56	57	58	59					
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Tableau 43: Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C50% obtenu à partir de l'homogénat C4 .

tube	1	2	3	4	5	6	7	12	13	14	36
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

Tableau 44: Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C85% obtenu à partir de l'homogénat S4.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lecture	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

❖ Chêne :

Tableau 45 : Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4.

tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
lecture	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	15	16	17	18	19	20	21	22	53	54	55	56	57	58
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68				
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Tableau 46: Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4.

tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
lecture	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	15	16	17	18	19	20	21	22	53	54	55	56	57	58
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tube	59	60												
lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Tableau 47 : Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lecture	-	-	++	-	-	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++

Tableau 48 : Résultats du test d'hémagglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipité C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 49 : Résultats du test d'héماغglutination des fractions obtenues après purification des protéines de précipita S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4

Tube	3	4	5	6	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Lecture	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Les résultats obtenus ont réellement confirmé la présence des lectines dans plusieurs tubes :

❖ Pour le champignon :

- C50% obtenu à partir de l'homogénat S4 :1, 2, 3, 6, 7, 8, et 9.
- C50% obtenu à partir de l'homogénat C4 :14.
- C85% obtenu à partir de l'homogénat S4 : 3, 4,13, 14, 15, et16.

❖ Pour le chêne :

- C'50% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : 1, 2, 3.
- C'50% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : 1, 2, et 3.
- C'85% obtenu à partir de l'homogénat S'4 : 3 , 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15
- C'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : aucune fraction ne présente une activitéhéماغglutinante.
- S'85% obtenu à partir de l'homogénat C'4 : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,17.

Parmi toutes ces fractions possédant des lectines on a sélectionné les fractions qui ont une forte activité, ces dernières feront par la suite l'objet d'un test de pureté lors de l'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

V-9 Résultats de la lyophilisation

L'homogénat du champignon sec « *Lepistaseava* » a été placé dans des boites de pétri en verre au congélateur pendent 24H.

Nous avons procédé à la lyophilisation de l'extrait afin d'éviter toute contamination et détérioration lors de la conservation, et d'utiliser par la suite le lyophilisat obtenu pour faire l'objet d'une étude des effets anti-inflammatoire des lectines de cet extrait.

On a placé notre boîte de pétri dans le lyophilisateur pendant 4h environ durant 3 jours, on récupère notre boîte et on gratte le lyophilisat, notre lyophilisat ressemble à une pâte collante puisque notre champignon est très riche en sucre. On le conserve dans les boîtes de pétri au congélateur

V-10 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium de chaque échantillon nous a donné un profil électrophorétique (électrophorégramme), la lecture de ce dernier permet de révéler le mouvement des bandes qui sont apparues en estimant les distances parcourues par chacune d'entre 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 marqueur de tailles de poids moléculaire connu (Précision Plus, protéine non colorée, Biorad).

Les échantillons soumis à l'électrophorèse sont les fractions obtenus après dessalage ayant montré la présence de lectines pour chaque échantillon (champignon frais et gland du chêne vert) ainsi que leur extrait brut respectives (S1 et C1), et (C'1). Leurs concentrations sont reprises dans le tableau 22.

Tableau 50: Concentrations des fractions des deux échantillons soumis à l'électrophorèse

	N° de puits	N° du tube	Concentration [P] mg/ml	Volume d'élution ml
Champignon frais <i>Lepistaseava</i>	P1	C1	3,08	
	P2	S1	10,88	
	P3	6	0,428	12,2
	P4	7	0,34993	15,5
	P5	13	0,10612	56,2
	P6	14	0,08737	60,3
	P7	16	0,11384	
Gland du chêne vert <i>Quercus</i> <i>suber</i>	P1	C'1	0,226	
	P2	10	1,0762	40.1
	P3	13	0,64292	52
	P4	15	0,35303	61

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a donné le profil électrophorétique suivant :

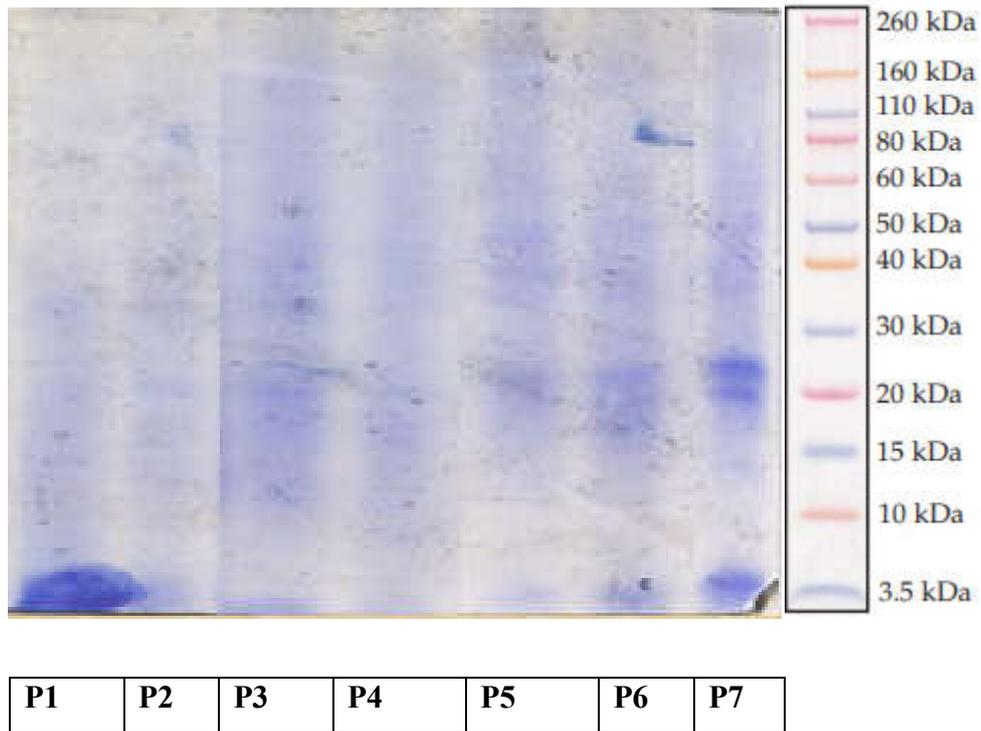


Figure 20: Profil électrophorétique de *Lepistaseava* dans des conditions dénaturantes

La lecture du profil électrophorétique du champignon révèle quatre (04) bandes plus ou moins apparentes chez toutes les fractions retenues après le test d'hémagglutination, avec des poids moléculaires respectivement se situant dans les zones comparativement aux standards moléculaires connus (Precision Plus, Biorad), de 4KDa, 20 KDa , 25KDa , 40 et 50 KDa..

On peut penser à ce stade que l'on se trouve en présence de deux lectines différentes avec deux PM différents ; une première lectine avec deux isoenzymes de PM respectivement de PM de 40 à 50 KDa , et une deuxième lectine avec deux isoenzymes de PM situé entre 80 et 100 KDa, et que seule une électrophorèse en conditions non dénaturantes peut nous confirmer le PM réel de ces lectines.

Plusieurs auteurs rapportent que les PM des lectines fongiques sont d'une grande variabilité, et se situent le plus souvent entre 15 KDa et 90 KDa,(**Feroz khan, 2001**).

Quatre sous-unités furent trouvés chez la lectine de « *Pleurocybella porrigens* » (**Suzuki et al., 2009**) et la lectine extraite de « *Agaricus Blazei* »(**Kawagishi et al., 1988**).

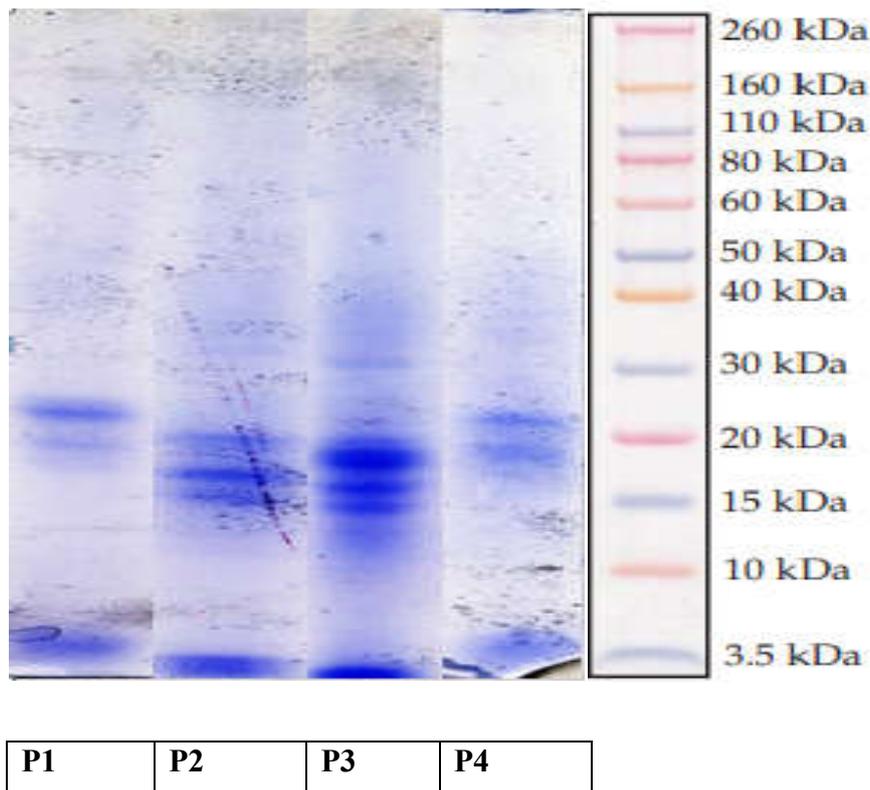


Figure 21: Profil électrophorétique de *Quercus suber* dans des conditions dénaturantes

L'électrophorégramme du gland du chêne vert révèle trois à quatre bandes de PM situés entre 3,5 KDa, 15, 18 et 25 KDa.

Les PM que nous enregistrons à chaque fois se situent dans l'intervalle 15 à 90 KDa avec toutefois une nouveauté concernant la bande de 3,5 KDa qui confirme sa présence une deuxième fois.

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

Des rapports antérieurs ont mis en évidence sur des lectines d'une plante verte «*Ocimum Sanctum* » des sous unités chacune ayant un PM compris entre 25 et 35 KDa, réunies sous formes de dimères ou de tétramères et existant comme plusieurs isoformes partageant des similarités dans les propriétés biochimiques. (**Praveen Kumar Vemuri et al., 2015**).

V-11 Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon « *Lepistaseava* » chez les rats *WISTAR*

Tableau 51 : Variation du volume du pied des rats témoins et traités

Lots	Rats	V à 0 min	V à 30 min	V à 60 min	V à 90 min	V à 120min
Témoin	1	1	1	1	1	1
	2	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Traité	1	1	1,5	1,1	1,2	1,4
	2	0,8	1	1,1	1,2	1,4
	3	0,7	1	1,1	0,7	0,7
	4	1	1,2	1	1	1
Contrôle (+)	1	0,8	1,2	1,1	1,1	0,9
	2	0,5	1,2	1,2	1,2	1,4
	3	0,5	1,4	1,2	1,1	1
Contrôle (-)	1	0,7	1	1,4	1,5	1,5
	2	0,5	1	1,1	1,4	1,5
	3	0,8	0,9	1,2	1,2	1,4

Le volume d'œdème est calculé selon l'équation suivante :

$$VT = Vt - Vo.$$

Tableau 52: Variation du volume de l'œdème chez les rats témoins et traités.

Lots	Rats	V à 30 min	V à 60 min	V à 90 min	V à 120min
Témoin	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
Traité	1	0,5	0,1	0,2	0,4
	2	0,2	0,3	0,4	0,6
	3	0,3	0,4	0	0
	4	0,2	0,2	0	0
Contrôle (+)	1	0,4	0,3	0,3	0,1
	2	0,7	0,7	0,7	0,9
	3	0,9	0,7	0,6	0,5
Contrôle (-)	1	0,3	0,7	0,8	0,8
	2	0,5	0,6	0,9	1
	3	0,1	0,4	0,4	0,6

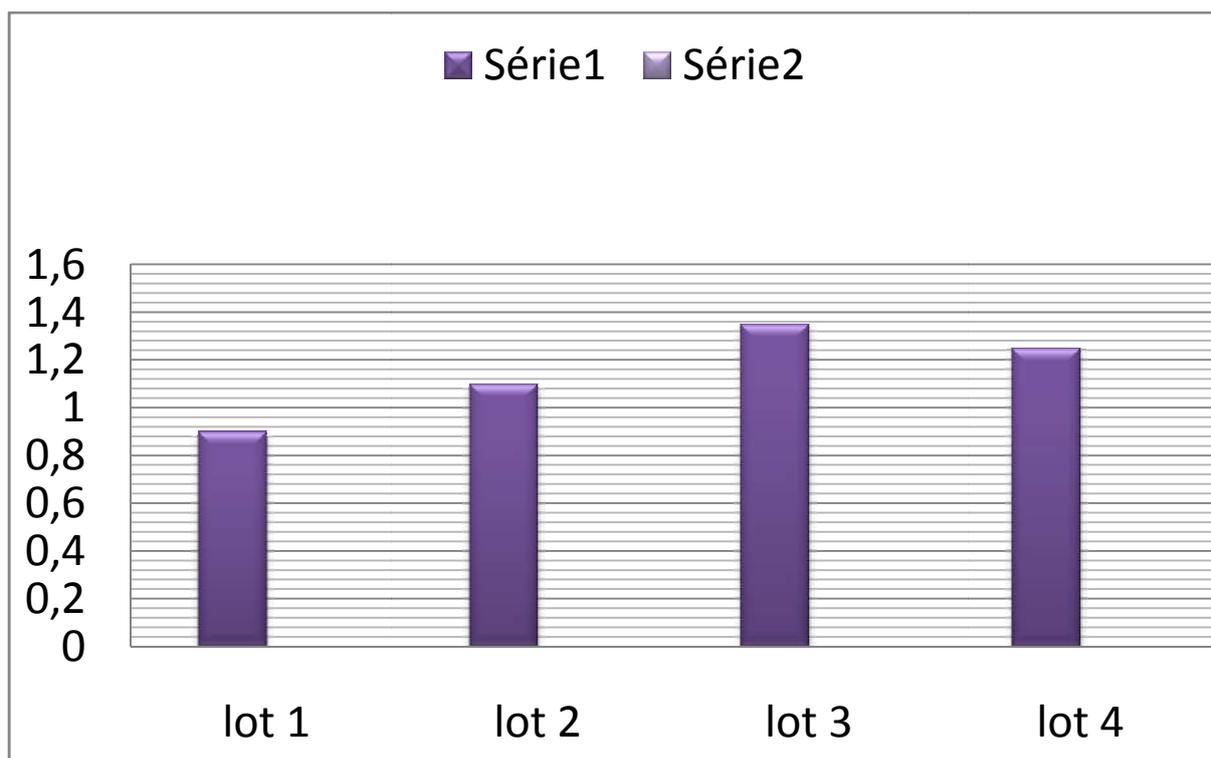


Figure 22: Histogramme de l'évolution de volume de l'œdème en fonction du temps.

Lot 1	Témoin	Tampon PBS
Lot 2	Traité	Lectine + formaldéhyde
Lot 3	Contrôle (+)	Formaldéhyde
Lot 4	Contrôle (-)	Diclofénac + formaldéhyde

Le volume de l'œdème provoqué par le formaldéhyde augmente avec le temps. Après 120 minutes il est de 1,45 ml Cette valeur correspond à un pourcentage d'augmentation de 83,33% par rapport au volume initial du pied.

Pour le lot 4 du Diclofénac + formaldéhyde, le volume de l'œdème augmente également uniformément avec le temps. Il est de 1,2 ml après 120 minutes avec un pourcentage de 29,03%.

Quant au lot traité par la lectine +le formaldéhyde, on remarque qu'il a induit l'inflammation avec le temps de 28,57 % légèrement inférieur à celle du lot du contrôle (-) traité par du diclofénac. L'analyse de l'histogramme montre clairement l'influence engendrée par notre extrait de lectines. Afin de confirmer les résultats on a effectué un dosage de la protéine C réactive.

Résultat du dosage de la CRP :

Tableau 53: Résultats du dosage de la CRP chez les rats

Lot	Rat	résultat	[CRP]en mg/l
1	R1	Négatif	≤ 7
	R2	Négatif	≤ 7
2	R1	Positif	15
	R2	Négatif	≤ 7
	R3	Négatif	≤ 7
	R4	Négatif	≤ 7
3	R1	Positif	15
	R2	Positif	30
	R3	Positif	15
4	R1	Négatif	≤ 7
	R2	Positif	15
	R3	Négatif	≤ 7

D'après les résultats présentés dans le **tableau 54** on a observé que :

La concentration de la protéine C réactif est dans les normes pour tout les rats du 1^{er} lot en absence du formaldéhyde c'est le signe de l'absence de l'inflammation.

Pour le lot traité le test est positif avec une concentration de 15mg/l que chez le rat 1 injecté par une dose de 50mg/kg.

Pour le 3^{em} lot on observe une concentration anormale de la protéine C chez tous les rats en présence du formaldéhyde dont elle atteint 30 mg/l chez le 2^{em} rat.

Pour le 4^{em} lot on observe une inflammation chez le 2^{em} rat avec une concentration de 15mg/l mais elle absente chez les autres rats grâce à l'effet anti-inflammatoire du diclofenac.

Selon ces résultats on constate que notre lectine a un effet anti-inflammatoire a partir d'une dose de 100 mg/kg.

On peut conclure aisément au vu des résultats obtenus que notre lectine extraite à partir du champignon « *Lepista seava* » a réduit commodément le volume de l'oedème.

Notre champignon, donc pourrait avoir un pouvoir anti- inflammatoire.

VI- Conclusion

Les lectines ont une grande importance et occupent une immense place dans le monde de la biologie. On les retrouve également dans divers domaines tel que la biologie cellulaire et moléculaire ainsi que dans l'immunologie. Ces glycoprotéines ont diverses particularités qui doivent être utilisées à profit.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressées à la caractérisation des lectines extraites à partir du champignon « *Lepista seava* » ainsi que celles extraites à partir du gland du chêne vert « *Quercus suber* ».

Nos recherches ont montré que les lectines des deux échantillons possèdent un fort pouvoir d'héماغglutination, peuvent résister à des seuils élevés de température, présentant une thermo-stabilité qui s'étend jusqu'à 100°C. C'est d'ailleurs une des caractéristiques communes et principales de beaucoup de lectines végétales et fongiques.

Des résultats similaires ont été observés à partir de l'algue rouge « *Pterocladia capillacea* » et les racines de plante « *Cyperus rotundus* », « *Pistacia Lenticus* » et « *Ruta graveolens* » qui résiste et pousse à des températures atteignant 100°C (Necib *et al*, 2015).

Les lectines sont des protéines végétales d'origine naturelle présentes en faible concentration dans les parties comestibles en quantité variable dans plusieurs types de légumineuses, dont le soya, les lentilles, les haricots blancs et les haricots rouges. Lorsqu'elles sont consommées en grande quantité, les lectines, également appelées *héماغglutinines*, sont toxiques pour les humains. Cependant, à l'occasion, des rapports font état de symptômes indésirables de courte durée, habituellement après avoir consommé des haricots rouges insuffisamment cuits. Par rapport aux autres types de légumineuses, les haricots rouges crus ou insuffisamment cuits contiennent des concentrations élevées en une certaine lectine, la phytohéماغglutinine.

L'effet du pH n'influence pas l'héماغglutination des hématies de lapin en présence de la molécule agglutinante qui est la lectine celle extraite à partir du champignon « *Lepista seava* » son pH optimale est proche de 7 et d'une zone de pH de 2 à 7 pour celle du gland du chêne « *Quercus suber* ».

Le test d'agglutination effectué sur les hématies humaines du système ABO démontrent que nos lectines extraites des deux échantillons ont provoqué l'agglutination des globules rouges

Conclusion

de tout les groupes sanguins, et donc on conclut qu'elles ne sont pas spécifiques à un groupe sanguin donné. Ces lectines ne peuvent être utilisées comme réactifs de groupage.

De plus, nous avons démontré que les deux lectines extraites du champignon pied violet et du gland du chêne vert n'ont montré aucune affinité vis-à-vis des sucres utilisés (Cellobiose, galactose, BSA, ovalbumine, glucose, saccharose, caséine, glucosamine, xylitol, manose, manitol, arabinose, et albumine). Ces derniers n'ont pas inhibé l'activité hémagglutinante des lectines avec les érythrocytes du lapin.

La plupart des recherches sur les lectines démontrent clairement que ces dernières reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité: le mannose (Man), le galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (**Lis and Sharon 1998**). La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides (**Dam and Brewer 2002**). 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**) ou PA-IIL de « *Pseudomonas aeruginosa* » (**Imberty, et al. 2004**). Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 de monosaccharides tels que l' α -methyl-galactoside et le β -methyl-galactoside.

La purification partielle par le biais d'une chromatographie sur gel d'exclusion moléculaire Sephadex G25, qui nous sert également de colonne de désalage pour éliminer le sulfate d'ammonium, nous a permis d'obtenir plusieurs profils d'élution dans lesquels sont mis en évidence plusieurs pics d'activités protéiques. Les fractions de chaque pic retenu, après avoir fait l'objet d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, afin d'estimer leur degré de pureté, ont révélé chacune un profil électrophorétique plus ou moins similaires à d'autres lectines relatées dans la bibliographie.

Ce profil réalisé dans des conditions dénaturantes révéla l'existence de bandes protéiques dont les PM se situent dans un intervalle compris entre 15 et 90 KDa avec une légère différence pour une bande protéique de 3.5KDa.

Conclusion

Les tests anti-inflammatoires réalisés à partir du champignon sec « *Lepista seava* » ont mis en évidence une diminution considérable du volume de l'œdème provoqué par l'administration du formaldéhyde à 4% comparativement au diclofenac à 10mg. Pour confirmer nos résultats on s'est tourné vers un dosage de la protéine C réactive, cette dernière a démontré la diminution de l'inflammation pour les rats traité avec notre lectine, ceci explique clairement que notre lectine a un effet anti-inflammatoire avec une dose efficace débutant à 100 mg/kg. Pour éviter toutes ambiguïtés, nous estimons qu'il va falloir procéder à d'autres analyses, avec des concentrations différentes en anti-inflammatoires, pour pouvoir confirmer que nos lectines sont meilleures.

➤ Perspectives

Les travaux que nous avons effectués sont une motivation à de nombreuses autres perspectives, la poursuite des recherches sur ces lectines impliquerait l'utilisation de plusieurs autres approches d'analyse et méthodes biochimiques permettant de donner une très bonne caractérisation et purification de ces protéines.

Plusieurs axes doivent être menés, par exemple une électrophorèse sans agent dénaturant pour déterminer le poids moléculaire ; utiliser d'autres sucres pour déterminer leur spécificité et surtout pour procéder à une chromatographie d'affinité afin de purifier totalement ces lectines. Cette recherche mériterait également d'être étoffée par une étude cristallographique en vue de déterminer la structure en 3D des lectines et les comparer également avec d'autres structures déjà connues.

Les résultats de ces recherches pourraient également être poursuivis par des études sur leur impact sur les plans immunologiques, anticancéreux, antidiabétiques, antioxydants et antiviraux.

Les lectines de champignon et du gland du chêne sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée

Références bibliographiques

A

ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A. (2014). The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461

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

Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014) .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*. 172, 672–686.

B

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

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

BENNET HJ AND ROBERTS IS. 2005. Identification of a new sialic acid-binding protein in *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 163-169

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

BOUCHER. C. (2008). Une brève histoire des idées de Galilée à Einstein. Fides, 2008. Pp: 94-95.

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

BIRD G.W.G (1974). Plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte anomalies. Ann. N.Y. Acad. Sci ; 234,129.

C

Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de Langerhans : la langerine. Chimie et sciences du vivant. Université de Grenoble. 2012. pp 63-64.

D

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

DAOUDI. A., ABDEL-SATTER. E., AARAB. L. The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, 2014. 3(1): 56-64.

DEEKSHA. M., SANGHA. K., KHURANA. D. S., KAUR. G., BALA. M., SINGH. B. Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch*, 2015. 3(1) : 20-24.

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

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.

E

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

ETZLER, M. E., (1985). Plant lectins: Molecular and Biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:209-234.

F

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

Feroz Khan and M. Islam Khan, (2011). The Mushroom lectins show three types of conserved domain in bioinformatics Analysis, *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1 :375-388.

G

Genten F, Terwinghe E, Danguy A. (2010). Illustrée du Poisson. *QUAE* : 17.

Giollant, M., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., and Didier, E. (1993) Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus* - research on the possible involvement of

the fungallecetin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol.*, 101, 513-522.

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

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

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

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

Ghopkins W, Evrard C-M. (2003). *Physiologie Végétale*. DE BOECK, 1ère édition : 104-105.

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

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

Guillot, J., Kanska G., (1997) : Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Ecol.*, 25, 203-230.

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

H

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

HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S. (2013). Lectins : proteins with diverse Application. *J. Appl. PharmSci*, 2013. 31:93-103.

Holec J., Bielich A., Beran M. (2012) : Přehled hub střední Evropy, Academia Praha, 624pp [as *Lepistasaeva* (Fr.) P. D. Orton]

Houls.c (2001). Étude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparente à la jacaline. Institut de pharmacologie et biologie structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France Pp: 11-35.

Hirokazu Kawagishi , Aya Nomura , Takashi Mizuno , Seiya Chiba (1988). Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies.

I

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

J

Jaffe W.G., (1980). Hemagglutinins (Lectins). In Liener I.E., Eds. *Toxic constituents of plant foodstuffs (second edition)*. New York and London : Academic Press. pp.73-102.

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

Jodoin M. (2010). Entre fourchette et baguettes: plaisir et sagesse au menu. *TRAFFORD*: 390.

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

K

Karoline S.A., (2008) : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyosteliumdiscoideum*. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. 4

KAWAMURA. T., OGAWA. Y., AOKI. R., SHIMADA. S. (2014).Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Dermatol. Sci*, 2014. 75 : 159–166.

KENOTH. R. (2001).Thermodynamic and kineticanalysis of porphyrinbinding to *Trichsanthes cucumerinaseedlectin*. *Eur. J. Biochem*, 2001. 268: 5541-5549.

KOCOUREK. J., HOREJSI. V.(1981). Defining a lectin. *Nature*, 1981. 290: 188

KOCOUREK, J.; HOREJSL V., (1983). A note of the recent discussion of definition of the term "Lectin". In T. C. Bog-Hansen, & G. A. Spengler, (Eds). *Lectins: Biology, Biochemistry, ClinicalBiochemistry*. Proceedings of the 5th Lectin Meeting. Vol. 3, Walter de Gruyter Berlin-New York

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

L

Lenka s., Imberty A., Jaroslav,k., (2006). Modelisationmoleculaire des lectines et des glycosyltransferases. thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph 130 fourier. universitegrenoble i – joseph fourier.

LIENER. I., SHARON. N., GOLDSTEIN. J. (1986). The lectins Properties. Functions and Applications in biology and medicine. Academic Press INC. London LID, 1986. Pp 13-24

Lis, H. et Sharon, N. Biological properties of lectins in The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J., Academic Press Inc., 1986. p. 266-293

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

Loris, R., Hamelryck, T., (1998). Bouckaert, J. and Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383, 9-36.

M

Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P et Becker, K. (2007). Plant Secondary Metabolites. *Humana Press*. 1726pp

Mathieu S (2011). Ingénierie de lectines d'invertébrés pour le développement de nouveaux outils de diagnostic en cancérologie.. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université de Grenoble, 2011. Français. <tel-00568846v1>

Merritt, E.A., and Hol, W.G.J. (1995) AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 165-171.

MURDOCK L.L SHADE R.E (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. food. Chem.* 50 (22)6605-6611

MYOSHI M. et Al (1982). The lethal protein from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 28, 255-264.

N

Nachbar .M.S, Oppenheim .J.D.(1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2238 -2345. Naturactive. Bien-être et santé, tout savoir sur les plantes et les huiles essentielles. 75009 Paris : Santecom S.A.S, 2014. 795282 - 03/2013.

Necib Y, Bahi A, 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.

Ng T.B., (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073. Nussenzweig, R. S. (1967) *Exp. Parasit.*, 21, 224

P

Praveen Kumar ,Vemuri, Bhavana Talluri, Ananya Sharma, Geethika Akkala, Vijaya Lakshmi Bodiga. (2015). Isolation and Characterization of a Lactose-Binding Lectin from *Ocimum sanctum*.

PARHAM. P. (2000). Le système immunitaire. De Boeck Université, 2000. p: 340.

Pemberton (1994). Agglutinins from some British higher fungi. *Mycol. Res.*, 98, 277-290

Peumans and Van Damme. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 109:347-352.

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

PUSZTAI, A.; CROY, R. R. D.; GRANT, G. & STEWART, J. (1983). Seed lectins, distribution, location and biochemical role. In J. Daussant; J. Mosse, & J. Vaughan, (Eds). *Seed Proteins*, Academic Press, New York

R

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

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

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

RENATA. O. D., LEANDRO. S. M., LUDOVICO. M., OCTAVIO. L. F. (2015). Insights into Animal and Plant LectinwithAntimicrobialActivities. *Molecules* . 20: 519-541.

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

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

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

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. (2013). The c-typelectinreceptor clec4m binds, internalizes, and clearsvonwillebrand factor and contributes to the variation in plasma vonwillebrand factor levels. *Blood*, 2013. 121: 5228–5237.

S

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.

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

SHARON. N., LIS. H. (1996). Legumelectins-A large family of homologous proteins. *FASEB J*, 1990. 4: 3198–3208. **SHARON. N. (1996)** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 408: 1-8.

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

Sinha, S., Gupta, G., (2007). Vijayan, M. and Surolia, A. Subunit assembly of plant lectins. *Curr Opin Struct Biol*, 17, 498-505.

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

Suttisrisung S., Senapin S., Wrrhhchumnarnkul B., Wongprasert K. (2011) Identification and Characterization of a novel legum. Liklectin cDNA sequence from the red marine algae *Gracilaria fisheri*. *J. Biosci* 36: 833-843.

Swansanson M. D., Winter H. C., Goldstein I. J., Markovitz D. M. (2010) A lectin isolated from Bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *J. Biol. Chem* 285:86468655.

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

TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A., ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A. (2009).Mechanism by which the lectinactinohivin blocks hiv infection of targetcells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. 106: 15633- 15638.

TANNE. A., NEYROLLES. O. (2010).C-typelectins in immune defenseagainstpathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confersearly protection againstmycobacteriumtuberculosis infection. Virulence, 2010. 1: 285–290.

TEIXEIRA EH, ARRUDA FVS, NASCIMENTO KS, CARNEIRO VA, NAGANO CS, SILVA BR, SAMPAIO AH AND CAVADA BS. (2012).Biological Applications of Plants and AlgaeLectins: An Overview. In: Capítulo 23, Carbohydrates-ComprehensiveStudies on Glycobiology and Glycotechnology.

TOPFER- PETERSEN. E., ROMERO. E., VARELA. P. F., EKHLASI-HUNDRIESER. M., DOSTALOVA. Z., SANZ. L., CALVETE. J. J. (1998).Spermadhesins: a new proteinfamily. *Facts, hypotheses and perspectives. Andrologia*, 1998. 30: 217-224.

V

Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rougé P (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionaryrelatedproteinswith diverse biologicalroles. *CriticalReviews in Plant Sciences* 17: 575-692).

Van Liempt, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y, (2006). Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets.

W

Wangh .N.G .T.G. (1998).Ribosome inactivatingprotein and lectinfrombittermelon (Momordicacharantica) seeds: sequence comparaisn withrelatedprotein. *Biochemical and biophysicalresearch communication*.253, 143- 146.

WIMER. B. M. (1996). Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm*, 1996. 11: 57-75.

Wright. C.S. (1980). *J. Mol. Biol.* 139, 53-60.

X

Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao YR, Bi WJ, Zhao XF, Wang JX. (2014). L-type lectin from the kurumashrimp *Parastacus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 397–405.

Y

YOUNG. N. M., OOMEN. R.P. (1992). Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 1992, 228, 924–934.

Yuka Kobayashi, Kouji Kobayashi, Kanako Umehara, Hideo Dohra, Takeomi Murata, Taichi Usui and Hirokazu Kawagishi (2004). Purification, Characterization, and Sugar Binding Specificity of an N-Glycolylneuraminic Acid-specific Lectin from the Mushroom *Chlorophyllum molybdites*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.,.

Z

ZHANG. H., PEATMAN. E., LIU. H., FENG. T., CHEN. L., LIU. Z. (2012). Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Fish Shellfish Immunol*, 2012. 32: 598-608.

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

Référence électronique :

Références bibliographiques

https://www.francini-mycologie.fr/LA_PAGE_DU_DEBUTANT/Lepista_saeva.html

<https://www.mycharentes.fr/pdf1/2420.pdf>

<https://fongeflorule.wordpress.com/2016/02/18/le-pied-violet/>

<https://www.photos-alsace-lorraine.com/album/3741/Pied-violet%2C+Lepista+saeva>

Annexes

Annexe 01 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1M ; pH =7,4). Pour 1000ml de PBS.

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

Annexe 02 : Préparation de NaCl à 0.9%

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

Annexe 03 : préparation de la solution de saccharide

Sucre	
Tampon PBS	4ml

Annexe 04 : Table de moonogramme de Cooper.

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 0 °C)	Percentage saturation at 0 °C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (g) to be added to 11 of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

* Reprinted from England and Seifter (1990), which was adapted from Dawson et al. (1969).

Annexe 05 : Préparation du gel de filtration pour la chromatographie d'affinité.

Tampon PBS	100ml
Gel sephadex G25	4g

Annexe 06: Absorbances et concentrations des cinquante fractions obtenues après dessalage sur une colonne sephadex G25

 **Champignons pied violet *Lepistaseava***

- Culot du culot 4 précipité à 50%

N° de tube	Abs à280nm	Abs à260nm	[P] mg/ml
1	0,429	0,496	0,309922
2	0,945	0,115	0,6108
3	0,227	0,298	0,18529
4	0,095	0,137	0,19086
5	0,045	0,058	0,07598
6	0,024	0,029	0,04612
7	0,015	0,020	0,0429

8	0,014	0,019	0,04223
9	0,014	0,019	0,04524
10	0,013	0,009	0,04506
11	0,013	0,009	0,0312
12	0,095	0,216	0,38094
13	0,011	0,008	0,02807
14	0,011	0,008	0,00672
15	0,010	0,007	0,04348
16	0,010	0,007	0,03187
17	0,005	0,001	0,02592
18	0,012	0,016	0,04457
19	0,005	0,003	0,03005
20	0,010	0,004	0,01808
21	0,006	0,004	0,01662
22	0,013	0,013	0,03476
23	0,007	0,005	0,03351
24	0,008	0,013	0,04032
25	0,008	0,012	0,03898
26	0,009	0,007	0,02552
27	0,009	0,006	0,02446
28	0,008	0,007	0,01425
29	0,009	0,007	0,01504
30	0,008	0,006	0,01874
31	0,009	0,006	0,03415
32	0,009	0,006	0,02756
33	0,009	0,011	0,02968
34	0,009	0,011	0,04111
35	0,008	0,004	0,06433
36	0,008	0,004	0,02403
37	0,008	0,011	0,02269
38	0,008	0,004	0,0113
39	0,008	0,018	0,02375
40	0,017	0,018	0,00989

41	0,023	0,018	0,02955
42	0,008	0,004	0,03627
43	0,008	0,004	0,02906
44	0,008	0,004	0,02925
45	0,008	0,004	0,04283
46	0,008	0,004	0,00519
47	0,015	0,018	0,03292
48	0,011	0,001	0,04118
49	0,011	0,006	0,04696
50	0,011	0,005	0,0095
51	0,011	0,005	0,04346
52	0,011	0,005	0,02855
53	0,011	0,004	0,01401
54	0,012	0,004	0,01556
55	0,012	0,004	0,01556
56	0,011	0,003	0,01477
57	0,012	0,003	0,01632
58	0,012	0,004	0,01556
59	0,012	0,004	0,01556
60	0,012	0,004	0,01556

➤ C du S4 50 %

N°de tube	ABS à 280nm	ABS à 260nm	[P] mg/ml
1	0,213	0,254	0,13711
2	0,445	0,572	0,25503
3	0,174	0,244	0,08426
4	0,141	0,196	0,06959
5	0,098	0,145	0,0417
6	0,062	0,122	0,00338
7	0,728	0,980	0,3836
8	0,337	0,751	0,04841

9	0,216	0,436	0,00344
10	0,157	0,295	0,01915
11	0,129	0,219	0,03351
12	0,109	0,175	0,03595
13	0,093	0,155	0,02635
14	0,084	0,133	0,02912
15	0,083	0,113	0,04277
16	0,068	0,113	0,01952
17	0,068	0,089	0,03776
18	0,061	0,08	0,03375
19	0,054	0,075	0,0267
20	0,114	0,075	0,1197
21	0,197	0,207	0,14803
22	0,185	0,244	0,10131
23	0,104	0,131	0,06164
24	0,058	0,07	0,0367
25	0,042	0,047	0,02938
26	0,042	0,037	0,03698
27	0,024	0,025	0,0182
28	0,017	0,017	0,01343
29	0,017	0,017	0,01343
30	0,011	0,007	0,01173
31	0,011	0,002	0,01553
32	0,010	0,002	0,01398
33	0,003	0,002	0,00313
34	0,004	0,002	0,00468
35	0,004	0,001	0,00544
36	0,004	0,002	0,00468
37	0,004	0,002	0,00468
38	0,005	0,001	0,00699
39	0,014	0,001	0,02094
40	0,07	0,009	0,10166
41	0,012	0,009	0,01176

42	0,003	0,009	0,00219
43	0,005	0,009	0,00091
44	0,006	0,010	0,0017
45	0,006	0,010	0,0017
46	0,006	0,010	0,0017
47	0,006	0,016	0,00286
48	0,006	0,011	0,00094
49	0,005	0,011	0,00061
50	0,005	0,011	0,00061
51	0,004	0,011	0,00216
52	0,004	0,011	0,00216
53	0,004	0,011	0,00216
54	0,003	0,011	0,00371
55	0,003	0,011	0,00371
56	0,003	0,011	0,00371
57	0,003	0,015	0,00675
58	0,003	0,015	0,00675
59	0,004	0,016	0,00596
60	0,004	0,016	0,00596

➤ C du S4 85%

N° du tube	Abs à 280nm	Abs à 260nm	[P] mg/ml
1	0,011	0,018	0,0644
2	0,338	0,371	0,2756
3	0,126	1,27	1,2421
4	0,102	1,05	0,8249
5	0,671	0,789	0,5232
6	0,483	0,577	0,659
7	0,127	0,169	0,68039
8	0,084	0,112	0,63114
9	0,048	0,075	0,52539

10	0,035	0,045	0,52791
11	0,025	0,031	0,4575
12	0,016	0,024	0,17292
13	0,016	0,020	0,10612
14	0,016	0,021	0,08737
15	0,057	0,100	0,15815
16	0,019	0,021	0,11384
17	0,025	0,027	0,11867
18	0,021	0,027	0,09205
19	0,021	0,020	0,11287
20	0,016	0,020	0,03376
21	0,016	0,019	0,04461
22	0,023	0,024	0,06102
23	0,016	0,017	0,02662
24	0,017	0,053	0,04008
25	0,025	0,024	0,06023
26	0,017	0,017	0,01352
27	0,017	0,016	0,01811
28	0,018	0,017	0,02522
29	0,018	0,017	0,0158
30	0,018	0,016	0,0196
31	0,017	0,012	0,01902
32	0,016	0,016	0,01899
33	0,016	0,016	0,01367
34	0,016	0,016	0,00653
35	0,015	0,016	0,01033
36	0,015	0,011	0,00878
37	0,015	0,012	0,00498
38	0,015	0,012	0,01127
39	0,016	0,012	0,00197
40	0,016	0,012	0,00717
41	0,015	0,012	0,00717
42	0,007	0,006	0,00717

43	0,007	0.007	0,01115
44	0,013	0.007	0,00115
45	0,014	0.013	0,00103
46	0,014	0.013	0,00179
47	0,008	0.012	0,02808
48	0,014	0.012	0,03063
49	0,016	0.012	0,01103
50	0,016	0.012	0,00948
51	0,017	0.018	0,01328
52	0,016	0.011	0,01027
53	0,018	0.011	0,00951
54	0,019	0.011	0,00951
55	0,013	0.011	0,0072
56	0,014	0.011	0,0148
57	0,017	0.010	0,01346
58	0,017	0.010	0,01875
59	0,012	0.010	0,011
60	0,013	0.009	0,01331

✚ **Gland du chêne vert «*Quercus suber*»**

➤ C du C4 50%

N° du tube	Abs à 280 nm	Abs à 260nm	[P] mg/ml
1	0,376	0,452	0,23928
2	0,504	0,588	0,33432
3	0,476	0,581	0,29624
4	0,339	0,460	0,17585
5	0,443	0,681	0,16909
6	0,623	0,875	0,30065
7	0,746	0,80	0,5483
8	0,833	0,88	0,62235
9	0,886	0,93	0,6665
10	0,714	0,75	0,5367

11	0,507	0,684	0,26601
12	0,374	0,458	0,23162
13	0,305	0,347	0,20903
14	0,273	0,295	0,19895
15	0,246	0,263	0,18142
16	0,235	0,254	0,17121
17	0,234	0,246	0,17574
18	0,226	0,234	0,17246
19	0,203	0,215	0,15125
20	0,195	0,204	0,14721
21	0,174	0,171	0,13974
22	0,146	0,148	0,11382
23	0,134	0,141	0,10054
24	0,122	0,115	0,1017
25	0,107	0,101	0,08909
26	0,099	0,093	0,08277
27	0,093	0,088	0,07727
28	0,087	0,082	0,07253
29	0,086	0,082	0,07098
30	0,086	0,077	0,07478
31	0,092	0,077	0,08408
32	0,086	0,072	0,07858
33	0,085	0,073	0,07627
34	0,078	0,073	0,06542
35	0,084	0,073	0,07472
36	0,089	0,073	0,08247
37	0,084	0,074	0,07396
38	0,089	0,078	0,07867
39	0,096	0,079	0,08876
40	0,110	0,078	0,11122
41	0,098	0,078	0,09262
42	0,089	0,079	0,07791
43	0,090	0,079	0,07946

44	0,103	0,079	0,09961
45	0,102	0,091	0,08894
46	0,107	0,092	0,09593
47	0,091	0,080	0,08025
48	0,102	0,096	0,08514
49	0,103	0,096	0,08669
50	0,076	0,067	0,06688
51	0,110	0,103	0,09222
52	0,110	0,102	0,09298
53	0,099	0,089	0,08581
54	0,100	0,089	0,08736
55	0,128	0,135	0,0958
56	0,129	0,129	0,10191
57	0,125	0,114	0,10711
58	0,063	0,056	0,05509
59	0,115	0,103	0,09997
60	0,091	0,082	0,07873

➤ C du S4 50%

N° du tube	ABS 280	ABS 260	[P] mg/ml
1	0,172	0,2	0,1146
2	0,348	0,232	0,36308
4	0,268	0,401	0,11064
5	0,244	0,246	0,19124
6	0,292	0,386	0,15924
7	0,326	0,277	0,29478
8	0,278	0,370	0,1497
9	0,243	0,179	0,24061
10	0,181	0,239	0,09891
11	0,152	0,138	0,13072
12	0,141	0,187	0,07643

13	0,141	0,141	0,11139
14	0,142	0,179	0,08406
15	0,131	0,129	0,10501
16	0,132	0,170	0,0754
17	0,128	0,111	0,11404
18	0,119	0,146	0,07349
19	0,105	0,101	0,08599
20	0,998	0,182	1,40858
21	0,912	0,891	0,73644
22	0,849	0,908	0,62587
23	0,826	0,809	0,66546
24	0,767	0,784	0,59301
25	0,697	0,670	0,57115
26	0,677	0,706	0,51279
27	0,636	0,614	0,51916
28	0,621	0,648	0,47007
29	0,603	0,569	0,50221
30	0,577	0,596	0,44139
31	0,567	0,540	0,46845
32	0,587	0,585	0,46525
33	0,599	0,545	0,51425
34	0,616	0,632	0,47448
35	0,610	0,568	0,51382
36	0,675	0,635	0,56365
37	0,676	0,590	0,5994
38	0,712	0,664	0,59896
39	0,764	0,650	0,6902
40	0,804	0,711	0,70584
41	0,874	0,796	0,74974
42	0,931	0,883	0,77197
43	0,68	0,802	0,44448
44	0,74	0,825	0,52
45	0,74	0,930	0,4402

46	0,82	0,935	0,5604
47	0,90	0,152	1,27948
48	0,91	0,144	1,30106
49	0,04	0,106	-0,01856
50	0,113	0,159	0,05431
51	0,159	0,142	0,13853
52	0,154	0,202	0,08518
53	0,229	0,147	0,24323
54	0,153	0,191	0,09199
55	0,241	0,162	0,25043
56	0,181	0,217	0,11563
57	0,181	0,111	0,19619
58	0,114	0,151	0,06194
59	0,153	0,83	-0,39365
60	0,104	0,164	0,03656

➤ C du S4 85%

N° du tube	ABS 280	ABS 260	[P] mg/ml
1	0,955	0,080	1,41945
2	0,132	0,146	0,09364
3	0,264	0,298	0,18272
4	0,836	0,956	0,56924
5	0,1074	1,25	-0,78353
6	0,805	0,946	0,52879
7	0,569	0,658	0,38187
8	0,369	0,417	0,25503
9	0,236	0,254	0,17276
10	0,142	0,148	0,10762
11	0,107	0,106	0,08529
12	0,937	0,94	0,73795
13	0,860	0,908	0,64292

14	0,790	0,816	0,60434
15	0,733	0,753	0,56387
16	0,652	0,665	0,5052
17	0,548	0,550	0,4314
18	0,476	0,481	0,37224
19	0,426	0,431	0,33274
20	0,352	0,357	0,27428
21	0,309	0,313	0,24107
22	0,248	0,251	0,19364
23	0,224	0,226	0,17544
24	0,196	0,198	0,15332
25	0,169	0,172	0,13123
26	0,153	0,155	0,11935
27	0,132	0,131	0,10504
28	0,131	0,124	0,10881
29	0,108	0,105	0,0876
30	0,107	0,105	0,08605
31	0,088	0,086	0,07104
32	0,083	0,079	0,06861
33	0,076	0,070	0,0646
34	0,071	0,069	0,05761
35	0,071	0,065	0,06065
36	0,070	0,064	0,05986
37	0,053	0,047	0,04643
38	0,053	0,047	0,04643
39	0,053	0,047	0,04643
40	0,046	0,042	0,03938
41	0,046	0,042	0,03938
42	0,041	0,036	0,03619
43	0,042	0,035	0,0385
44	0,042	0,035	0,0385
45	0,042	0,035	0,0385
46	0,037	0,035	0,03075

47	0,037	0,030	0,03455
48	0,036	0,030	0,033
49	0,036	0,030	0,033
50	0,035	0,029	0,03221
51	0,029	0,029	0,02291
52	0,029	0,029	0,02291
53	0,029	0,028	0,02367
54	0,029	0,022	0,02823
55	0,029	0,022	0,02823
56	0,028	0,017	0,03048
57	0,027	0,017	0,02893
58	0,020	0,016	0,01884
59	0,021	0,017	0,01963
60	0,021	0,017	0,01963

➤ C du C4 85%

N° du Tube	Abs 280nm	Abs 260nm	[P] mg/ml
1	0,270	0,293	0,19582
2	0,350	0,493	0,16782
3	0,109	0,132	0,6863
4	0,144	0,122	1,3048
5	0,705	0,787	0,49463
6	0,380	0,395	0,2888
7	0,197	0,186	0,16399
8	0,119	0,109	0,10161
9	0,101	0,087	0,09043
10	0,072	0,065	0,0622
11	0,078	0,056	0,07834
12	0,061	0,049	0,05731
13	0,071	0,059	0,06521
14	0,048	0,034	0,04856

15	0,038	0,028	0,03762
16	0,038	0,028	0,03762
17	0,032	0,023	0,03212
18	0,032	0,022	0,03288
19	0,030	0,022	0,02978
20	0,030	0,021	0,03054
21	0,029	0,015	0,03355
22	0,029	0,016	0,03279
23	0,017	0,007	0,02103
24	0,017	0,006	0,02179
25	0,017	0,006	0,02179
26	0,018	0,006	0,02334
27	0,011	0	0,01705
28	0,011	0	0,01705
29	0,011	0	0,01705
30	0,006	0	0,0093
31	0,006	0	0,0093
32	0,006	0	0,0093
33	0,007	0	0,01085
34	0,007	0	0,01085
35	0,007	0	0,01085
36	0,002	0	0,0031
37	0,002	0	0,0031
38	0,002	0	0,0031
39	0,002	0	0,0031
40	0,001	0	0,00155
41	0,001	0	0,00155
42	0,001	0	0,00155
43	0,001	0	0,00155
44	0,001	0	0,00155
45	0,001	0	0,00155
46	0,001	0	0,00155
47	0,001	0	0,00155

48	0,001	0	0,00155
49	0,001	0	0,00155
50	0,001	0	0,00155

➤ S du C4 85%

N° du tube	Abs 280nm	Abs 260nm	[P] mg/ml
1	0,182	0,068	0,23042
2	0,234	0,143	0,25402
3	0,328	0,265	0,307
4	1,57	2	0,9135
5	10,74	12,5	7,147
6	8,42	9,5	5,831
7	4,52	4,95	3,244
8	2,3	2,48	1,6802
9	1,07	1,09	0,8301
10	0,901	0,836	0,76119
11	0,648	0,556	0,58184
12	0,52	0,402	0,50048
13	0,434	0,297	0,44698
14	0,378	0,238	0,40502
15	0,349	0,201	0,38819
16	0,317	0,182	0,35303
17	0,282	0,153	0,32082
18	0,227	0,119	0,26141
19	0,224	0,104	0,26816
20	0,215	0,074	0,27701
21	0,193	0,071	0,24519
22	0,178	0,052	0,23638
23	0,169	0,059	0,21711
24	0,16	0,039	0,21836
25	0,155	0,033	0,21517

26	0,155	0,024	0,22201
27	0,154	0,028	0,21742
28	0,143	0,024	0,20341
29	0,15	0,024	0,21426
30	0,143	0,017	0,20873
31	0,15	0,018	0,21882
32	0,15	0,037	0,20438
33	0,15	0,027	0,21198
34	0,14	0,017	0,20408
35	0,141	0,012	0,20943
36	0,132	0,013	0,19472
37	0,132	0,013	0,19472
38	0,132	0,013	0,19472
39	0,133	0,021	0,19019
40	0,064	0,016	0,08704
41	0,133	0,015	0,19475
42	0,053	0,005	0,07835
43	0,122	0	0,1891
44	0,066	0,005	0,0985
45	0,124	0,006	0,18764
46	0,055	0,005	0,08145
47	0,122	0,004	0,18606
48	0,054	0,003	0,08142
49	0,116	0,003	0,17752
50	0,056	0,003	0,08452
51	0,116	0,003	0,17752
52	0,059	0,016	0,07929
53	0,114	0,016	0,16454
54	0,05	0,003	0,07522
55	0,121	0,003	0,18527
56	0,051	0,002	0,07753
57	0,122	0,002	0,18758

58	0,051	0,003	0,07677
59	0,122	0,003	0,18682
60	0,051	0,003	0,07677

Annexe 07 : Préparation de la solution d'extraction pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide

➤ **Tampon Tris HCl pH = 6,8**

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

Annexe 08 : Préparation du gel de séparation pour l'électrophorèse (T : 12,52% ; C : 0,97%)

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

Annexe 09 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactifs	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1
Bisacrylamide 2%	0,3
Eau distillée	10,2
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14
APS 1%	0,7
TEMED	0.014

Annexe 10 : Préparation d'une solution de coloration pour le gel d'électrophorèse

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

➤ Solution mère de bleu de coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	5g
Ethanol 95°	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.

Année universitaire : 2018-2019

Présenté par : YNINEB LYNA ELBETOUL
BOUTELDJA HADJER

Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines du champignon «*Lepista seava*» et du gland du chêne vert «*Quercus suber*»

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée.

Les lectines sont dites agglutinines ou hémagglutinines. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaire, polyvalentes et sont d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale mais jamais immunitaire. Elles sont caractérisées par leur capacité de distinguer et de se fixer de façon réversible aux hydrates de carbone présentes sur les membranes externes des cellules ou se trouvant en solution ce qui va provoquer l'agglutination de diverses cellules ou l'hémagglutination dans le cas des hématies. Les champignons y compris les moisissures et les levures font partie d'une grande division d'organisme qui présente dans ces dernières années un intérêt de très grande importance dans plusieurs domaines biotechnologiques et médicaux. Notre but se concrétise par la caractérisation et la purification partielle des lectines extraites à partir du champignon dit pied violet «*Lepista seava*» et celles extraites du gland du chêne vert «*Quercus suber*» récoltés tout deux de la forêt de Djebel Ouahch bien connue de la ville de Constantine.

Ces lectines, après extraction ont révélé une activité hémagglutinante appréciable, avec un pH optimum pour le champignon pied violet proche de 7, et d'une zone de PH tampon allant de 2 à 7 pour le gland du chêne vert. Elles ont montré une thermo-stabilité à des températures élevées allant jusqu'à 100°C pour les deux échantillons. Aucune affinité envers les sucres et protéines utilisés, et aucune spécificité envers tous les groupes sanguins du système ABO n'ont été observées.

Leur profil électrophorétique réalisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), dans des conditions dénaturantes révéla l'existence de bandes protéiques dont les PM se situent dans un intervalle compris entre 15 et 90 KDa avec une légère différence pour une bande protéique de 3.5KDa.

De plus, la lectine extraite à partir du champignon «*Lepista seava*» a manifesté un effet anti-inflammatoire non négligeable.

Mots clés : Lectines ; Extraction ; Agglutination ; Hémagglutination ; purification ; Effet anti-inflammatoire ; Œdème.

Laboratoire : Biochimie

Membres du jury

Président du jury : Necib.Y (Pr-UFM Constantine)

Rapporteur : Zitouni.A (MC-UFM Constantine)

Examineur : Nouadi. T (MC-UFM Constantine)