

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse Protéomique et Santé

Intitulé :

**Extraction des lectines à partir des plantes médicinales
(*Anacyclus Pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L link et Urtica dioica L*) avec des tests biologiques**

Présenté et soutenu par :

Le : 23-6-2015

- ❖ TORCHE Imen
- ❖ CHEKAKTA Messaouda

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : MECHAKRA A. (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : NECIB Y. (Pr- UFM Constantine).

Examineur : BAHI A. (M.A- UFM Constantine).

Année universitaire

2014-2015

Remerciement

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

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

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

*Nous exprimons notre sincère gratitude à **Mme BAHI. A**, maitre-assistante à Université des Frères Mentouri Constantine, pour ses aides techniques et ses orientations.*

Pour tous les conseils et l'attention qu'elle nous a prodigué tout au long de la réalisation de ce travail. Pour sa gentillesse, simplicité, sa sympathie nous sommes très honorés que nous avons la chance de travailler avec lui.

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

*A notre maître et présidente du jury **Madame Mechakra. A** professeur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à Université des Frères Mentouri Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.*

*A **Madame BAHI. A**, Maitre-Assistante à Université des Frères Mentouri Constantine, nous sommes fières que vous nous faites a acceptant d'examiner et de juger notre travail.*

MERCI

Résumé

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les extraits racinaires de quatre plantes médicinales par le test d'hémagglutination et leur étude biologique.

L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon suivi par la chromatographie sur colonne.

L'activité hémagglutinante d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* a été 1:7 (128) et de 1:6 (64) pour *Brassica napus L*. Parmi les extraits des quatre plants étudiés, seulement les lectines d'*Anacyclus pyrethrum L* ont présentées une sélectivité pour le groupe B du système ABO. Les lectines de *Brassica napus L* ont été spécifiquement inhibés par le galactose, mannose, glucose et celles d'*Urtica dioica L* par le N-acétyle glucosamine, ces lectines ont été stables dans la gamme du pH de 4-12. Cependant les lectines de *Calycotome spinosa L* ont été stables dans la gamme du pH de 1 à 12, celles d'*Anacyclus pyrethrum L* présentent une stabilité dans le pH de 2 à 12. Le traitement thermique des lectines des quatre plantes de 40 °C jusqu'à 120 °C n'a été pas suffisante pour leur inactivation. Ces derniers ont une activité antibactérienne contre *Baccillus cereus*, et antifongique vis-à-vis *Aspergillus sp*, sauf l'extrait d'*Urtica dioica L* qui a été seulement présenté une activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus flavus*.

L'application de la chromatographie sur colonne de séphadex G 200 sur les extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Urtica dioica L* et *Calycotome spinosa L* a donné un seul pic, correspondre aux 2^{ème} tube, par contre pour *Brassica napus L*, elle a donnée deux pic dans le 2^{ème} et 11^{ème} tube, avec une amélioration de leur activité hémagglutinante.

Mots clés: Lectines, Extraction, Activité hémagglutinante, Plante médicinale, Saccharide, Activité antimicrobienne.

Abstract

The purpose of this work is to search for the presence of lectins in the root extracts of four medicinal plants based on the hemagglutination test, and their biological study.

The extraction was realized by grinding and maceration in a buffer solution and it was followed by column chromatography.

The hemagglutinating activity of *Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* and *Urtica dioica L* was 1:7 (128), however it was 1:6(64) for *Brassica napus L*. Among the extracts of the four plants studied, only lectins of *Anacyclus pyrethrum L* have shown a selectivity for group B of the ABO system. Lectins of *Brassica napus L* were specifically inhibited by galactose, mannose, glucose and those of *Urtica dioica L* by N-acetyl glucosamine, these lectins were stable in the pH range of 4-12, however lectins of *Calycotome spinosa L* were stable in the pH range of 1-12 and those of *Anacyclus pyrethrum L* exhibit stability in the pH of 2-12. The heat treatment of lectins of the four plants from 40 °C till 120 °C was not enough for their inactivation. These lectins present an antibacterial activity against *Bacillus cereus* and antifungal activity toward *Aspergillus sp*, except *Urtica dioica L* extract which was only presented antifungal activity against *Aspergillus flavus*.

The application of column chromatography on sephadex G 200 on the extracts of *Anacyclus pyrethrum L*, *Urtica dioica L* and *Calycotome spinosa L* had given one pic for the 2nd tube, however it gives two pics for 2nd and 11th tube, it also improved the hemagglutinating activity.

The hemagglutinating activity of the extracts was improved after

Keywords: Lectins, Extraction, Hemagglutinating activity, Medicinal plant, Saccharide, Antimicrobial activity.

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة وجود اللكتينات في مستخلص جذور أربعة نباتات طبية و ذلك بالإعتماد على اختبار التراص، ثم استخلاصها و دراستها بيولوجيا و ذلك عن طريق طحنها و نقعها في محلول ملحي ثم تمريرها عبر الكروماتوغرافي العمودي. في حين أبدت مستخلصات كل من *Urtica dioica L* و *Calycotome spinosa L* و *Anacyclus pyrethrum L* حدة تراص مقدرة ب (128):7:1 اظهر مستخلص *Brassica napus L* نشاط تراص (64):6:1. من بين لكتينات النباتات الاربع المدروسة، فقط لكتينات النوع *Anacyclus pyrethrum L* اعطت إنتقائية للمجموعة B من نظام الدموية ABO. لقد تم إختبار نوعية لكتينات النباتات الاربعة بإستعمال عدة سكريات و اظهر هذا الإختبار نوعية ملحوظة لمستخلصي *Brassica napus L* لسكر المانوز، الغلوكوز و الغلاكتوز و *Urtica dioica* لسكر N-acétyle glucosamine. حيث ان لكتينات هذين النوعين أبدت إستقرارا في مجال pH من 4 إلى 12 أما بالنسبة للكتينات النوع *Anacyclus pyrethrum L* فقد كانت مستقرة في مجال pH 2-12 على غرار لكتينات *Calycotome spinosa L* التي حافظت على إستقرارها على طول المجال المختبر (1-12). إن المعالجة الحرارية للمستخلصات الأربعة إبتداءا من 40 ° إلى 120 درجة مئوية لم تكن كافية لتثبيط قدرتها التراصية. حيث ابرزت هذه المستخلصات الأربعة أيضا نشاط ضد ميكروبي ملحوظ لبكتيريا *Baccillus cereus* و الفطريات *Aspergillus sp* ما عدا لكتينات *Urtica dioica L* فقد كان نشاطها ضد ميكروبي ل *Aspergillus flavus* فقط.

إن تطبيق الكروماتوغرافي العمودي على المستخلصات الأربعة بإستعمال séphadex G 200 قد حسن فعليا نشاطها التراسي. حيث أعطت كل من المستخلصات *Anacyclus pyrethrum L*, *Urtica dioica L* و *Calycotome spinosa L* نوع واحد من اللكتينات، في حين أعطى مستخلص *Brassica napus L* نوعين.

الكلمات المفتاحية : اللكتينات ، استخلاص ، نشاط التراص، نبتة طبية ،سكر، نشاط ضد ميكروبي

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction..... 1

Section I : Etude bibliographique

Chapitre I : les lectines

1 Généralité sur les lectines 3

1.1 Définition..... 3

1.2 Historique..... 3

1.3 Le rôle biologique des lectines 4

1.4 La spécificité et l'affinité des lectines 6

1.4.1 Le site de reconnaissance..... 7

1.4.2 L'inhibition des lectines par des glucides..... 7

2 La classification des lectines 8

2.1 Chez les végétaux 8

2.1.1 Les mérolectines 8

2.1.2 Les hololectines 9

2.1.3 Les chimérolectines 9

2.1.4 Les superlectines 9

2.2 Chez les animaux 9

2.2.1 Les lectines intracellulaires 10

2.2.2 Les lectines extracellulaires 10

3 La structure des lectines 10

3.1 Les lectines simples 10

3.2 Les lectines mosaïques 10

3.3 Les assemblages macromoléculaires 11

3.4 La structure tridimensionnelle 11

4 Les propriétés des lectines 12

4.1 Les propriétés biologiques des lectines 12

4.1.1 L'interaction lectine–glucide 12

4.1.2 L'agglutination des cellules 12

4.1.3 L'activités mitogène 12

4.2 Les propriétés médicinales des lectines 12

SOMMAIRE

4.2.1 La propriété anticancéreuse	13
4.2.2 La propriété antivirales	13
4.2.3 La propriété antibactérienne	13
4.2.4 La propriété antifongique	13
4.2.5 La propriété immunomodulatrices.....	14
5 Utilisations et applications des lectines	14
5.1 Dans le domaine biomédical	14
5.1.1 Immunologie	14
5.1.2 Hématologie	14
5.1.3 Biologie cellulaire.....	15
5.1.4 Cancérologie	15
5.2 Dans le domaine agronomique	15
6 La distribution des lectines dans le monde vivant.....	15
6.1 Les lectines des microorganismes	16
6.1.1 Les lectines bactériennes	16
6.1.2 Les lectines viral.....	16
6.1.3 Les lectines des champignons.....	16
6.2 Les lectines animales	16
6.3 Les lectines végétales.....	17
Chapitre II : Le système ABO	
1Le system ABO	18
1.1 Définition.....	18
1.2 L'intérêt du system ABO	18
1.3 Les groupes sanguins	18
1.4 Les lectine et le system ABO.....	19
Chapitre III : Les plantes médicinales	
1 Les plantes médicinales	20
1.1 <i>Anacyclus pyrethrum L</i>	20
1.2 <i>Brassica napus L</i>	21
1.3 <i>Calycotome spinosa L.link</i>	23
1.4 <i>Urtica dioica L</i>	24
Section II : Matériels et méthodes	
I Le matériel	26
II Etude biologique.....	28
II.1 L'extraction des lectines par la solution tampon	28
II.2 Le test d'héماغglutination	29
II.3 Le teste de limite d'héماغglutination	29

SOMMAIRE

II.4 Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO	30
II.5 Le test d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides	30
II.6 Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides	30
II.7 L'effet de pH sur l'hémagglutination	31
II.8 L'effet de température sur l'hémagglutination	31
II.9 Le teste de l'activité antimicrobienne des extraits	31
III Extraction des lectines par chromatographie sur colonne	32
III.1 La préparation de colonne	33
III.2 La séparation des lectines à partir des extraits bruts	33
III.3 La spectrophotométrie à UV	33
Section III : Résultats	
I Les résultats d'étude biologique	34
II L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G200	45
Section IV Discussion	
Discussion	47
Conclusion et perspectives	54
Références bibliographiques	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations

- Con A** : Concavaline A lectine
- ConBr** : Lectine de *Canavalia brasiliensis*
- CRD**: Carbohydrate Recognition Domain
- EHL**: *Euphorbia helioscopia* lectin
- EUL**: Euonymus lectin-like
- F17-AG** : Fimbrial agglutinine 17
- Fuc**: fucose
- G** : Grossissement
- Gal**: galactose
- GalNAc**: N-acétyl galactosamine
- GlcNAc**: N-acétyl glucosamine
- GNA**: *Galanthus nivalis* agglutinin
- Glu** : Glucose
- HIV-1**: Human Immunodeficiency Virus 1
- IL**: Interleukine
- LecRKs**: Lectin receptor kinases
- LTLs**: L-Type Lectins
- Man**: Mannose
- MIC**: Concentration minimal d'inhibition
- NeuAc**: Acide N-acétylneuraminique
- PA-IIL**: *Pseudomonas aeruginosa* lectin II
- PAMPs**: Pathogen-associated molecular patterns
- PBS**: Phosphate Buffer Saline
- Rip**: Ribosom Inactivating Proteine
- RSL**: *Ralsonia solanacearum* lectin
- TNF- α** : Tumor necrosis factor- α
- UDA** : *Urtica dioica* agglutinin

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau I : Historique de découverte des Lectines	4
Tableau II: La spécificité osidique de certaines plantes à lectines	8
Tableau III: La classification structurale des lectines des plants.....	9
Tableau IV : Les groupes sanguins	19
Tableau V : La spécificité des lectines d'origine végétales aux groupes sanguins.....	19
Tableau VI : Les micro-organismes utilisés et les pathologies associées	26
Tableau VII : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut d' <i>Anacyclus pyrethrum L, Brassica napus L, Calycotome spinosa</i> et <i>Urtica dioica L</i>	34
Tableau VIII : L'activité hémagglutinante des extraits d' <i>Anacyclus pyrethrum L, Brassica napus L, Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i>	35
Tableau IX: L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d' <i>Anacyclus pyrethrum L, Brassica napus L, Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i>	37
Tableau X: Le test d'inhibition des extraits bruts avec le Glucose, Galactose, Mannose, Lactose et le N-acétyle glucosamine	38
Tableau XI: Les concentrations minimales en glucose, galactose et mannose, provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait de <i>Brassica napus L</i>	39
Tableau XII: La limite d'inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait d' <i>Urtica dioica L</i> par le N-acétyle glucosamine	40
Tableau XIII : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits d' <i>Anacyclus pyrethrum L, Brassica napus L, Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i>	40
Tableau XIV: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante les extraits d' <i>Anacyclus pyrethrum L, Brassica napus L, Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i>	41
Tableau XV : L'activité antimicrobienne des extraits des quatre plantes vis-à-vis les bactéries et la levure.....	42
Tableau XVI : L'activité antimicrobienne des extraits des quatre plantes vis-à-vis les champignons	44

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire	6
Figure 2 : L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-IIL.....	7
Figure 3 : A classification des sucres selon Makela basée sur la position des groupements hydroxyyles en C-3et C-4 du cycle pyranose. B structures des sucres reconnus par les lectines des cinq principales classes	8
Figure 4 : Le lectine soluble RSL en complexe avec le Me-fucoside	10
Figure 5 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique	11
Figure 6 : Le lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc.....	11
Figure 7 : La structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO	18
Figure 8 : <i>Anacyclus pyrethrum L</i>	20
Figure 9 : <i>Brassica napus L</i>	22
Figure 10 : <i>Calycotome spinosa L Link</i>	23
Figure 11 : <i>Urtica dioica L</i>	24
Figure 12 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes	28
Figure 13 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait d' <i>Anacyclus pyrethrum L</i>	45
Figure 14 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait de <i>Brassica napus L</i>	45
Figure 15 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait de <i>Calycotome spinosa L</i>	46
Figure 16 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait de l'extrait d' <i>Urtica dioica L</i>	46

LISTE DES PHOTOS

Liste des photos

Photo 1 : Les racines sèches des quatre plantes médicinales.....	27
Photo 2 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d' <i>Anacyclus pyrethrum L</i>	34
Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de <i>Brassica napus L</i>	34
Photo 4 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de <i>Calycotome spinosa L</i>	35
Photo 5 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d' <i>Urtica dioica L</i>	35
Photo 6 La limite d' hémagglutination d' <i>Anacyclus pyrethrum L</i>	36
Photo 7 : La limite d' hémagglutination de <i>Brassica napus L</i>	36
Photo 8: La limite d' hémagglutination de <i>Calycotome spinosa L</i>	36
Photo 9: La limite d' hémagglutination d' <i>Urtica dioica L</i>	36
Photo 10 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par les quarts extraits bruts ; (A) : <i>Anacyclus pyrethrum L</i> , (B) : <i>Brassica napus L</i> , (C) : <i>Calycotome spinosa L</i> , (U) : <i>Urtica dioica L</i>	37
Photo 11 : Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de <i>Brassica napus</i> avec trois sucres, le glucose, galactose et mannose (↑) : début d'agglutination.....	39
Photo 12: Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait d' <i>Urtica dioica L</i> par le N-acétyle glucosamine.....	40
Photo 13: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante les extraits d' <i>Anacyclus pyrethrum L</i> , <i>Brassica napus L</i> , <i>Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i>	42
Photo 14 : L'activité antimicrobienne des extraits contre les bactéries et levure	43
Photo 15 : L'activité antifongique des extraits d' <i>Anacyclus pyrethrum L</i> , <i>Brassica napus L</i> , <i>Calycotome spinosa L</i> et <i>Urtica dioica L</i> contre <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A.niger</i>	44

INTRODUCTION

Introduction

Introduction

Les lectines sont une classe des protéines, leur seule caractéristique commune étant la capacité de se lier spécifiquement aux hydrates de carbone et d'agglutiner les cellules. Elles ont été définies comme des protéines d'origine non-immune et qui se lient spécifiquement et de façon réversible aux glucides et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substances (**Kocourek et Horejsi, 1981**). La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte l'aggrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation (**Rüdiger, 1993 ; Goldstein *et al.*, 1980**).

Le nombre des lectines isolées et caractérisées a augmenté grâce à leur abondance dans tous les organismes vivants, accompagné d'une certaine facilité de purification, sur tout avec l'introduction de chromatographie d'affinité, dont qu'elles sont utilisées comme outil de détection et d'isolement et de caractérisation des glycoconjugués présents dans les cellules vivants. Elles possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment: l'agglutination des cellules, l'activité mitogène, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antimicrobiennes et les effets immunitaires.

Les lectines sont présentées en quantité plus importante chez les végétaux que les animaux, pour cette raison l'objectif principal de notre travail est de chercher la présence des lectines dans les racines de quatre plantes médicinales qui n'ont été jamais étudiées en Algérie sur les lectines et l'extraction de ces dernières à partir de ces plantes avec des études biologiques.

L'objectif spécifique vise à évaluer l'activité agglutinante des lectines extraites à partir de quatre plantes médicinales sur les hématies de lapin, étude de l'effet du traitement thermique et du pH sur la stabilité de ces lectines, investiguer la spécificité de ces lectines par le test d'inhibition avec les glucides, chercher l'action antibactérienne et antifongique de ces lectines et ensuite procéder la chromatographie sur colonne sur le gel de séphadex G200 afin d'améliorer l'activité d'hémagglutination de l'extrait brute.

Introduction

Notre travail sera divisée en quatre sections: la première section est une étude bibliographique comprendre trois chapitres, dont le premier chapitre est consacré à une revue sur les lectines, en particulier une généralité, historique, classification, spécificité, distribution et leur application dans différente domaines. Nous avons ensuite abordé au second chapitre sur le système sanguin humain ABO et la structure de leurs antigènes. Enfin dans un dernier chapitre, nous avons présentés les plantes médicinales sur le quelle nous avons basée sur leur propriétés médicinales.

La seconde section est sur le matériel et les méthodes, elle contient trois parties, dont la première partie nous avons décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du notre travail expérimental, la deuxième est sur l'étude biologique qui se manifeste dans plusieurs tests. Dans cette partie nous avons récupéré des substances à partir d'une poudre racinaire à l'aide d'une solution tampon, l'extrait brut que nous avons obtenu est d'abord testé sur les hématies pour la mise en évidence de leur activités hémagglutinante, puis nous avant effectuées des tests biologiques sur elles. Pour une troisième étape nous avons procédé la chromatographie sur colonne en utilisent le gel séphadex G200.

Concernant les deux dernières sections, elles abordent les résultats et la discussion respectivement.

ETUDE

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :
Les lectines

1 Généralité sur les lectines

1.1 Définition

Les lectines sont dénommées par Boyd en 1954, sous le nom «lectine» dérivée du mot latin «lectus» qui est le participe passé du verbe «légère», qui veut dire «sélectionner» ou «choisir » (**Liener *et al.*, 1986**).

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine bactérienne, virale, végétale ou animale, non synthétisées par un système immunitaire et dépourvues d'activité enzymatique, elles ont la capacité de reconnaître spécifiquement les glucides simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (**Goldstein *et al.*, 1980**).

Les lectines sont appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les glycoconjugués et les cellules comme les érythrocytes, cette caractéristique est très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalents, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule ce qui explique leur pouvoir de précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et entraîner l'agglutination des cellules diverses (**Liener *et al.*, 1986**). Lorsque certains glucides sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spécificité (**Van Damme *et al.*, 1998**).

1.2 Historique

L'étude des lectines a été introduite par P. H Stillmark en 1888, qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que les extraits des graines de ricin (*Ricinus communis*) contenant des molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes (**Sharon *et Lis*, 2004**). Ces molécules ont ainsi nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines (**Aragao, 2009 ; Poiroux, 2011**). Ensuite P. Ehrliche a découvert la même activité dans l'extrait d'*Abrus precatorius* (pois rouge). A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes (**Poiroux, 2011**).

En 1919, J. B. Summer a réalisé la purification et la caractérisation de la concanavaleine A ou Con A (*Concavalia ensiformis*), cette phytoagglutinine pouvait également précipiter le glycogène en solution et agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (par exemple comme les levures et les bactéries) (**Liener *et al.*, 1986**). Le tableau I montre l'historique de découverte des lectines.

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

Année	Auteurs	Découverts
1884	Warden et addel/Bruyllant et Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A (Con A)
1926	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

1.3 Le rôle biologique des lectines

En utilisant leur capacité unique de « lire » l'information biologique, qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des glucides (Wiley et Skehel, 1987). Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et des fonctions dans ces organismes vivants (voir figure1). Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans les processus biologiques ainsi que dans les processus pathologiques (Lis et Sharon, 1998).

■ Les lectines situées à la surface des bactéries, des virus ou des parasites intestinaux reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection (Rudiger et Gabius, 2001).

■ Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours un mystère. Une hypothèse très probable est le rôle de défense du végétal contre les phytopathogènes ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante (**Rudiger et Gabius, 2001**).

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

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

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

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

➤ **Bactéries**

Lectines fimbriales, lectines solubles et toxines: servent à l'Adhésion, l'infection et la formation de biofilm.

➤ **Virus**

Influenza hémagglutinine : adhésion, infection

➤ **Plantes**

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

➤ **Animaux**

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

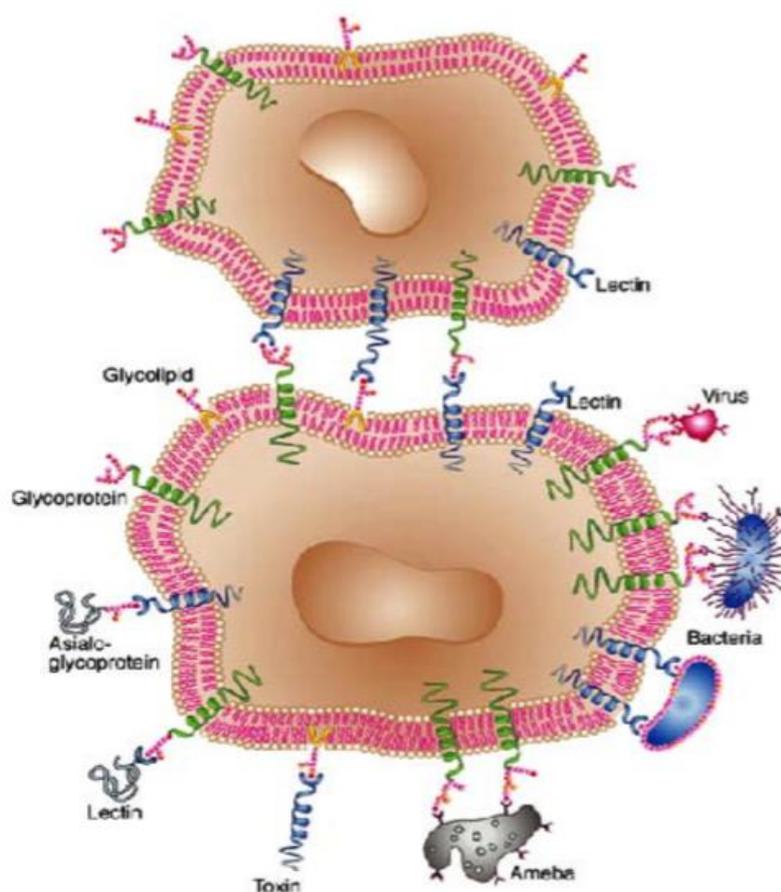


Figure 1 : Rôle des lectines dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface cellulaire (Gianluca, 2006).

1.4 La spécificité et l'affinité des lectines

Les lectines reconnaissent de manière 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), le galactose (Gal)/ N-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 épitopes glycaniques des surfaces cellulaires (Lis *et* Sharon, 1998).

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

1.4.1 Le site de reconnaissance

Dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides, les sites de liaison sont généralement des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides, les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (voir figure 2) (Gianluca, 2006).

Les liaisons hydrogène, ionique et van der Waals 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).

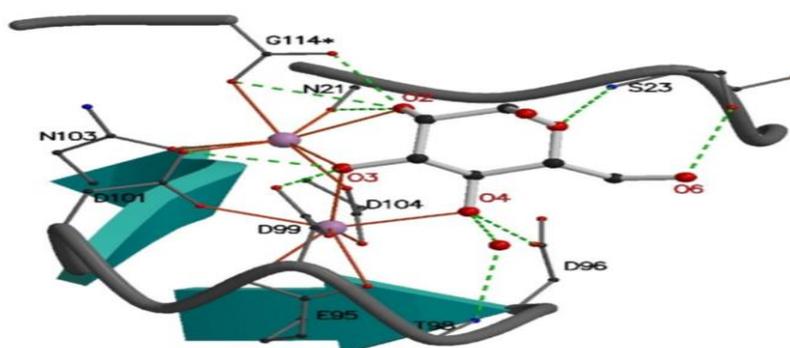


Figure 2: L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-III (Gianluca, 2006).

1.4.2 L'inhibition des lectines par des glucides

La spécificité osidique des lectines est définie en terme de concentration minimale de monosaccharide nécessaire pour inhiber l'agglutination ou la réaction de précipitation induit par ces molécules (Goldstein *et* Hayes, 1978 ; Goldstein *et* Poretz, 1986). Makela (1957) suggère que les monosaccharides réagissant avec les lectines peuvent être divisés en quatre classes, cette classification est basée sur la structure stéréo-isomère des groupes hydroxyles en C3 et C4 du cycle pyranose (figure 3).

I : Les lectines qui se lient au L-fucose comme celle de *Ulex europeaus L* (voir le tableau II).

II : Les lectines qui se lient au galactose et/ou N-acétylgalactosamine, telle celle du soja.

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

IV : Les lectines qui se lient à la L-xylose, l'iodose, le gulose et le L-glucose.

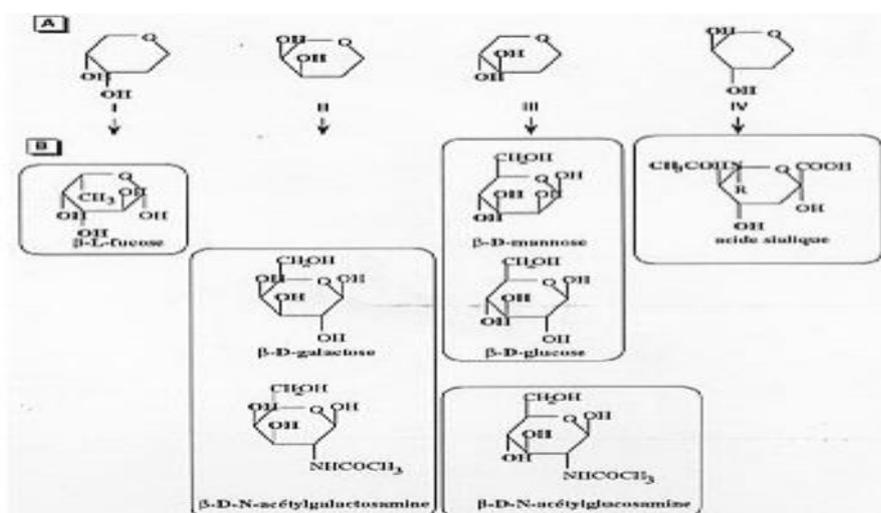


Figure 3 : A classification des sucres selon Makela basée sur la position des groupements hydroxyles en C-3et C-4 du cycle pyranose. B structures des sucres reconnus par les lectines des cinq principales classes.

Tableau II: La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (**Ramata, 2010**).

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

2 La classification des lectines

2.1 Chez les végétaux

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, alors selon la structure en peut distinguer quatre types des lectine (voir le tableau III) (**Van Damme et al., 1998**).

2.1.1 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 (exemple : héveine, protéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans et Van Damme, 1995**).

2.1.2 Les hololectines

Les hololectines sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi- identiques ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués et agglutiner les cellules. Elles présentent la majorité des lectines de plantes (exemple: ConBr la lectine de *Canavalia brasiliensis*) (Van Damme *et al.*, 1998).

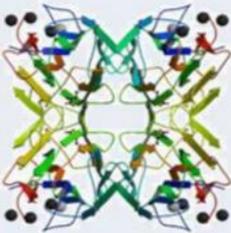
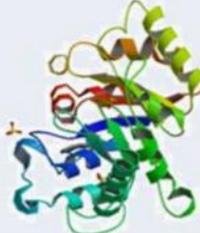
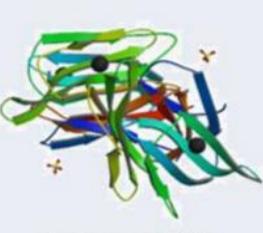
2.1.3 Les chimérolectines

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

2.1.4 Les superlectines

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

Tableau III: La classification structurale des lectines des plants (Van Damme *et al.*, 1998).

les mérolectines	les hololectines	les chimérolectines	les superlectines
 <p>Heveína (1HEV)</p>	 <p>ConBr (3JU9)</p>	 <p>PPL2 (2GSJ)</p>	 <p>Banana lectin (2BMY)</p>

2.2 Chez les animaux

Chez les animaux il existe 13 familles des lectines, on peut les regrouper dans deux principaux groupes.

2.2.1 Les lectines intracellulaires

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

2.2.2 Les lectines extracellulaires

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

3 La structure des lectines

3.1 Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identique), elles sont généralement de masse moléculaire de 40 KDa, cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines solubles (voir figure 4) et les galectines ; une famille des lectines animale spécifique pour le galactose (**Lenka et al., 2006**).

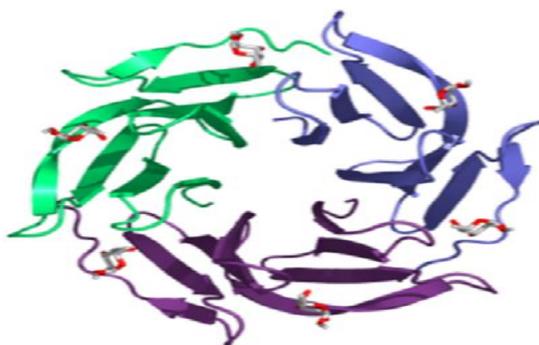


Figure 4 : Le lectine soluble RSL en complexe avec le Me-fucoside (**Gianluca, 2006**).

3.2 Les lectines mosaïques

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

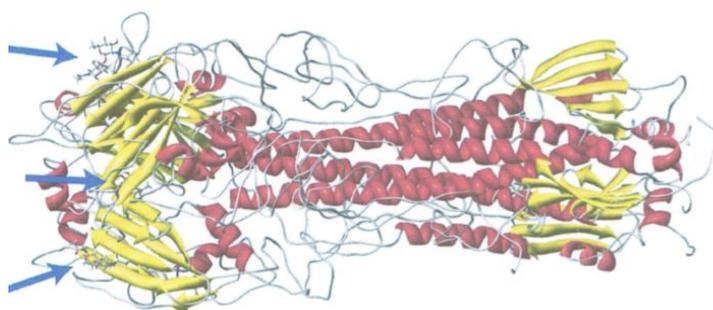


Figure 5 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

3.3 Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries ou elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètres et de 100 nm de longueur, appelés fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structurale. Seul un type des unités généralement une composante minoritaire possède le site de liaison pour les glucides, donc il est responsable à l'adhésion fimbrial (Lenka *et al.*, 2006).

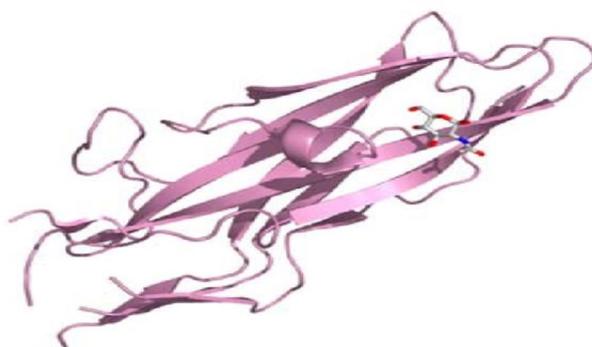


Figure 6: Le lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (Gianluca, 2006).

3.4 La structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle des lectines est compose des feuilles β contactées par un nœud forment des chaines antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon *et Lis*, 1990).

Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regroupe jusqu' à trois régions chevauchantes, la région centrale constituée par les résidus d'interaction et des ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) qui sont importants pour l'interaction, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournis l'énergie nécessaire pour l'interaction lectine-carbohydate (Sharon *et Lis*, 1990 ; Young *et Oomen*, 1992).

4 Les propriétés des lectines

4.1 Les propriétés biologiques des lectines

Comme toutes protéines les lectines sont des molécules qui possèdent plusieurs propriétés biologiques.

4.1.1 L'interaction lectine–glucide

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

4.1.2 L'agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec les saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, champignon) (**Peumans *et Van Damme*, 1995 ; Wang *et Ng*, 1998**).

4.1.3 L'activités mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Babosa, 2001 ; Falasca, 1989 ; Nachbar *et Oppenheim*, 1980**). Depuis les études concernant les lectines végétales, elles ont montré la capacité de certaines d'elles à activer spécifiquement diverses sous-populations lymphocytaires indépendamment de leur spécificité saccharidique (**Wimer, 1996**).

4.2 Les propriétés médicinales des lectines

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

4.2.1 La propriété anticancéreuse

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Poiroux, 2009**). Egalement ils inhibent leur migration (**Banwell, 1983**).

4.2.2 La propriété antivirales

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

4.2.3 La propriété antibactérienne

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

Les lectines animales comme les lectines récepteurs des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (**Singh et al., 2012**) aussi bien pour les lectines de type C qui résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al., 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al., 2012 ; Huang et al., 2014 ; Xu et al., 2014**).

4.2.4 La propriété antifongique

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

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

4.2.5 La propriété immunomodulatrice

Plusieurs lectines exercent des activités immunomodulatrices au temps de la première interaction avec les glycanes présentés à la surface des cellules immunitaires (Abdeljalil et al., 2014). Les lectines forment des signaux de production des cytokines (Souza et al., 2013) comme est le cas des lectines isolées à partir de *Viscum album L* qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages, et elles médient la réponse immunitaire par amélioration des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- α) (Lee et al., 2007).

5 Les utilisations et les applications des lectines

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

5.1 Dans le domaine biomédical

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

5.1.1 Immunologie

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

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

5.1.2 Hématologie

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains et sont utilisées dans les banques de sang pour leur identification ou leur typage (Boyd et Shapleigh, 1954).

A cause de leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification des glycoconjugués aussi bien pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**).

5.1.3 Biologie cellulaire

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

5.1.4 Cancérologie

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

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

5.2 Dans le domaine agronomique

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

6 La distribution des lectines dans le monde vivant

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

6.1 Les lectines des microorganismes

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

6.1.1 Les lectines bactériennes

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

6.1.2 Les lectines viral

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

6.1.3 Les lectines des champignons

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

6.2 Les lectines animales

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

- Les lectines de type C, elles sont soit circulants dans le plasma, ou attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire (**Somers *et al.*, 2000**), dont l'interaction glucide-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (**Drickamer, 1999**).

- La famille des galectines, elle regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le β -Gal, et sont caractérisées par la présence d'un domaine bien conservé appelé *S-type carbohydrate recognition domain* (S-CRD) (Leffler *et al.*, 2004).
- Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (Crocker, 2002).

La plupart des lectines des vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (Aragao, 2009).

6.3 Les lectines végétales

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

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

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

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

Chapitre II :
Le système ABO

1 La définition

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

2 L'intérêt du system ABO

- La découverte du système ABO signe la date de naissance de l'immunogénétique, il a été l'origine de progrès considérable en médecine en permettant d'envisager des transfusions compatible chez l'homme (**Ramata, 2010**).

- A cause de sa large distribution tissulaire le système ABO représente aussi l'antigène d'histocompatibilité majeur en transplantation des organes (**Ramata, 2010**).

3 Les groupes sanguins

Les antigènes de du système ABO proviennent d'une famille de glycolipides présents à la surface des globules rouges (voir figure 7). Leur structure de base est constituée de lipide céramide auquel est attaché un oligosaccharide composé d'un glucose (Glu), d'un galactose (Gal), d'une N-acétyl-galactosamine (GalNac), d'un galactose (Gal) et d'une fucose (Fuc) (**Parham, 2000**).

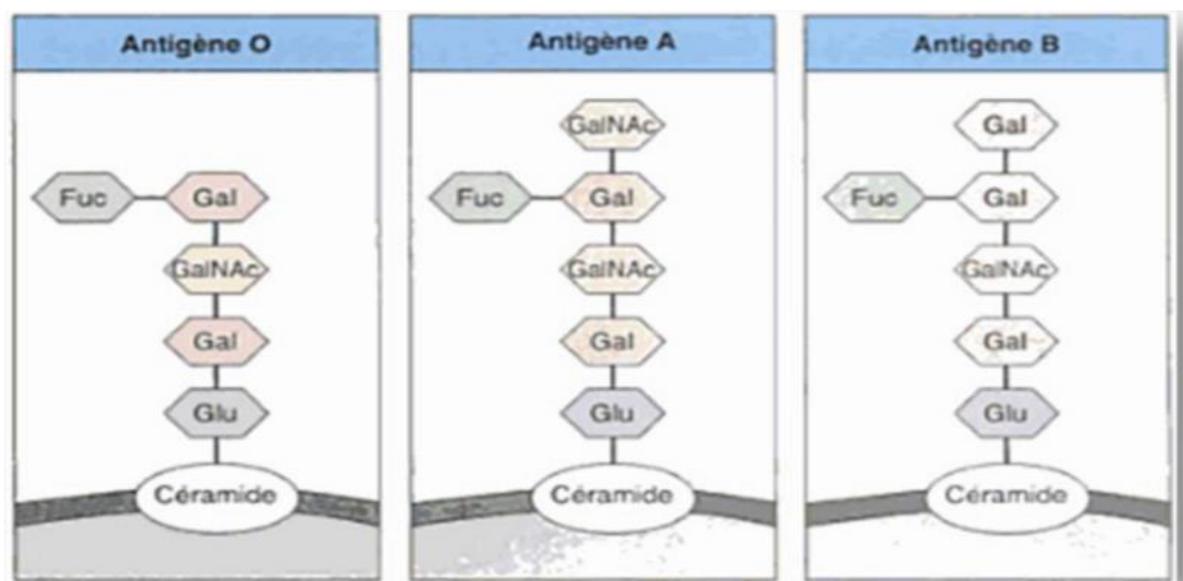


Figure 7: La structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (**Parham, 2000**).

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**).

L'antigène Rh est la partie du système Hh qui est présente sur la surface des hématies, dont les personnes ont le sang avec cet antigène sont dites Rh+, tandis que les autres sont Rh- (**Boucher, 2008**).

Dans le sérum on trouve toujours l'anticorps correspondant aux antigènes ou à l'antigène absent des globules rouges. Ainsi les sujets du groupe A ont toujours un anti-B, les sujets du groupe B ont toujours un anti-A, les sujets de groupe AB n'ont pas d'anticorps et les sujets de groupe O ont les deux anticorps anti-A et anti-B (voir tableau IV) (**Gregory, 2005**).

Tableau IV : 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%

4 Les lectine et le system ABO

Plusieurs lectines agglutinent les hématies avec une spécificité de groupe sanguin (**Bird, 1974**) (voir tableau V). En utilisant des extraits de plantes (lectines) on peut subdiviser des sujets A en deux sous-groupes :

A1 (80% des A) elles sont fortement agglutinées par la lectine anti-A1 de *Dolichos biflorus*

A2 (20% des A) elles n'agglutinent pas par *Dolichos biflorus* mais faiblement agglutinées par *Ulex europaeus*.

Tableau V : La spécificité des lectines d'origine végétales aux groupes sanguins (**Doumbia, 2004**).

Plante	<i>Phaseolus limensis</i>	<i>Dolichos biflorus</i>	<i>Ptita plumosa</i>	<i>Crotalaria striata</i>	<i>Lotus tetragonolus/ Ulex europaeus</i>	<i>Iberis amaras</i>	<i>Vicia graminea</i>
Spécificités	Anti-A	Anti-A1	Anti-B	Anti-A+B	Anti-H	Anti-M	Anti-N

***Chapitre III : Les
plantes médicinales***

Les plantes médicinales

Malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement.

Environ 35 000 espèces des plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales. Les plantes médicinales sont des drogues végétales, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leurs principes actifs sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits du soin (Hans, 2007).

1 *Anacyclus Pyrethrum L*

1.1 Généralité

Anacyclus pyrethrum L est une plante aromatique médicinale méditerranéenne, largement utilisée dans la phytothérapie (Hans, 2007). Il est Originaire de l'Afrique du Nord, il a été cultivé à l'échelle expérimentale dans les régions himalayennes par des graines importées d'Algérie (Auhman, 1995).

1.2 Noms communs

Arabe : Aerq chleuh / tagandas

Français : Pyrèthre d'afrique

Anglais: Pillitory of Spain (Azzi *et al.*, 2012).

1.3 Classification scientifique

Règne : Plantae

Division: Magnoliophytae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Asteraceae

Famille : Asteraceae

Genre : *Anacyclus*

Espèce: *Anacyclus*

Pyrethrum L

(Annalakshmi *et al.*, 2012)



Figure 8 : *Anacyclus pyrethrum L*

1.4 Description botanique

Le Pyrèthre d'Afrique est une plante vivace couchée, ressemblant à la camomille. Chacun des tiges porte une grande fleur terminale, le disque étant jaune et les rayons blanc, teinté de pourpre dessous. Les feuilles sont lisses, alternent, et pennées, vert pâle. Les racines sont longues, épaisses, fibreuses, brunes à l'extérieur et blanches au-dedans (**Figure 8**) (**Auhman, 1995**).

1.5 Utilisations médicinales

- La racine de Pyrèthre d'Afrique était utilisée dans le cas des maux des dents et de tête. Elle est employée essentiellement sous forme de gargarismes pour traiter les angines et les problèmes de digestion, voire les paralysies de la langue ou la léthargie (**Hans, 2007**).
- Les extraits organiques des racines sont avérés avoir certaines activités antibactériennes, et antioxydant, ils sont aussi actifs contre les levures. (**Elazzouzi et al., 2014 ; Vichitra et al., 2013**).
- L'extrait racinaire d'*Anacyclus pyrethrum L* inhibe l'acétylcholinestérase ce qui améliore la mémoire (**Gupta et al., 2014**). Egalement il est utilisées dans le traitement du diabète melitus (**Azzi et al., 2012**).
- Les racines ont une légère odeur aromatique et un goût piquant, exciter remarquablement le flux de salive, ils stimulent les glandes salivaires, ils sont considérées comme sialagogue (**Selles et al., 2012**). et stimulent la sécrétion des hormones sexuelles LH, FSH et la testostérone chez les males (**Rad et al., 2014**).
- Les racines sont également utilisées en tant qu'insecticide et anti-mycose, leur infusion est utilisée en cas d'asthme, rhumes et dans les rhumatismes et névralgie (**Selles et al., 2012**).

2 *Brassica napus L*

2.1 Généralité

Brassica napus L est une plante médicinale et alimentaire, elle constitue la plus importante culture d'oléagineux en Europe du Nord, Canada et la Chine (**Gregor et al., 2009**). Elle est cultivée dans l'Asie, le Nord d'Afrique et l'Ouest d'Europe (**Saeidnia et Gohari, 2012**).

2.2 Noms communs

Nom scientifique : *Brassica napus L*

Nom vernaculaire : Navet /Colza (**Ghourri et al., 2013**)

2.3 Classification scientifique

Règne : Plantae
Division: Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous classe : Dilleniidae
Ordre : Capparales
Famille : Brassicaceae
Genre : *Brassica*
Espèce : *Brassica napus L*
(Gregor et al., 2009).



Figure 9 : *Brassica napus L*

2.4 Description botanique

Toutes les feuilles de *Brassica napus L* sont bruneuses, bleuâtres, les feuilles inférieures faiblement poilues, Les fleurs épanouies ne dépassent pas les boutons avec des pétales jaune vif, longs de 11-18 mm le calice dressé verticalement à la fin. Ses fruits longs de 5-10 cm, la plupart sans graines qui sont faiblement réticulées. Sa taille 100-140 cm (**Figure 9**) (**Gregor et al., 2009**).

2.5 Utilisations médicinales

- Les Brassicacées constituent une famille importante des plantes qui sont couramment utilisées dans l'alimentation humaine et animale, aussi dans des applications pharmaceutiques et cosmétiques.
- Le jus et la salade de rhizome de *Brassica napus L* fermenté est administré comme un remède de diabète (**Ghourri et al., 2013**).
- Des études suggèrent que la consommation de *Brassica napus L* réduit les risques de cancer du foie, des intestins grêles, des poumons et de pancréas, et le cancer des glandes mammaires (**Pawel, 2014**).
- Les Brassicacées sont très utilisées en médecine traditionnelle, par exemple dans les régions marocaines les feuilles de l'espèce *Brassica napus L* sont utilisées par voie interne comme réchauffant. Egaleme nt elle est utilisée dans l'affection de la vésicule biliaire, douleurs d'estomac, anorexie et la toux (**Bellakhdar, 1997**).

- L'huile extraite des graines de colza (*Brassica napus L*) est riche en acides oléique et linoléique est largement utilisé dans l'alimentation humaine (**Montaut *et al.*, 2012**).
- *Brassica napus L* a des propriétés antivirales, antibactériennes et des effets anti-inflammatoires, induit la mort cellulaire via l'apoptose et inhibe la formation de tumeur du vaisseau sanguin et la migration des cellules tumorales (**Herr *et Büchler*, 2010**).

3 *Calycotome spinosa L link*

3.1 Généralité

Calycotome spinosa L Link est une plante vivace Cultivée comme une plante ornementale (**Damerdji *et Djeddid*, 2012**). Il est largement distribué dans les régions méditerranéennes, surtout en Algérie (**Chikhi, 2014**).

3.2 Non communs

Nom scientifique : *Calycotome spinosa L Link*

Nom vernaculaire : Genêt épineux ou Calycotome épineux.

Nom arabe : Guendoul (**Damerdji *et Djeddid*, 2012**).

3.3 Classification scientifique

Règne : Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Calycotome*

Espèce : *Calycotome spinosa L Link*

(**Damerdji, 2011**)



Figure 10: *Calycotome spinosa L Link*

3.4 Description botanique

Calycotome spinosa L Link est un arbuste épineux pouvant atteindre 1 et même 2 m de hauteur. Les rameaux sont fortement imbriqués, la racine porte habituellement des nodosités. Les feuilles trifoliées et les fleurs de couleur jaune (**Figure 10**) (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

3.5 Utilisation médicinales

- Malgré leurs avantages qui résident dans leur capacité de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés grâce aux nodosités sur leurs racines, le genêt épineux est utilisé dans la phytothérapie (**Mokhtari, 2012**).
- Dans les indications thérapeutiques le *Calycotome spinosa L* est utilisée comme un anti-ictérique (**Sari, 2013**).
- Les fleurs et les feuilles de *Calycotome spinosa L Link* sont riches en flavonoïdes, qui sont utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des cas de cancer, et des ulcères gastroduodénaux (**Larit et al., 2012**). Le genêt épineux a des propriétés antioxydants et anti inflammatoires (**Larit et al., 2012**).

4 *Urtica dioica L*

4.1 Généralité

Urtica dioica L est une plante aromatique médicinale, connue par son contact irritant, d'où son nom *Urtica* signifiant «celle qui brûle », elle est largement distribuée dans tous les régions du monde (**Hans, 2007 ; Francine, 2005**).

4.2 Nom commun

La grande ortie, l'ortie vivace ou l'ortie dioïque (**Francine, 2005**).

4.3 Classification scientifique

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Urticales

Famille : Urticaceae

Genre : *Urtica*

Espèce : *Urtica dioica L*
(**Francine, 2005**).



Figure 11 : *Urtica dioica L*

4.4 Description botanique

L'Ortie est dioïque c'est-à-dire qu'il y a des pieds mâles et des pieds femelles. Les fleurs apparaissant de juin à septembre, sont disposées à l'aisselle des feuilles, en grappes ramifiées dans toute la partie supérieure de la plante. Les feuilles sont grandes et opposées deux par deux de forme ovale bien plus longues que larges, terminées en pointe et à fortes dents triangulaires. Les tiges sont fortes, dressées, non ramifiées et à section carrée, le limbe et le pétiole sont couverts de trois sortes de poils (**Figure 11**) (**Francine, 2005**).

4.5 Utilisation médicinales

- L'Ortie est un remède traditionnel utilisé contre l'anémie et le manque d'énergie, c'est un excellent fortifiant général grâce à sa haute teneur en fer et en vitamine C et autres minéraux. Elle stimule les fonctions digestives et améliore l'attention intellectuelle et agit favorablement sur l'anxiété et les états dépressifs. Elle est diurétique et astringente (**Cazin, 1997**).
- Par voie interne elle stimule l'hématopoïèse et prescrite comme diurétique dans l'arthrite, les rhumatismes articulaires, elle aussi stimule la production enzymatique du pancréas ce qui favorise la cicatrisation, elle est aussi utilisée dans le traitement des maladies des voies biliaires (**Cazin, 1997**). Par voie externe, elle est utilisée comme un antipelliculaire et contre les cheveux gras. (**Hans, 2007**).
- *Urtica dioica* L a une grande variété d'utilisation dans la médecine traditionnelle pour les maladies génito-urinaires, allergies, le tractus gastro-intestinal et les douleurs musculo-squelettiques (**Dizaye et al., 2013**).
- L'ortie est largement reconnue et utilisée dans la phytothérapie, la racine est considérablement employée comme médicament de l'adénome prostatique bénin, sous forme d'extraits fluides (**Wichtl et Anton, 2003**).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et méthodes

Introduction

Ce travail vise à étudier l'activité hémagglutinante des lectines extraites de quatre plantes médicinales. Détermination de l'activité des extraits bruts sur les hématies des groupes sanguins humains (ABO). Extraction des lectines à partir des extraits bruts ayant présentées une activité hémagglutinante, avec des études biologiques.

I Le matériel

I.1 Le matériel vivant

Les hématies utilisées sont issues de sang du lapin.

Le sang humain collecté à partir de laboratoire d'Hôpital Mouhamed Boudyef El khroube.

Les bactéries et champignons fournis par le laboratoire d'analyse Obira à Constantine et laboratoire de Génie de Microbiologie et Application à Université Frères Mentouri

Tableau VI: Les micro-organismes utilisés et les pathologies associées.

	espèce	Caractéristiques	Pathologies associées
Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	bactérie Gram positif, ubiquitaire	gastro-intestinales et les infections aigue (la pneumonie ou la septicémie)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	bactérie Gram négatif ubiquitaire. tube digestif et l'appareil respiratoire	infections respiratoires, abcès pulmonaires, infections intestinales et urinaires
	<i>Staphylococcus aureus</i>	bactérie Gram positif la flore humaine et le nez et la peau	la brutale de nausées, de vomissements et des douleurs abdominales
	<i>Enterobacter sp</i>	Gram négatif, les intestins humains, le sol et les produits laitiers	Les infections nosocomiales
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif la flore intestinale des mammifères	les gastro-entérites, des infections urinaires, méningites.
Levures	<i>Candida albicans</i>	les muqueuses humaines (muqueuses digestive et gynécologique)	infections fongiques, candidose et l'infection superficielle cutanée.
Champignons	<i>Aspergillus fumigatus</i>	sol, la matière organique, du compos	l'irritation, inflammation, asthme et l'aspergillose broncho-pulmonaire.
	<i>Aspergillus niger</i>	sol, de la matière organique, les copeaux du bois	les mycoses pulmonaires
	<i>Aspergillus flavus</i>	sol, de la matière organique, du compos	produire de composés plus ou moins toxiques tel que l'aflatoxine

Matériels et méthodes

I.2 Le matériel végétal

Nos travaux ont été effectués sur les racines de quatre plantes médicinales. Il s'agit de :

Anacyclus pyrethrum L ; *Brassica napus L* ; *Calycotome spinosa L Link* ; *Urtica dioica L*

I.2.1 Récolte des plantes

Les racines de *Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* ont été récoltées de la de la montagne de Bani Yaokoube-Ibn Badise à Constantine au mois de mars 2015. Les racines de *Brassica napus L* ont été collectées de la région Ali-Mendjli à Constantine au mois mars 2015.

I.2.2 Préparation des plantes

Lavage : Les racines ont été bien rincées avec l'eau et débrasées de toute impureté.

Séchage : Les racines des plantes ont été séchées à température ambiante pendant 21 jours (photo1)

Broyage : Les racines ont été coupées minutieusement, puis ils sont broyées dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre, cette dernière a été tamisé et conservé dans un emballage en verre fermé.



Anacyclus pyrethrum L



Brassica napus L



Urtica dioica L



Calycotome spinosa L(link)

Photo 1: Les racines sèches des quatre plantes médicinales.

II L'étude biologique

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

Principe

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

Technique

30 ml du tampon PBS (0,1 M pH 7,4) (**Annexe 01**) a été ajouté à 9 g de poudre des racines, l'ensemble est agité, et laissé pendant 24 h à 4 °C, après la centrifugation de cette suspension à 6000 tour /minute pendant 30 minutes, le surnageant a été récupéré et conservé au frais. Ce surnageant formé, représente **l'extrait brut**, qui est d'abord été testé sur les hématies, puis passé dans la colonne de chromatographie (voir Figure 12).

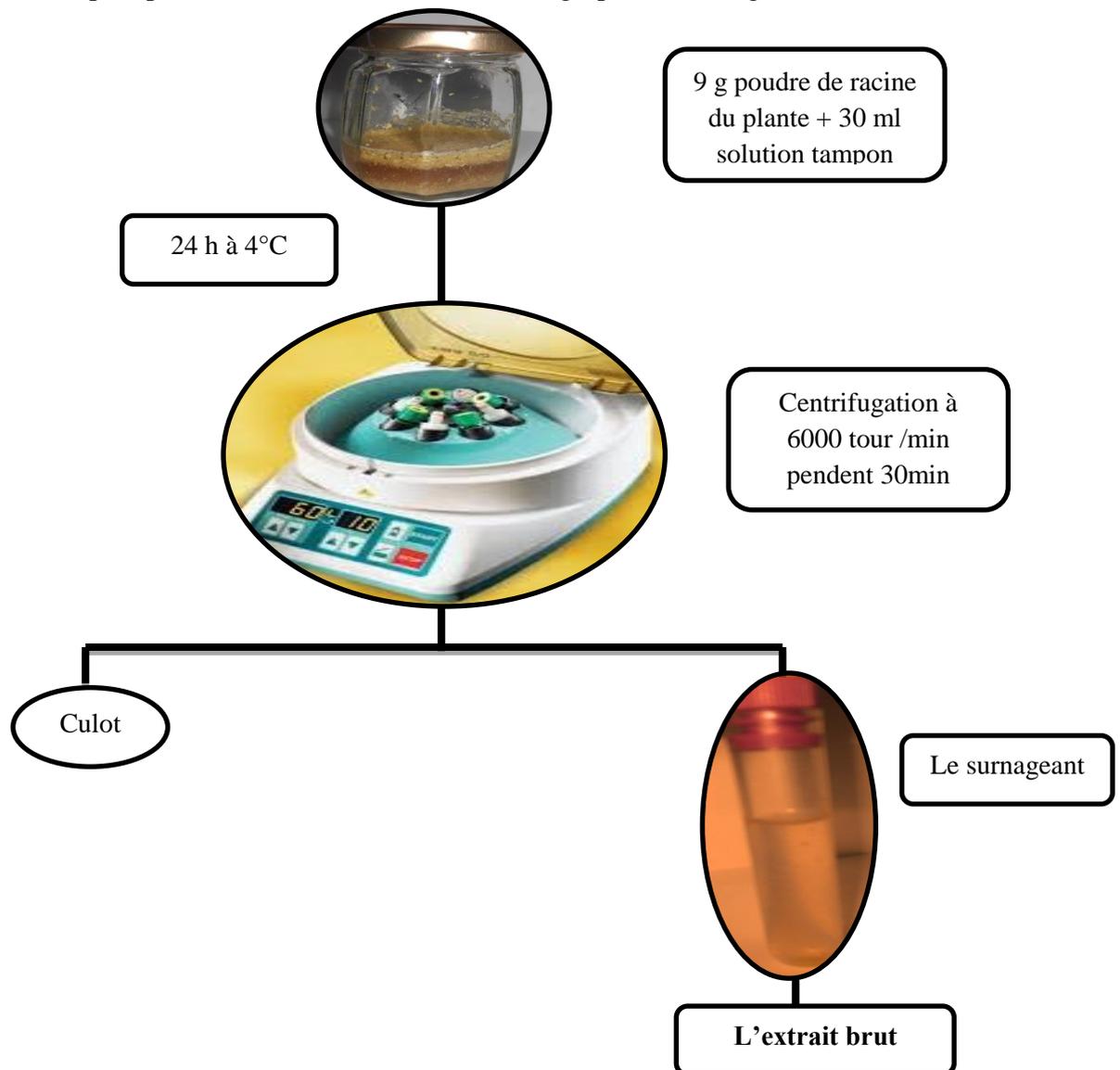


Figure 12 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.

II.2 Le test d'héماغglutination

Le teste d'héماغglutination a été effectuée pour la mise en évidence la présence des lectines dans les extraits. Ce test est basé sur l'observation de l'agglutination, et donc de la précipitation des érythrocytes en présence de lectine. Il a été porté sur les hématies du lapin.

II.2.1 Préparation des hématies à 3%.

Les hématies humaines (ABO) et celle du lapin collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

A) Lavage des hématies

Une quantité de sang (environ 3 ml) a été posé dans un tube. Après avoir bien bouché il a été centrifugé à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant a été versé ensuite une solution physiologique (sérum saline 0,9%) a été ajouté au culot (hématies tassées au fond du tube) jusqu'au trait limite de tube. Cette opération de lavage a été reprise quatre fois dans les mêmes conditions.

B) Dilution des hématies

Après le quatrième lavage des globules rouges, elles sont diluées avec le chlorure de Sodium 0,9% (NaCl), sachant que 1,5 ml des hématies dans un 48,5 ml afin d'obtenir d'hématies à 3%.

II.2.2 Technique d'héماغglutination

Dans chaque puits d'une microplaque 50 µl des hématies 3% du lapin ont été ajouté à 50 µl d'extrait brut de chaque plante. Après 1 h l'agglutination est observée par l'œil nu et à l'aide d'un microscope optique (**G×40**).

II.3 Le teste de limite d'héماغglutination

Ce test permet de déterminer le pouvoir agglutinante et en déduire le titre en lectine.

Technique

Dans une première étape, 50 µl de tampon ont été déposés dans chaque puits, ensuite un volume de 50 µl d'extrait a été ajouté au premier puits, puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants.

Matériels et méthodes

Un volume de 50 µl des hématies a été ajouté aux extraits d'éluées dans chaque puits. La lecture d'activité hémagglutinante a été réalisée après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

II.4 Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO

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

Technique

Dans un puits d'une microplaque, 50 µl des hématies de chaque groupe a été ajouté à 50 µl d'extrait de plante. Après 1heure d'incubation, la lecture a été faite à l'œil nu et l'aide d'un microscope optique (**G×40**).

II.5 Le test d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides

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

Technique

Dans un puits d'une microplaque, 50 µl de solution de saccharides (100 mg/ml) (glucose, galactose, mannose, lactose et le N-acétyle glucosamine) sont ajoutées à 50 µl d'extrait.

Après l'incubation du mélange pendant 1h à température ambiante, 50 µl des hématies du lapin 3% ont été rajoutées, la lecture a été effectuée après 1 h à l'œil nu et l'aide d'un microscope optique (**G×40**).

II.6 Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides

Ce test a été effectué sur les extrait bruts ayant présentées une spécificité pour un ou plusieurs saccharides qui inhibent leur activité d'hémagglutination. Il a été réalisé à fin de déterminé la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'hémagglutination.

Technique

50 μ l du tampon ont été déposés dans chaque puits d'une microplaque, puis 50 μ l de solution de saccharide (100 mg/ml) (**Annexe 02**) sont ajoutées au premier puits, ensuite une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants.

Un volume de 50 μ l a été ajouté dans chaque puits, et le mélange est incubé pendant 1 heure à température ambiante. Enfin un volume de 50 μ l des hématies 3 % a été ajouté dans chaque puits. Après 1 heure à température ambiante la lecture a été faite à l'œil nu et par l'observation microscopique (**G \times 40**).

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

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante a été déterminé par la mise en œuvre de test hémagglutinante des lectine en utilisant les tampons à différentes valeurs de pH en allant de 1 à 12, chaque tampon a été mélangé avec la poudre de racine. Après 24 h à 4 °C, le test d'hémagglutination est effectuée sur le surnageant.

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

Cinq tubes à essai, contenant chacun une aliquote de l'extrait brut ont été incubés à des températures différentes (40, 60, 80, 100, 120 °C) dans un bain marie pendant une heure de temps. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à la température ambiante, enfin le test d'hémagglutination a été fait.

II.9 Le teste de l'activité antimicrobienne des extraits

Ce teste a été effectuée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de nos extraits, il a été porté sur des souches bactériennes, des levures et des champignons.

II.9.1 Le teste de l'activité antimicrobienne vis-à-vis les bactéries et les levures

II.9.1.1 La préparation des milieux

- A) Préparation de la suspension des bactéries et de levure la souche de bactérie et de levure a été cultivée dans un bouillon nutritionnel, dont l'absorbance a été de 0,01-0,02 à 600 nm.

B) Préparation de milieu de culture

Dans une boîte de pétrie, une quantité de milieu de culture **Mueller-Hinton** (pré fondu) (**Annexe 03**) a été coulé, dont elle constitue 0,5 cm d'épaisseur, puis elle a été laissée refroidir dans une température ambiante dans une hôte à flux laminaire.

II.9.1.2 L'écouvillonnage et l'incubation

Une couche très fine (tapit fine) de la suspension de bactérie ou levure a été étalée sur le milieu de culture à l'aide d'un écouvillon, puis des disques de papier de wattman 1 (6 mm de diamètre) contiennent 30 µl de l'extrait brute de chaque plant ont été déposées, ensuite l'ensemble laisser diffuser pendant 4 h à 4 °C, la lecture a été effectuée après 24 h d'incubation à 37 °C (mesure de diamètre de zone d'inhibition).

II.9.1 Le teste de l'activité antifongique

A) Préparation de milieu de culture

Une couche de 0,5 cm d'épaisseur de milieu de culture **PDA** (Potato Agarose Dixtrose) (**Annexe 04**) a été coulée dans une boîte de pétrie, puis elle a été laissée refroidir dans une température ambiante dans un hôte à flux laminaire.

B) Cultivations et incubation

A l'aide d'un pince, des disques de papier de wattman 1 (6 mm de diamètre) contiennent 30 µl de l'extrait brute de chaque plant ont été déposées sur le milieu de culture, puis un disque de 0,6 cm de culture fongique a été déposé au centre du boîte de pétrie, l'ensemble a été diffusée pendant 4 h à 4 °C, la lecture et les mesures (diamètre de la zone d'inhibition) ont été effectuées après 5 jours d'incubation à 37 °C.

III L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne

Cette étape a été réalisée pour éliminer les impuretés contenues dans les extraits bruts, et améliorer la pureté de nos extraits.

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine consistant en billes creuses et poreuses. Les plus grosses protéines, celles qui passent carrément entre les billes, sortent en premier de la colonne. Les autres sont retardées par leurs interactions avec les billes; les plus petites protéines, qui peuvent entrer et sortir à leur guise, sont les dernières à quitter la colonne.

III.1 La préparation de colonne

Le gel séphadex G200 (domaine de fractionnement : 5 - 800 KDa) qui forme la phase fixée de la séparation, a été activé dans la solution tampon PBS (0,1 M pH 7,4) pendant 48 h à raison de 4 g de gel pour 100 ml de PBS afin d'obtenir un gel 4 %. Puis il a été coulé dans une colonne (1 cm × 10 cm) placée sur un support. La colonne doit être homogène et est dépourvue des bulles d'air.

III.2 La séparation des lectines à partir des extraits bruts

Après la stabilisation et lavage du gel avec le tampon (PBS à 0,1 M pH 7,4), l'extrait brut a été versé lentement et en petite quantité dans la colonne, puis il a été recueilli par l'élution avec le tampon.

Dans des tubes secs placés respectivement dans un porte-échantillon, des fractions de séparation de 5 ml par tube ont été récupérées.

Les extraits ainsi récupérés ont été testés sur les hématies du lapin, pour assurer que l'activité hémagglutinante est améliorée après la chromatographie sur colonne.

III.3 La spectrophotométrie à UV

Cette étape permet de quantifier les lectines séparées par chromatographie sur colonne. Elle est basée sur l'absorption de lumière par ces protéines dans une longueur d'onde 280 nm, dont les extraits ont été placés dans le spectrophotomètre à UV afin de mesurer leur absorbance, puis on a tracé la courbe d'absorbance en fonction de tube.

RÉSULTATS

Résultats

I Les résultats d'étude biologique

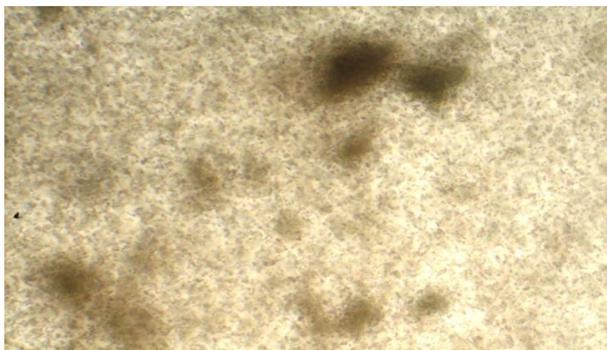
I.1 Le test d'hémagglutination

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec des globules rouges. Si une solution des hématies est placée dans un puits, la sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'ajout d'une lectine permet la formation d'un réseau entre les hématies et les lectines, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène, ceci correspond au phénomène d'hémagglutination.

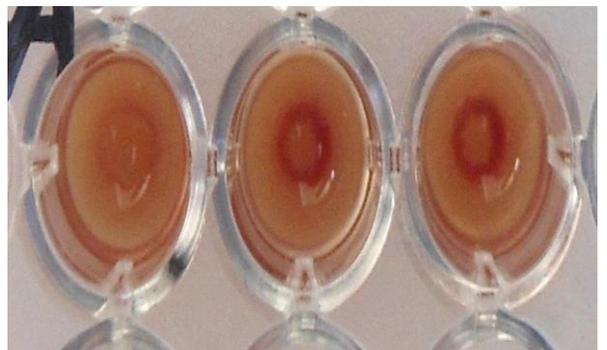
Tableau VII : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

Plante	Tests d'agglutination
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	++
<i>Brassica napus L</i>	++
<i>Calycotome spinosa L</i>	+++
<i>Urtica dioica L</i>	++

++ : forte agglutination, +++ : très forte agglutination



Observation microscopique (G x40)



A l'œil nu

Photo 2 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d'*Anacyclus pyrethrum L*.



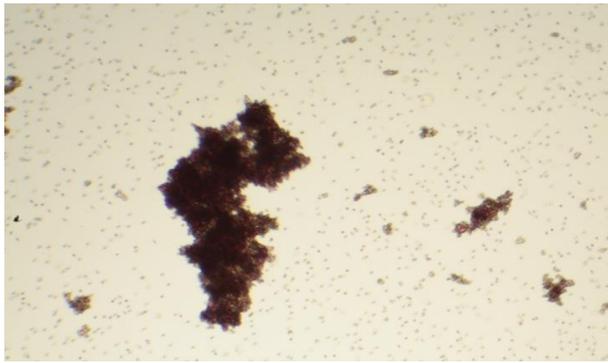
Observation microscopique (G x40)



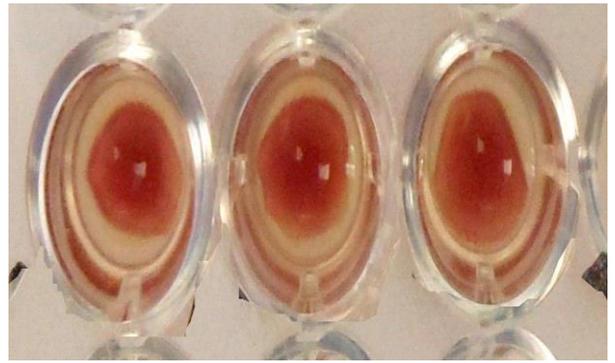
A l'œil nu

Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Brassica napus L*.

Résultats

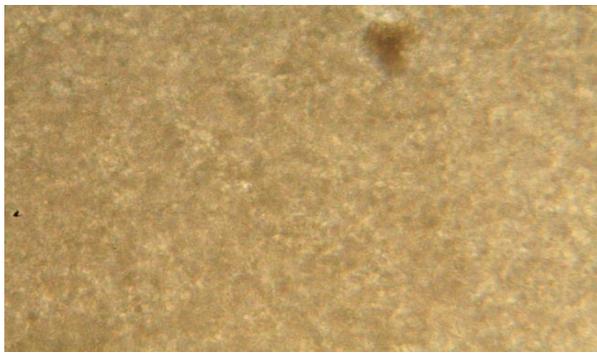


Observation microscopique (G ×40)

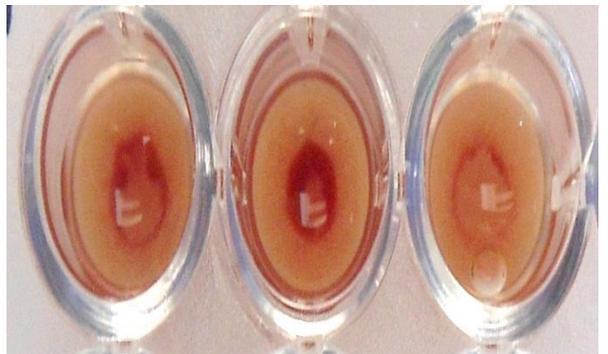


A l'œil nu

Photo 4 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Calycotome spinosa L link.*



Observation microscopique (G ×40)



A l'œil nu

Photo 5 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d'*Urtica dioica L.*

I.2 Le teste de limite d'hémagglutination

L'activité hémagglutinante est exprimée en titre qui est la réciproque du plus grand rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination.

Tableau VIII : L'activité hémagglutinante des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

Dilution \ Extrait	1:2	1:4	1 :8	1 :16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Brassica napus L</i>	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
<i>Calycotome spinosa L</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
<i>Urtica dioica L</i>	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-

+++ : Très forte agglutination, ++ : Forte agglutination, + : faible agglutination, - : absence d'agglutination

Résultats

- L'activité hémagglutinante des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* a été de 1:7 (128), tandis q' elle a été de 1:6 (64) pour l'extrait du *Brassica napus L*.

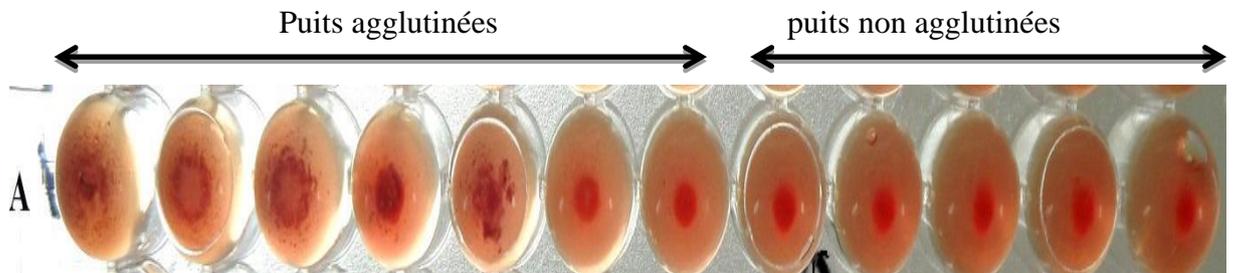


Photo 6 : La limite d' hémagglutination d'*Anacyclus pyrethrum L*.

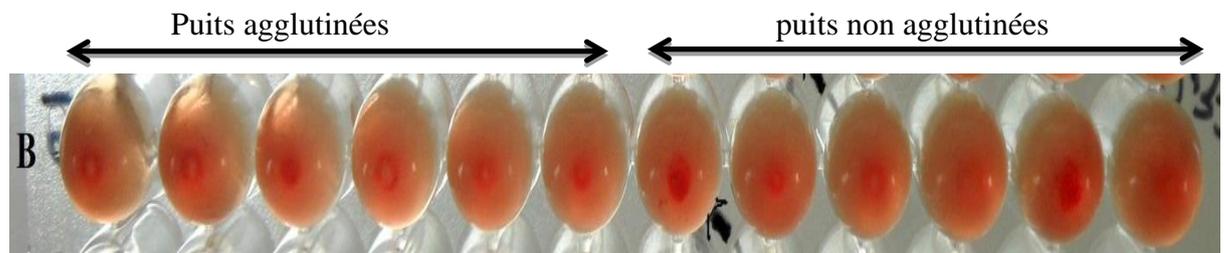


Photo 7 : La limite d' hémagglutination de *Brassica napus L*.

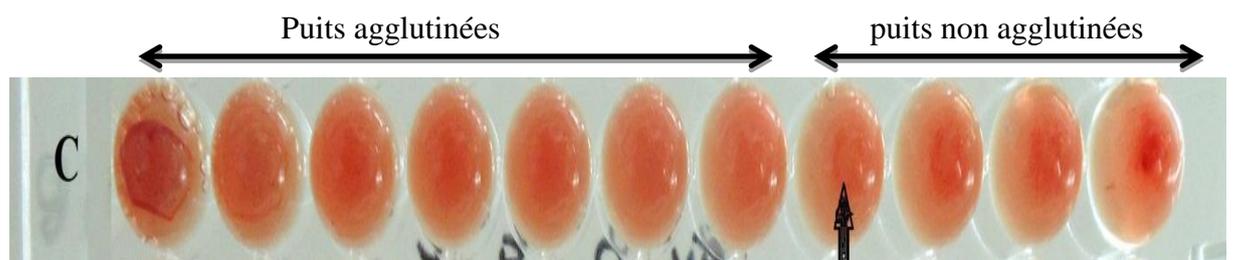


Photo 8: La limite d' hémagglutination de *Calycotome spinosa L*.

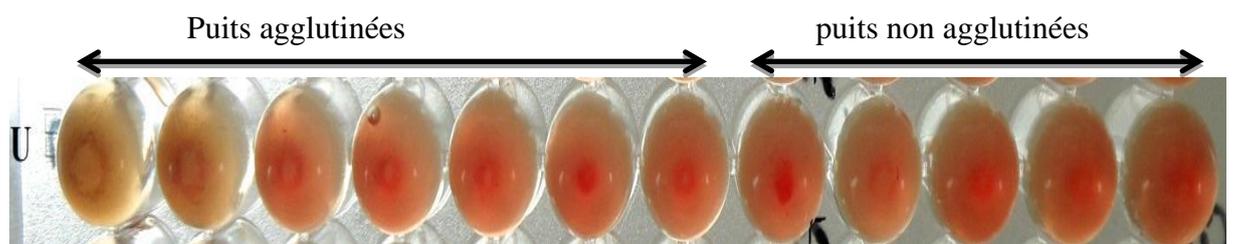


Photo 9: La limite d' hémagglutination d'*Urtica dioica L*.

Résultats

I.3 Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO

Tableau IX: L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

Groupe sanguin \ Extrait brut	A	B	O	AB
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	-	+	-	+
<i>Urtica didica L</i>	+	+	+	+
<i>Brassica napus L</i>	-	-	-	-
<i>Calycotome spinosa</i>	+	+	+	+

- : absence d'agglutination, + : agglutination.

- Les extraits de *Urtica dioica L* et *Calycotome spinosa L* agglutinent tous les types des groupes sanguins.
- L'extrait de *Brassica napus L* n'agglutine aucune des types des groupes sanguins.
- L'extrait d'*Anacyclus pyrethrum L* agglutine le groupe B avec AB.

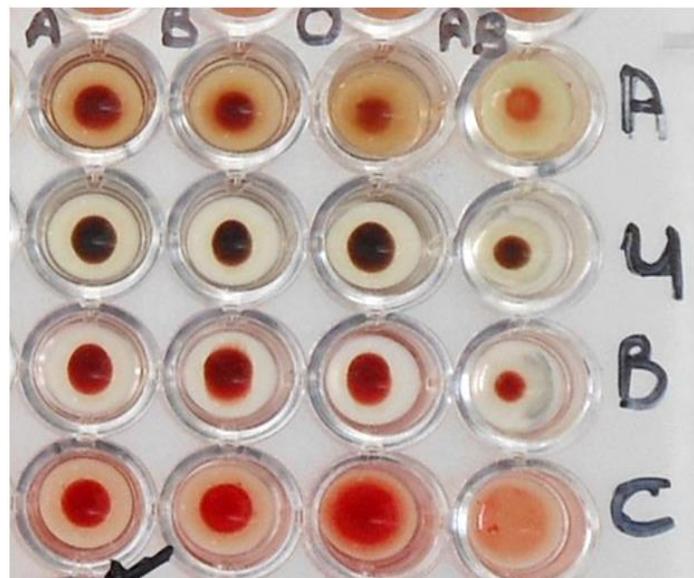


Photo 10 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par les quarts extraits bruts ; (A) : *Anacyclus pyrethrum L*, (B) : *Brassica napus L*, (C) : *Calycotome spinosa L*, (U) : *Urtica dioica L*.

Résultats

I.4 Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides

Le test d'inhibition a été effectué avec certains saccharides (glucose, galactose, mannose, lactose et le N-acétyle glucosamine) pour déterminer la spécificité des extraits aux glucides. L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que les hématies, les résultats obtenus ont été décrit dans le tableau suivant :

Tableau X: Le test d'inhibition des extraits bruts avec le glucose, galactose, mannose, lactose et le N-acétyle glucosamine.

Saccharide	Glucose	Galactose	Mannose	Lactose	N-acétyle glucosamine
Extrait brut					
<i>Urtica dioica L</i>	-	-	-	-	+
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	-	-	-	-	*
<i>Brassica napus L</i>	+	+	+	-	*
<i>Calycotome spinosa L</i>	-	-	-	-	*

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

- L'extrait *Anacyclus pyrethrum L* et *Calycotome spinosa L* n'ont pas été inhibé par des saccharides testés.
- L'extrait d'*Urtica dioica L* a été spécifiquement inhibé par le N-acétyle glucosamine.
- L'extrait de *Brassica napus L* a été spécifiquement inhibé par trois saccharides : glucose, galactose et mannose.

Remarque : le N-acétyle glucosamine n'a été pas testée avec les extraits que sur celle d'*Urtica dioica L* à cause de leur déficit.

I.5 Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides

A/ Les concentrations minimales en glucose, galactose et mannose, provoquant l'inhibition d'hémagglutination des lectines de *Brassica napus L*, sont présentés dans le tableau suivant :

Résultats

Tableau XI: Les concentrations minimales en glucose, galactose et mannose, provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait de *Brassica napus L*

Dilution \ Saccharide	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++

- : inhibition, + : faible agglutination, ++ : Forte agglutination

- La concentration minimale de mannose et galactose capable d'inhiber l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Brassica napus L* a été respectivement **0,781mg/ml** et **0,390 mg/ml**
- L'inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Brassica napus L* par le Glucose a été plus forte, la concentration minimale du glucose inhibe l'hémagglutination < **0,0244 mg/ml**.

La double dilution

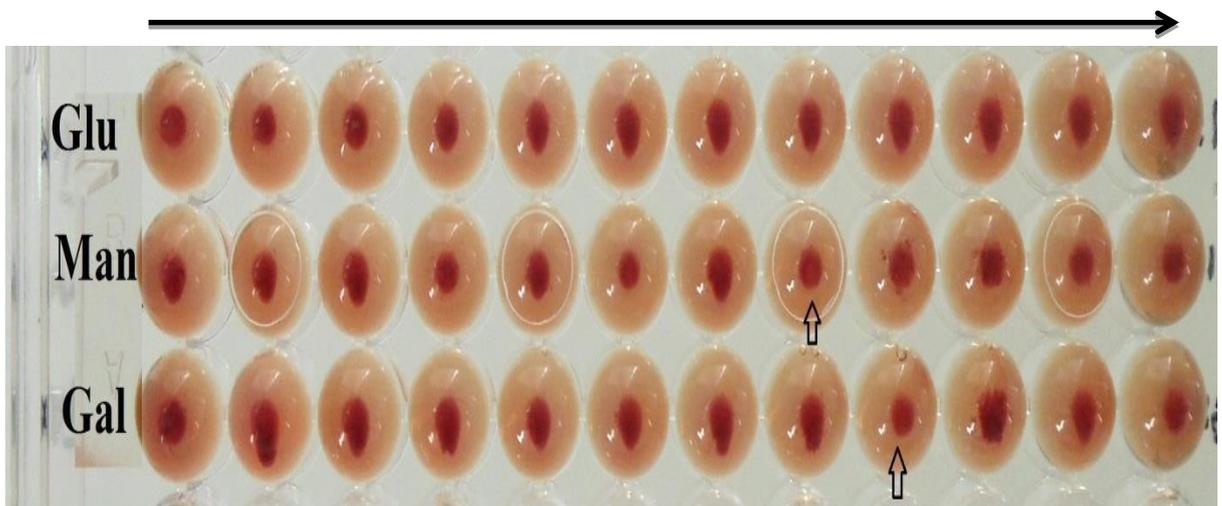


Photo 11 : Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de *Brassica napus L* avec trois monosaccharides ; le glucose, galactose et mannose. (↑) : début d'agglutination.

B/ Pour les concentrations minimales en N-acétyl glucosamine, provoquent l'inhibition d'hémagglutination d'extrait d'*Urtica dioica L*, les résultats obtenus ont été présenté dans le tableau suivant :

Résultats

Tableau XII: La limite d'inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait d'*Urtica dioica L* par le N-acétyl glucosamine

		Dilution											
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1:3 2	1 : 64	1 :1 28	1 :2 56	1 :5 12	1 :10 24	1 :20 48	1 :40 96
<i>Urtica dioica L</i>	N-acétyl glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : inhibition.

- l'inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait d'*Urtica dioica L* par le N-acétyl glucosamine a été plus forte, la concentration minimale du N-acétyl glucosamine inhibe l'hémagglutination < **0.0244 mg/ml**.



Photo 12: Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait d'*Urtica dioica L* par le N-acétyl glucosamine.

I.6 L'effet de pH sur l'hémagglutination

Tableau XIII: L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

pH extrait	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Brassica napus L</i>	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Calycotome spinosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Urtica dioica L</i>	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++

+++ : Très forte agglutination, ++ : Forte agglutination, - : absence d'agglutination.

Résultats

- Les extraits bruts de *Brassica napus L* et d'*Urtica dioica L* ont été remarquablement stables dans la gamme du pH de **4 à 12**, avec une perte totale d'activité hémagglutinante à pH **1 à 3**, tandis que l'extrait d'*Anacyclus pyrethrum L* a été stable dans la gamme de pH de **2 à 12**, il a perdu leur activité totale à pH **1**.
- L'extrait de *Calycotome spinosa L* reste stable toute au long de gamme du pH testée de **1 à 12**.

I.7 L'effet de température sur l'hémagglutination

Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différent température sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XIV: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante les extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

Température (°C) \ Extrait	40	60	80	100	120
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	++	++	++	++	++
<i>Brassica napus L</i>	++	++	++	++	+
<i>Calycotome spinosa L</i>	+++	+++	+++	+++	++
<i>Urtica dioica L</i>	++	++	++	++	++

+ : faible agglutination, ++ : Forte agglutination, +++ : Très forte agglutination

- Le traitement thermique d'extrait racinaire d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*, a réduit significativement leur activité hémagglutinante. Mais jusqu' à 120 °C, elle n'a été pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante.

Résultats

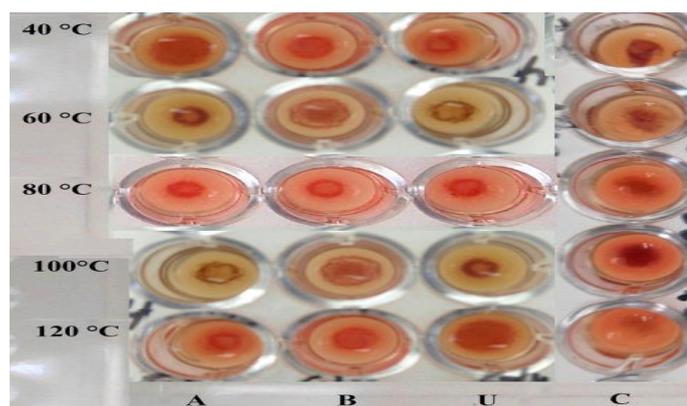


Photo 13: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante les extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*.

I.8 Le teste de l'activité antimicrobienne des extraits

I.8.1 le teste de l'activité antimicrobienne des extraits contre les bactéries et levures

L'activité antimicrobienne des extraits bruts a été examinée contre quatre espèces bactériennes et une levure, Les résultats sont établis dans le tableau suivant :

Tableau XV : L'activité antimicrobienne des extraits des quatre plantes vis-à-vis les bactéries et la levure.

Bactérie/levure Extrait	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC70603	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	<i>Enterobacter sp</i> (souche clinique)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Candida albicans</i> (souche clinique)
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	-	-	-	++ (0,5 mm)	-	-
<i>Brassica napus L</i>	-	-	-	+ (0,1 mm)	-	-
<i>Calycotome spinosa L</i>	-	-	-	+++ (1 mm)	-	-
<i>Urtica dioica L</i>	-	-	-	-	-	-

- : Absence d'activité antimicrobienne, + : inhibition d'activité microbienne avec le diamètre de zone d'inhibition

- les extraits bruts des plants ne présentent aucune action antimicrobienne contre : *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterobacter sp*, *E. coli* et *C. albicans*, cependant elles inhibent partiellement l'activité de *B. cereus* sachant que la plus grande activité est présentée par l'extrait de *Calycotome spinosa L* suivit par *Anacyclus pyrethrum L*, puis *Brassica napus L* avec un manque d'activité antibactérienne de l'extrait d'*Urtica dioica L*.

Résultats

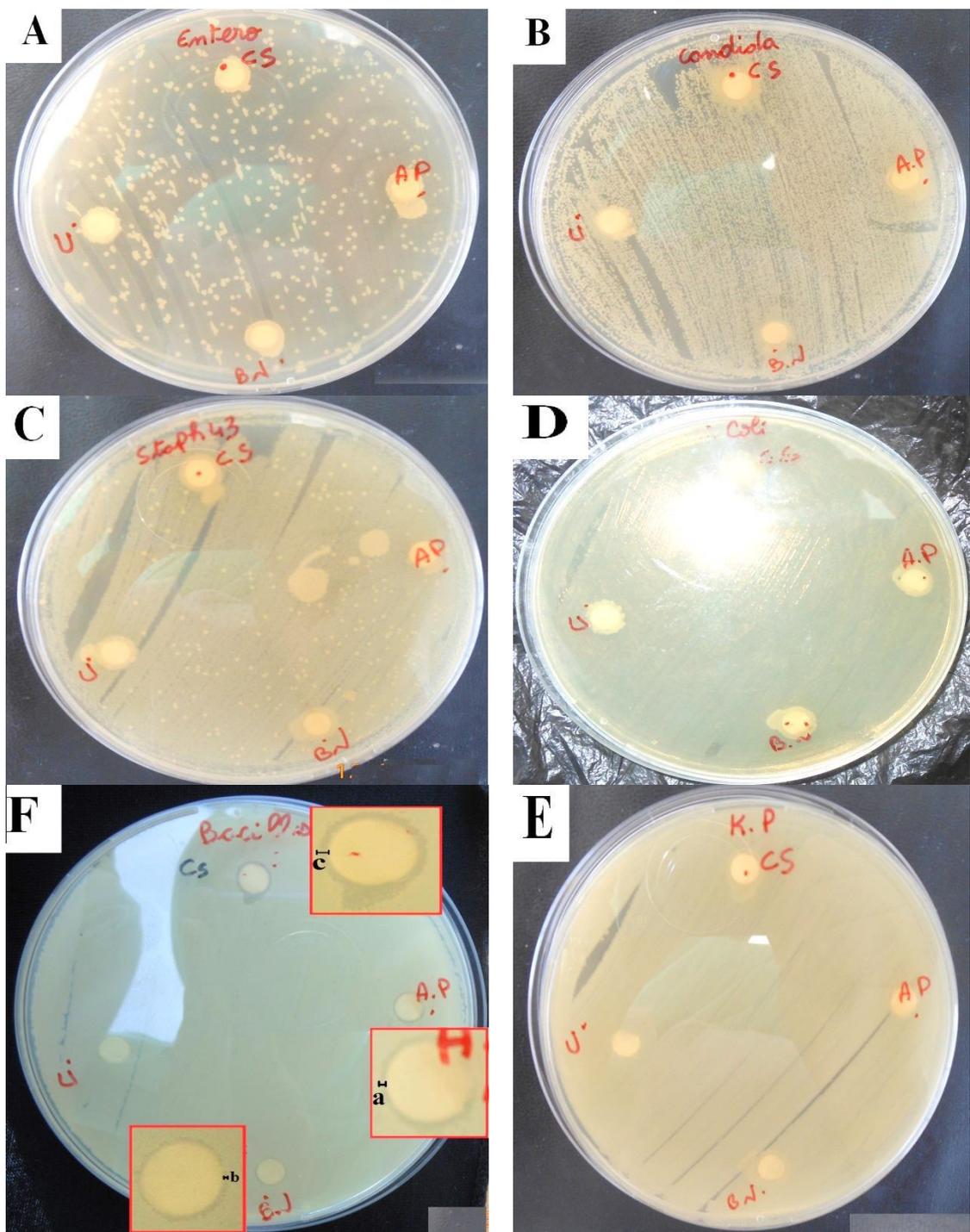


Photo 14 : L'activité antimicrobienne des extraits contre les bactéries et levure ;
A, C, D, E, B : absence de l'activité antimicrobienne de l'extrait d' *Anacyclus pyrethrum L*,
Brassica napus L, *Calycotome spinosa L*, *Urtica dioica L* respectivement contre la bactérie
Enterobacter sp, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et la levure *C. albicans*.

F : L'inhibition de l'activité bactérienne de *B. cereus* par *Anacyclus pyrethrum L* : (**a=0.5mm**),
Brassica napus L : (**b=0.1mm**), *Calycotome spinosa L* : (**c=1mm**) avec une absence de l'activité antimicrobienne chez l'extrait d'*Urtica dioica L*.

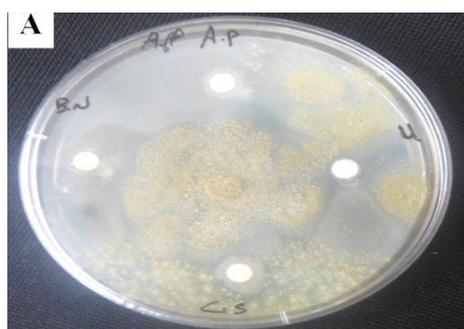
Résultats

I.8.2 Le teste de l'activité antifongique des extraits

Tableau XVI : L'activité antimicrobienne des extraits des quatre plantes vis-à-vis les champignons.

Champignon Extrait	Le diamètre la zone d'inhibition (mm)		
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Anacyclus pyrethrum L</i>	4	11	3
<i>Brassica napus L</i>	4	7	5
<i>Calycotome spinosa L</i>	2	5	1.5
<i>Urtica dioica L</i>	-	6	-

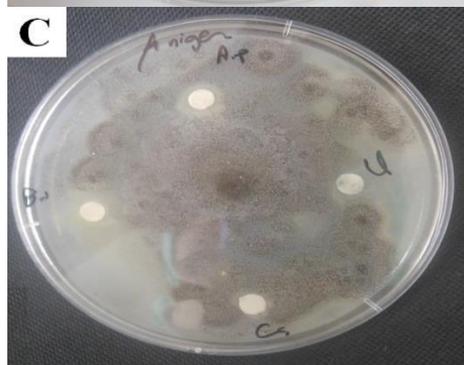
- : Absence d'activité antimicrobienne.



A : inhibition de l'activité d'*Aspergillus flavus* par les extraits des plantes : *Anacyclus pyrethrum L* : (11mm) ; *Brassica napus L* : (7mm) ; *Calycotome spinosa L* : (5mm) ; *Urtica dioica L* : (6mm)



B : inhibition de l'activité d'*Aspergillus fumigatus* par les extraits des plantes : *Anacyclus pyrethrum L* : (4 mm) ; *Brassica napus L* : (4 mm) ; *Calycotome spinosa L* : (2 mm) avec une absence de l'activité antifongique chez *Urtica dioica L*.



C : inhibition de l'activité d'*Aspergillus niger* par les extraits des plantes : *Anacyclus pyrethrum L* : (3 mm) ; *Brassica napus L* : (5 mm) ; *Calycotome spinosa L* : (1.5 mm) avec une absence de l'activité antifongique chez *Urtica dioica L*.

Photo 15 : L'activité antifongique des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* contre *Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*.

Résultats

II L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G 200

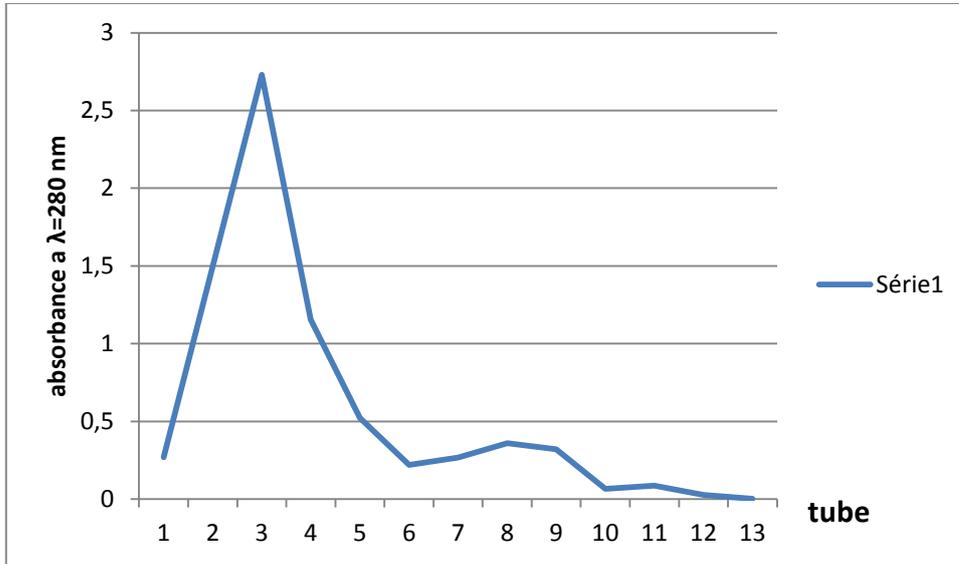


Figure 13 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait d'*Anacyclus pyrethrum L.*

Le volume de rétention : 5 ml. L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,4. La longueur d'onde : $\lambda=280$ nm.

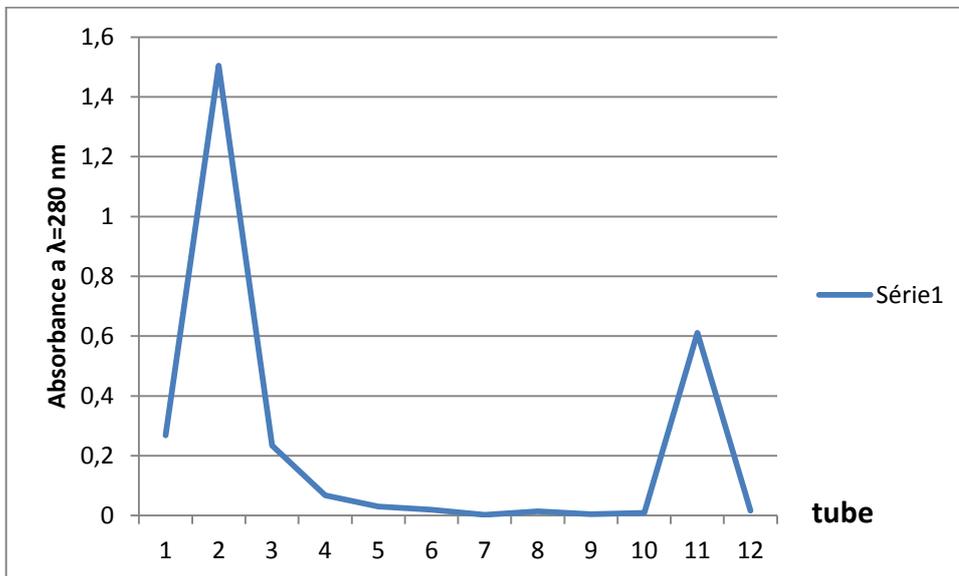


Figure 14: La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait de *Brassica napus L.*

Le volume de rétention : 5 ml. L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,4. La longueur d'onde : $\lambda=280$ nm

Résultats

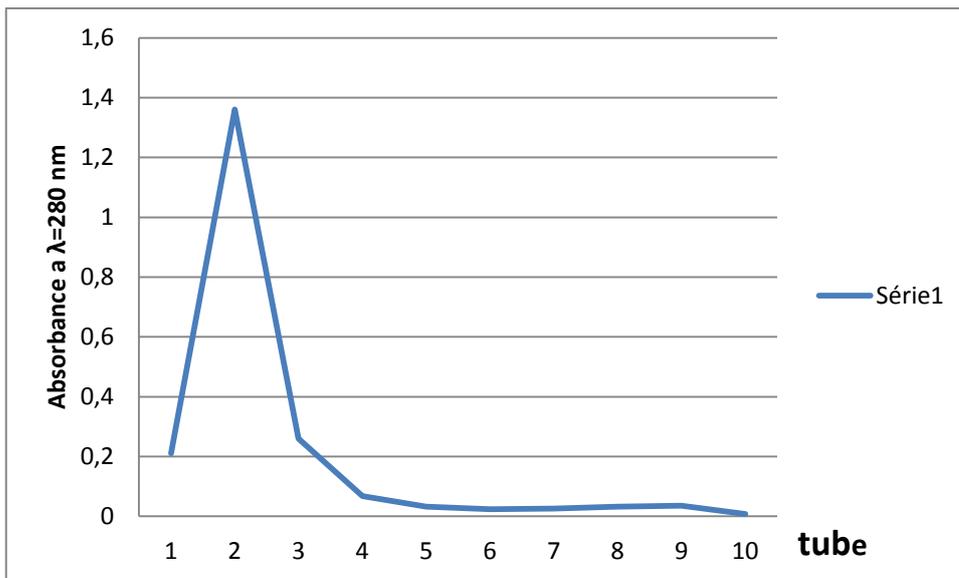


Figure 15: La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait de *Calycotome spinosa L.*

Le volume de rétention : 5 ml. L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,4. La longueur d'onde : $\lambda = 280 \text{ nm}$

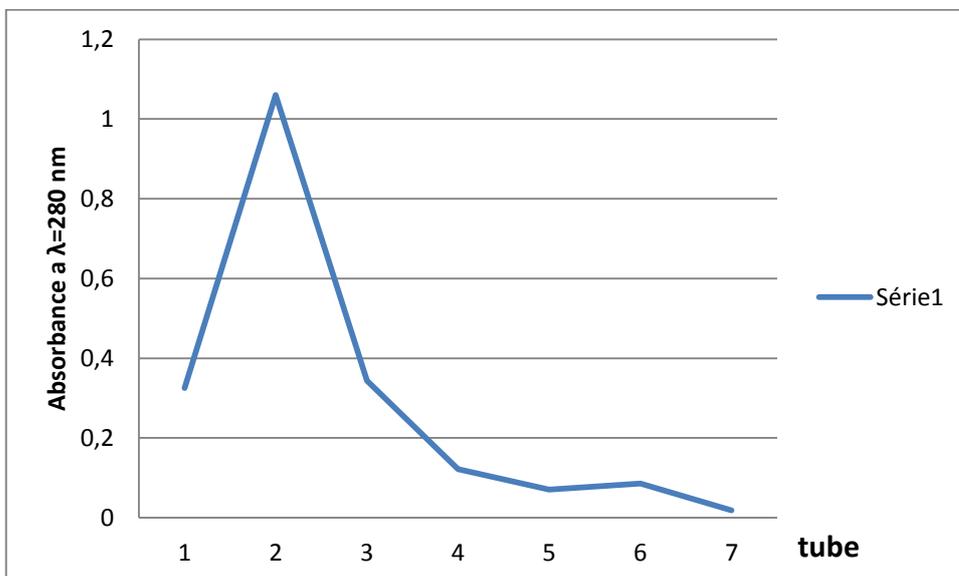


Figure 16: La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 de l'extrait d'*Urtica dioica L.*

Le volume de rétention : 5 ml. L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,4. La longueur d'onde : $\lambda = 280 \text{ nm}$

- La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G200 des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Urtica dioica L* et *Calycotome spinosa L* a donné un seul pic, correspondre aux 2^{ème} tube, par contre pour *Brassica napus L*, elle a donnée deux pic dans le 2^{ème} et 11^{ème} tube.

DISCUSSION

Discussion

Le travail que nous avons réalisé, rentre dans le cadre de chercher la présence des lectines et leur extraction et aussi l'étude biologique de ces phytoagglutinines. Dans un premier temps, nous avons investigué l'existence de lectine au niveau des racines de quatre plantes médicinales.

Nous avons utilisé les hématies de lapin incubé avec les extraits bruts que nous avons récupéré à partir des racines des plantes à l'aide d'une solution tampon (**schéma 12**). Une fois cette présence des lectines a été établie, nous avons les testées biologiquement, Ensuite on a procédé à la chromatographie sur colonne pour les extraitées.

Les lectines ont été découvertes par leur capacité à agglutiner les érythrocytes, qui reste toujours la méthode la plus simple et la plus pratique pour détecter la présence des lectines (**Laija et al., 2010**).

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

Dans le but d'évaluer l'activité hémagglutinante des extraits des quatre plantes nous avons réalisé le test de limite d'hémagglutination.

Nos résultats ont montrées que l'activité hémagglutinante des extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* a été de 1:7 (128), tandis que l'extrait du *Brassica napus L* a une activité hémagglutinante plus faible 1:6 (64), dans une autre étude réalisée sur la lectine EHL isolé à partir d'*Euphorbia helioscopia*, l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml (**Shaista et al., 2014**).

Discussion

Dans le but d'étudier la spécificité de nos extraits à des hématies humaines et de trouver un extrait spécifique à un seul groupe et par conséquent, leur utilisation comme nouveau réactif, nous avons réalisé le test d'agglutination sur les hématies humaines (ABO).

Les extraits des deux espèces : *Calycotome spinosa L* et d'*Urtica dioica L* agglutinent assez fortement tous les types de groupe sanguins humains, Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Geotrupes stercorarius* et sur *Diplotaxis assurgens* et *Raphanus sativus* qui ont la même propriété (Devi *et al.*, 2014 ; Deeksha *et al.*, 2015). Alors nous pouvons classer les lectines de *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique.

Au contraire l'extrait de *Brassica napus L* n'agglutine aucun type des groupes sanguins humains, donc ces lectines ne présentent aucune sélectivité pour les groupes du système ABO. Ces résultats sont identiques aux celles trouvées sur le même espèce *Brassica napus L* et une espèce voisin *Brassica rappa* (Deeksha *et al.*, 2015). des résultats similaires sont obtenus avec le EHL et la lectine de l'algue *Bryopsis plumosapre* (Shaista *et al.*, 2014 ; Han *et al.*, 2010).

Dans l'autre côté nos résultats ont montré que l'extrait d'*Anacyclus pyrethrum L* a une activité d'hémagglutination sur le groupe B (avec AB), ce qui indique leur sélectivité au groupe sanguin B. ces résultats en accord avec le cas de lectine des algues rouge *Pterocladia capillacea*, qui agglutine fortement les hématies du groupe sanguin B (Necib *et al.*, 2015). Par contre les lectines de l'espèce *Morus nigra* ont présenté une spécificité pour le groupe A (Necib *et al.*, 2014). Ce résultat indique que nous pourrons utiliser la lectine d'*Anacyclus pyrethrum L* comme réactif pour le typage des groupes sanguins.

L'effet inhibition sur l'activité d'hémagglutinante des lectines par les glucides est due de leurs compétition avec les érythrocytes sur les sites de liaisons de la molécule du lectine. Ce qui interfère l'attachement de ces dernières sur la structure glucidique présente à la surface des hématies (Daoudi *et al.*, 2014).

Discussion

Pour déterminer la spécificité de nos extraits vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides. Sur le plan qualitatif ce teste a permis d'évaluée la spécificité de ces lectines aux glucides et aussi pour identifier le saccharide qu'on peut utiliser pour son purifications.

Parmi les extraits des quatre plantes utilisées, deux ont données un résultat positif :

Les extraits d'*Anacyclus pyrethrum L* et *Calycotome spinosa L* ne présentent aucune spécificité pour les saccharides testés, ce qui résulte par la suite leur agglutination aux hématies. C'est le cas des lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (Valadez *et al.*, 2011). Par contre *Astragalus monghlicus* présentent une spécificité pour le D-galactose et le lactose (Lam *et Ng*, 2011).

L'extrait de *Brassica napus L* a été spécifiquement inhibé par le glucose, galactose et mannose, cette inhibition due à l'occupation du site/des sites de reconnaissances par un ou plus de ces trois monosaccharides. Notre extrait a la même propriété de *Bryopsis plumosapre* qui reconnaisse spécifiquement le D-mannose (Han *et al.*, 2010). Ce teste aussi a été effectué sur muqueuse de cuir de l'espèce animale *Clarias gariepinus* (catfish), il a montré une spécificité pour le galactose (Odekanyin *et Kuku*, 2014).

Par conséquent, il est possible d'utiliser le glucose ou galactose ou le mannose comme ligand dans la matrice d'affinité pour la purification de/des lectines de *Brassica napus L*.

L'extrait d'*Urtica dioica L* est spécifiquement inhibé par le N-acétyle glucosamine, ce qui indique que la lectine d'*Urtica dioica L* présente un site de reconnaissance pour ce monosaccharide, des résultats identiques ont été trouvée avec le même espèce, elles représentent qu'UDA (*Urtica dioica agglutinine*) et *Nicotiana tabacum* ont une spécificité pour GlcNAc, avec une deuxième spécificité au mannose pour l'espèce *Nicotiana tabacum* (Stefanowicz *et al.*, 2012).

Le test de limite d'inhibition d'hémagglutination permet d'évaluée la concentration minimale de glucide induit l'inhibition de l'activité hémagglutinante (MIC), des deux espèces ayant présentées une spécificité pour les monosaccharides, pour cette raison des doubles dilutions d'un ligand en présence d'une concentration constante d'extraits de plante et des globules rouges ont été effectuées.

Discussion

Notre résultat de la concentration minimale en glucose, galactose et mannose capable d'inhiber l'hémagglutination des lectines de *Brassica napus L* a été variable d'un monosaccharide à autre, dont l'activité d'inhibition est inversement proportionnelle à la concentration d'inhibiteur. Dans un ordre croissant de l'activité d'inhibition la MIC a été de :

MIC mannose = 0,781mg/ml, (MIC mannose = 4.335 mM) par contre elle a été de 12,5 mM pour le même monosaccharide avec l'espèce *Geotrupes stercorarius* (Devi et al., 2014).

MIC galactose = 0,390 mg/ml, (MIC galactose= 2 ,167 mM) dans l'autre côté le lectine BUL de *Bauhinia unguolata L* présente une concentration minimale d'inhibition de l'hémagglutination de 2,1 mM ; 0,96 mM en galactose et en lactose respectivement (Silva et al., 2014).

MIC glucose < 0,0244 mg/ml (MIC glucose < 0.135 mM) ce qui indique que le glucose est un très fort inhibiteur, par contre dans le cas de la lectine ConA extraite à partir de *Canavalia ensiformis*, le glucose a été un faible inhibiteur (Kulkarni et Tayade, 2013).

Nos résultats obtenus avec le N-acétyl-glucosamine pour *Urtica dioica L* ont été similaire à celle trouvé avec notre espèce *Brassica napus L* pour le glucose, dans ce cas aussi la GlcNAc maintien leur activité d'inhibition a une trais faible concentration : **MIC GlcNAc < 0,0244 mg/ml (MIC GlcNAc <0.101mM)** au contraire chez la lectine de *Bauhinia unguolata L*, l'inhibition par le N-acétyle galactosamine a été arrêté à un seuil de 0,63 mM (Silva et al., 2014).

La plupart des molécules protéiques ne conservent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle qu'à l'intérieur d'un intervalle étroite de pH et de température, La température élevée rompre les interactions faibles qui stabilisent la forme repliée ou native d'une protéine et déstabilisent les liaisons ioniques et hydrogènes. L'état dénaturé est généralement défini soit par la perte de l'activité biologique ou biochimique de la protéine. Cette dénaturation entraine la perte totale ou partielle de l'activité biologique. Dans le cas d'une lectine, la dénaturation détruit ces capacités d'agglutination.

Nos résultats ont montrées que Les extrait brut d'*Anacyclus pyrethrum L* a été stable dans la gamme du pH de 2 à 12, il a perdu leur totale activité à pH 1, ce résultat en accord avec celle trouvée avec la lectine de *Pterocladia capillacea* et *Cyperus rotundus* (Necib et al., 2015), tandis que les extraits de *Brassica napus L* et d'*Urtica dioica L* ont présentées une

Discussion

stabilité dans la gamme du pH plus étroite de **4 à 12**, avec une perte totale d'activité hémagglutinante à pH **1 à 3**, ce qui ressemble aux lectines de *Ruta graveolens* (**Necib et al., 2015**).

Cependant les lectines de *Calycotome spinosa L* restent stable dans une large gamme du pH de **1 à 12**, autres lectines comme celles du *Euphorbia helioscopia* pertes leur activité d'hémagglutination plus rapidement, elles restent actif dans un intervalle de pH de 6-8 (**Shaista et al., 2014**).

Malgré que le traitement thermique de nos extraits racinaires d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* de 40°C jusqu' à 120 °C pendant 1 h, elle n'a été pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante. D'autres espèces ont dénaturées dans des températures plus faibles, comme les lectines de *Phaseolus vulgaris* et *Bryopsis plumose* qui restent natives à 60°C et 50°C, avec une perte totale d'activité à 80 °C et 60°C respectivement (**Andrew et al., 2014 ; Han et al., 2010**). Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistants à la température, comme est le cas des lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* qui pousse jusqu'à 100°C (**Necib et al., 2015**).

Le test antimicrobienne permet d'investigué la capacité d'un extrait à inhibées la croissance d'un l'espèce microbienne, et par conséquence leur utilisation comme un antibiotique, pour cette raison des espèces microbiennes ont été cultivées en présence de extrait de chaque plante.

L'activité antibactérienne des lectines est due à l'adhésion de ces derniers spécifiquement aux récepteurs présentent à la surface des bactéries (**Repon et al., 2014**).

Plusieurs plants a lectine ont des propriétés antifongique, il est avéré que les lectines inhibent indirectement la croissance fongique, par l'attachement sur les carbohydrates présentent à la surface des champignons. Les lectine sont considérées comme des agents supprimeurs pour la développent fongique, mais seule les chimérolectines qui appartenant à la classe I des chitinases sont fongicides (**Andrew et al., 2014**).

Nos extraits ont présentées des activités antimicrobiennes distinctes et variables, cette activité est proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition.

Discussion

Notre extrait d'*Urtica dioica L* ne présente aucune activité antimicrobienne contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterobacter sp*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*, le même résultat a été obtenu avec la lectine des algues vert *Bryopsis plumose* contre des souches bactérienne *Enterococcus faecalis*, KCTC 3206; *Staphylococcus aureus* KCTC 1927 ; *Enterococcus hirae* KCTC 3616 et *Escherichia coli*, KCTC 1116 (**Han et al., 2010**).

Les extraits de *Calycotome spinosa L*, *Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, ne montrent aucune activité antimicrobienne pour les souches testées, sauf *Bacillus cereus* et d'une manière partielle (**c=1 mm; a=0,5 mm ; b=0,1 mm**), un résultat similaire a été obtenu pour *Phthirusa pyrifolia* (**Costa et al., 2010**), par contre le EHL présente une résistance pour trois souches bactériennes : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Shaista et al., 2014**). D'autre étude réalisée sur la lectine de *Tinospora tomentosa* montre leur inhibition de *Vibrio mimicus* (17 mm), *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (8 mm), *Salmonella typhi* (9 mm), *Shigella dysentery* (20 mm) (**Repon et al., 2014**). Par conséquent il est possible d'utiliser ces extraits comme des antibiotiques pour le traitement de infection des yeux, des infections post-chirurgicales et les maladies gastro-intestinales causées par *Bacillus cereus* (**Pitt et al., 2015**).

Concernant la résistance des extraits aux champignons examinés, nos résultats ont montrés différents degrés d'inhibition de plus fort : *Anacyclus pyrethrum L* contre *Aspergillus flavus* (**a =11mm**) jusqu'au plus faible : *Calycotome spinosa L* contre *Aspergillus niger* (**c =1,5 mm**). Ces résultats sont similaires aux celles trouvées avec l'espèce *Arabidopsis thaliana* qui présente une activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* et *Trichoderma harzianum* (**Lee et al., 2014**). Ces résultats indiquent que nos extraits peuvent être utilisés comme des antibiotiques contre les pathologies développées par les *Aspergillus sp* tel que l'asthme et l'aspergillose broncho-pulmonaire (**Oliveira et Caramalho, 2014**).

Discussion

Dans le but d'améliorer l'activité hémagglutinante des extraits, nous avons procédé à leur purification par la chromatographie sur colonne. En effet, les extraits obtenus à la chromatographie sur colonne ont une activité supérieure à celle des extraits initiaux. Ce résultat pourrait insinuer que l'extrait issu de la chromatographie sur colonne contient moins d'impureté sans être un extrait pur de lectine.

Les résultats de séparation en utilisant le séphadex G 200 (domaine de fractionnement : 5 - 800 KDa) et un volume de rétention de 5 ml, ont montrés un bon fractionnement des extraits (pics séparés). dont ; *Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* ont données un seul pic, qui correspond au deuxième tube comme est le cas des lectines de *Pterocladia capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 75 (Necib *et al.*, 2015), par contre l'extrait de *Brassica napus L* a donné deux pics : la première correspond au deuxième tube, et un deuxième pic en onzième tube des résultats similaires ont été obtenus avec les lectines de *Clarias gariepinus* fractionnées sur le gèle séphadex G 150 avec un volume de rétention de 4 ml (Odekanyin *et Kuku*, 2014). Les fractions obtenues sont véritablement des protéines (280 nm), plus précisément elles contiennent des lectines, car elles présentent une activité hémagglutinante avec une amélioration de cette activité après la séparation par chromatographie sur colonne.

CONCLUSION
ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Conclusion

Nous avons extrait des substances à partir des racines de quatre plantes médicinales *d'Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L*, ces molécules ont une activité agglutinante sur les hématies, et que nous appelons lectine.

Nos investigations ont présentés que les lectines de *Brassica napus L* ne montrent aucune spécificité pour les hématies des groupes sanguins du système ABO, tandis que les lectines de *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* agglutinent tous les types de groupe sanguin, par contre c'elles *d'Anacyclus pyrethrum L* ont montré une spécificité pour le groupe sanguin B qui peuvent être utilisées comme des réactifs de groupages d'origines végétales.

Les lectines de *Brassica napus L* sont inhibés par le glucose, galactose et mannose, et c'elles *Urtica dioica L* sont inhibés par le N-acétyle glucosamine, l'affinité de ces lectine pour ces monosaccharides peut être utilisée pour son purification.

Les lectines *d'Anacyclus pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* sont thermorésistants, et ils sont différemment stables dans des pH neutre, alcalin et acide.

Les extraits ont présentées une activité antimicrobienne remarquable vis-à-vis des souches bactérienne plus précisément *Bacillus cereus* et fongiques contre *Aspergillus sp*, qui peuvent être utilisées comme nouveaux antibiotiques.

Perspectives

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

Des tests de l'activité antivirale, l'activité anticancéreuse et l'activité immunomodulatrices.

La purification des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC.

La détermination des poids moléculaire des lectines par électrophorèse et leur séquençage.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A.** The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461.
- ALENCAR. N. M., CAVALCANTE. C. F., VASCONCELOS. M. P., LEITE. K. B., ARAGAO. K. S., ASSREUY. A. M., NOGUEIRA. N. A., CAVADA. B. S. VALE. M. R.** Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*, **2005**. 57: 919-922.
- ANDREW. S. A., RANDY. C. F., XIULI. D., YAU. S. C., WENLIANG. P., TZI. B. N.** Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**. 172: 672–686.
- ANNALAKSHMI. R., UMA. R., SUBASH CHANDRAN. G., MUNESWARAN. A.** A treasure of medicinal herb-*Anacyclus pyrethrum*. *Indian Journal of Drugs and Diseases*, **2012**. 1 (3): 59-67.
- ARAGAO. K. S.** études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France, **2009**. Pp:17-27.
- ATALAH. B. A., DE VLEESSCHAUWER. D., XU. J., FOUQUAERT. E., HÖFTE. M., VAN DAMME. E. J.** Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins towards important abiotic and biotic stresses. *J. Plant Physiol*, **2014**. 171: 986–992.
- AUHMAN. A.** Contribution à l'étude chimique et pharmacologique d'*Anacyclus pyrethrum* DC. Thèse de 3eme Cycle, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. **1995**. Pp 12-15.
- AZZI. R., DJAZIRI. R., LAHFA. F., SEKKAL. F. Z., BENMEHDI. H., BELKACEM. N.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Medicinal Plants Research*, **2012**. 6(10): 2041-2050.
- BABOSA. T.** In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2001**. 95 (5): 673-678.
- BANWELL. J. G.** Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology*, **1983**. 84: 506-515.
- BELLAKHDAR. J.** Médecine arabe ancienne et savoir populaire. Ibris press, **1997**.
Pp : 213-2224.
- BIRD. G. W. G.** Plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte anomalies. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, **1974**. Pp : 234-129.
- BOUCHER. C.** Une brève histoire des idées de Galilée à Einstein. Fides, **2008**. Pp: 94-95.

Références Bibliographiques

BOYD. W. C., SHAPLEIGH. E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **1954**. 119 : 419.

CAZIN. H. Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes.- 3ème édition Paris: éd. de l'Envol, **1997**. p: 1251.

CHABROL. E., FIESCHI. F., GIRARD. E. caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de langerhans : la langéline. Chimie et sciences du vivant. Université de Grenoble, **2012**. Pp: 63-64.

CHIKHI. I. Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Chimie Bio-Organique et Thérapeutique. Université Abou bekrbelkaid – Tlemcen. Algérie, **2014**. p12.

COSTA. R., VAZ. A., OLIVA. M., COELHO. L., CORREIA. M., CARNEIRO. C. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, **2010**. 45: 526-533.

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

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

DAMERDJI. A. diversité orthoptérologique sur trois plantes Xérophiles (diss – doum - genêt) dans les environs de Tlemcen (Algérie nord - occidentale). *Rev. Ivoir. Sci. Technol*, **2011**. 17: 67-78.

DAMERDJI. A., DJEDDID. A. Les orthoptéroïdes associés à une plante xérophile (*calycotome spinosa l. (Link)* (fabacees) dans la région de Tlemcen (nord-ouest algérien) *Rev. Ivoir. Sci. Techno*, **2012**. 20 :111-123.

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.

DIZAYE. K. F., ALBERZINGI. B. O., SULAIMAN. S. R. Renal and vascular studies of aqueous extract of *Urtica dioica* in rats and rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, **2013**. 27(1) : 25-31.

Références Bibliographiques

DOUMBIA. M. Etudes de l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne. Thèse Pharmacie, université FMPOS. Mali, **2004**. p: 84.

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

ELAZZOUI. H., SORO. A., ELHILALI. F., BENTAYEB. A., ALAOUI EL BELGHITI. M., ZAIR. T. Phytochemical study of *Anacyclus pyrethrum* (L.) of Middle Atlas (Morocco), and in vitro study of antibacterial activity of pyrethrum. *Advances in Natural and Applied Sciences*, **2014**. 8(8): 131-140.

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

FRANCINE. D. L'ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) : étude bibliographique. Pharmacie. Université Henri Poincaré Nancy 1 .Nancy, **2005**. Pp:6-9.

GHOURI. M., ZIDANE. L., DOUIRA. A. Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, **2013**. 17: 2388-2411.

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

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

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

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

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

GREGOR. K., FRANÇOIS. F., ROBERTO. G. Rave sauvage *Brassica Rapa subsp. campestris* (L.) Clapham en Suisse. Botanique évolutive. Université de Neuchâtel. Suisse, **2009**. Pp: 8-9.

GREGORY. W. T. evolution, blood types, and weight loss: a critical examination of a popular diet. *Proc Ns Inst Sci*, **2005**. 43(1): 57-68.

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

Références Bibliographiques

GUPTA. R., PARWEZ. A., KUMAR. K., SAURABH. K. V., SINGH. S. K. Review on Potential Plant Based Drugs For Memory Enhancer. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**. 3(5): 286-293.

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

HAN. H. J., JUNG. M. G., KIM. M. J, YOON. S. K, LEE. P. K., KIM. G. H. Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosapre*. *Phycological Research*, **2010**. 58: 143–150.

HANS. W. K. 1000 plants aromatiques et médicinales. Terres éditions, Toulouse, **2007**. p : 43.

HERR. I., BÜCHLER. M. W. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **2010**. 36 (5): 377- 383.

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

HUANG. Y., TAN. J. M., WANG. Z., YI, S.W., HUANG. X. WANG. W., REN. Q. Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Dev. Comp. Immunol*, **2014**. 46: 255–266.

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

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

JAIN. D., KAUR. K. J., SALUNKE. D. M. Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys J*, **2001**. 80: 2912-2921.

JEYAPRAKASH. A. A., KATIYAR. S., SWAMINATHAN. C. P., SEKAR. K., SUROLIA. A. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol*, **2003**, 332: 217-228.

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

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

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

Références Bibliographiques

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

LAIJA. S. N., MAHESH. S., SMITHA. L. S., REMANI. P. Isolation and partial characterization of two plant lectins. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2010**. 2(4): 232-237.

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

LAM. S. K., NG. T. B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, **2010**. 17: 457-462.

LARIT. F., BENYAHLA. S., BENAYACHE. S., BENAYACHE.F., LEON. F., BROUARD. I., BERMIJO. J. Flavonoïdes from *calycotome spinosa L.ink*. *Int. J. Med. Arom. Plants*, **2012**. 2(1): 34-37.

LEE. J. Y., KIM. J. Y., LEE. Y. G., BYEON. S. E., KIM. B. H., RHEE. M. H., CHO. J. Y. In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **2007**. 30(11): 2043-2051.

LEE. J. R., BOLTZ. K. A., LEE. S. Y. Molecular chaperone function of *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2-a1, encodes a protein similar to phloem lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **2014**. 443: 18-21.

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

LEFFLER. H., CARLSSON. S., HEDLUND. M., QIAN. Y., POIRIER. F. Introduction to galectins. *Glycoconj. J*, **2004**. 19: 433-440.

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

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

LIS. H., SHARON. N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev*, **1998**. 98: 637-674.

MACEDO. M. R. L., OLIVEIRA. C. F. R., OLIVEIRA. C. T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules*, **2015**. 20: 2014-2033.

Références Bibliographiques

MATTHES. H., FRIEDEL. W. E., BOCK. P. R., ZANKER. K. S. Molecular mistletoe therapy: friend or foe in established anti-tumor protocols? A multicenter, controlled, retrospective pharmaco-epidemiological study in pancreas cancer. *Curr Mol Med*, **2010**. 10: 430-439.

MEITE. A., KAUAME. K. G., KATI-COULIBALY. S. Substances antinutritionnelles. *Méd.Nut*, **2006**. 42(4): 179-187.

MOKHTARI. M. Etude phytochimique de la plante *calycotome spinosa. link*. Chimie Organique. Université El-Hadj Lakhdar. Batna. Algérie, **2012**. p : 15.

MONTAUT. S., ROLLIN. P., DENICOLA. G. R., IORI. R., TATIBOUËT. A. Composés bioactifs des Crucifères : un apport bénéfique dans notre quotidien Phytothérapie. *Springer*, **2012**. 10: 342-349.

MUKHERJEE. S., ZHENG. H., DEREBE. M. G., CALLENBERG. K. M., PARTCH. C. L., ROLLINS. D., PROPHESTER. D. C., JIANG. Q. X. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, **2014**. 505: 103–107.

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

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

NECIB. Y., BAHIL., DERRI. N, FATEH MEROUANE. F, BOUADI. H., BOULAHROUF. K. Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**. 4(1): 1707-1719.

NECIB. Y, BAHIL. A., MEROUANE. F., BOUADI. H., BOULAHROUF. K. immunomodulatory activity of lectin extracted from the red marine alga *pterocladiella capillacea*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2015**. 4(1): 1693-1706.

NECIB. Y, BAHIL. A., MEROUANE. F., BOUADI. H., BOULAHROUF. K comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2015**. 4(1): 1720-1733.

ODEKANYIN. O. O., KUKU. A. characterization of galactosespecific lectin from the skin mucus of african catfish *clarias gariepinus burchell*, 1822. *Acadimic jornals*, **2014**. 9(20): 869-879.

OLIVEIRA. M., CARAMALHO. A. *Aspergillus fumigatus*: a mere bioaerosol or a powerful biohazard. *Nova Acta Científica Compostelana (BioloXía)*, **2014**. 21: 57-64.

Références Bibliographiques

- P**ARHAM. P. Le système immunitaire. De Boeck Université, **2000**. p: 340.
- 81-PAWEL. P., KATARZYNA. S. Z., BOZENA. M., PAWEL. Z.** Serotonin, melatonin, and certain indole derivatives profiles in rutabaga and kohlrabi seeds, sprouts, bulbs, and roots. *LWT. Food Science and Technology*, **2014**. 59: 740- 745.
- PEUMANS. W. J., VAN DAMME. E. J.** lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol*, **1995**. 109:347-352.
- PEUMANS. W. J., VAN DAMME. E. J.** Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1998**. 33: 209-258.
- PITT. T. L., MCCLURE. J., PARKER. M. D., AMEZQUITA. A., MCCLUR. J. P.** Bacillus cereus in personal care products: risk to consumers. *International Journal of Cosmetic Science*, **2015**. 37: 165–174.
- POIROUX. G.** 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, **2011**. Pp: 35-50.
- QIU. Y., XI. J., DU. L., ROJE. S., POOVAIAH. B. W.** A dual regulatory role of arabidopsis calreticulin-2 in plant innate immunity. *Plant J*, **2012**. 69: 489–500.
- RAD. J. S., SHAHRAKI. S., ROSTAMI. F. M., SHAHRAKI. M. R., ARAB. M. R.** Effects of Aqueous Root Extracts of Anacyclus pyrethrum on Gonadotropins and Testosterone Serum in Adult Male Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, **2014**. 2(6): 767-772.
- RAMATA. N.** Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de *Abrus precatorius L.* la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako, **2010**. Pp: 8-24.
- RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G.** Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel*. Biologie Structurale et Nanobiologie. France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, **2011**. p: 11.
- RENATA. O. D., LEANDRO. S. M., LUDOVICO. M., OCTAVIO. L. F.** Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. *Molecules*, **2015**. 20: 519-541.
- RENKONEN K. O.** Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, **1948**. 26: 66.
- REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOYON. S. H .** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *The Journal of Phytopharmacology*, **2014**. 3(1): 44-51.

Références Bibliographiques

- RUDIGER. H., GABIUS. H. J.** Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. *Glycoconj. J.*, **2001**. 18: 589-613.
- RUDIGER. H.** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, **1993**. Pp: 31-46.
- RYDZ. N., SWYSTUN. L. L., NOTLEY. C., PATERSON. A. D., RICHES. J. J., SPONAGLE. K., BOONYAWAT. B., MONTGOMERY. R. R., JAMES. P. D., LILLICRAP. D.** The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. *Blood*, **2013**. 121: 5228–5237.
- SÆIDNIA. S., GOHARI. A. R.** importance of Brassica napus as a medicinal food plant. *Journal of medicinal plants research*, **2012**. 6(14): 2700-2703.
- SARI. M., HENDEL. N., SARRI. D., BOUDJELAL. A., BENKHALED. A.** Ethnobotanical study of medicinal Flora used by the people of the Forest El Haourane-Msila (Alegria). *Journal Of Ecoagritourism*, **2013**. 9(2): 27.
- SELLES. C., MEDJDOUB. H., DIB. M. A., ZERRIOUH. M., TABTI. B.** Anti-diabetic activity of aqueous root extract of *Anacyclus pyrethrum* L. in streptozotocin-induced- diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2012**. 6(16): 3193-3198.
- SHAISTA. R., SAKKEENA. Q., ISHFAK. H. W., SHOWKAT. A. G., AKBAR. M., RABIA. H.** Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. *Pak. J. Pharm. Sci*, **2014**. 27(6): 1805-1810.
- SHARON. N.** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol*, **1996**. 408: 1-8.
- SHARON. N., LIS. H.** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**. 14: 53-62.
- SHARON. N.** Lectin-Carbohydrate complexes of plants and animals: an anatomic view. *Elnevier Science Publishers*, **1993**. 93: 221-226.
- SHARON. N., LIS. H.** Legume lectins-A large family of homologous proteins. *FASEB J*, **1990**. 4: 3198–3208.
- SHE. Q. B., NG. T. B., LIU. W. K.** A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **1998**. 247: 106-111.
- SILVA. H.C., PINTO. L. S., TEIXEIRA. E. H., NASCIMENTO. K. S., CAVADA. B. S., SILVA. A. L.** BUL : a novel lectin from *Bauhinia unguolata* L, seeds with fungistatic and antiproliferative activities. *Process biochemistry*, **2014**. 49: 203-209.

Références Bibliographiques

SOMERS. W.S., TANG. J., SHAW. G. D., CAMPHAUSEN. R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe^x and PSGL-1. *Cell*, **2000**. 103: 467-479.

SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUE-BARREIRA. M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, **2013**. 30:641-657.

STEFANOWICZ. K., LANNOO. N., PROOST. P. Arabidopsis F-box protein containing a Nictaba-related lectin domain interacts with N-acetylglucosamine structures. *FEBS Open Bio*, **2012**. 2: 151–8.

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

SZE. S. C. W., HO. J. C. K., LIU. W. K. *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *J. Cell. Biochem.y*, **2004**. 92: 1193-1202.

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

TANNE. A., NEYROLLES. O. C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence*, **2010**. 1: 285–290.

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

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

VAN DAMME. E. J., PEUMANS. W. J., BARRE A., ROUGÉ. P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **1998**. 17(6): 575-692.

VICHITRA. K., SAPNA. R., VIPIN. S., PARMINDER. N., DEEPA. R. Biological Studies of *Anacyclus Pyrethrum*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **2013**. 3(6): 4590-4596.

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

Références Bibliographiques

WEIS. W. I., BRUNGER. A. T., SKEHEL. J. J., WILEY. D. C. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, **1990**. 212: 737-761.

WICHTL . M., ANTON. R. Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. *ime* édition française par R. Anton Paris: éd. Tee & Doc; Cachan: éd. Médicales Internationales, **2003**. p: 692.

WILEY. D. C., SKEHEL. J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza. *Annu. Rev. Biochem*, **1987**. 56: 365-394.

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

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

XU. Y. H., BI. W. J., WANG. X. W., ZHAO. Y. R., ZHAO. X. F., WANG. J. X. Two novel c-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class a domain have antiviral function in the shrimp *marsupenaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol*, **2014**. 42: 323-332.

YOUNG. N. M., OOMEN. R. P. 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.

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

ANNEXE

Annexe

Annexe 01 : Le tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1 M pH 7,4)

Le produit chimique	La concentration	quantité
L'eau distillée	-	1 litre
Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	0,1 M	0,087 g
Monosodium phosphate(NaH_2PO_4)	0,1 M	1 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	0,5 M	9 g

Annexe 02 : La préparation des monosaccharides

Le sucre	L'eau distillée
100 mg	1 ml

Annexe 03 : La préparation de milieu Muller-Hinton pH 7

Le produit chimique	Quantité
L'eau distillée	1 litre
Agar	10 g
Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5g

Annexe 04 : La préparation de milieu PDA (Potato Agarose Dextrose) pH 7

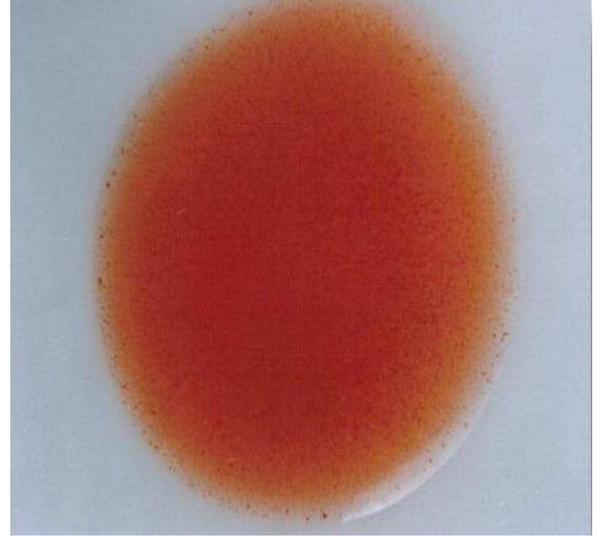
composant	Quantité
L'eau distillée	1 litre
Glucose	20 g
Agar	20 g
Infusion de pomme de terre	200 g

Annexe

Annexe 05 : Les différents types d'agglutinations



- = pas d'agglutination



+ = faible agglutination



++ = forte agglutination



+++ = très forte agglutination

TORCHE Imen

date de soutenance

CHEKAKTA Messaouda

23/ 06/ 2015

Thème : Extraction des lectines à partir des plantes médicinales (*Anacyclus Pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L (Link)* et *Urtica dioica L*) avec des tests biologiques

Option : Analyse Proteomique et Santé

Résumé

Les lectines sont des substances protéiques extraits des plantes ou d'animaux.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les extraits racinaires de quatre plantes médicinales par le test d'hémagglutination et leur étude biologique.

L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon suivi par la chromatographie sur colonne.

L'activité hémagglutinante d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Calycotome spinosa L* et *Urtica dioica L* a été 1:7 (128) et de 1:6 (64) pour *Brassica napus L*. Parmi les extraits des quatre plants étudiés, seulement les lectines d'*Anacyclus pyrethrum L* ont présentées une sélectivité pour le groupe B du système ABO. Les lectines de *Brassica napus L* ont été spécifiquement inhibés par le galactose, mannose, glucose et celles d'*Urtica dioica L* par le N-acétyle glucosamine, ces lectines ont été stables dans la gamme du pH de 4-12. Cependant les lectines de *Calycotome spinosa L* ont été stables dans la gamme du pH de 1 à 12, celles d'*Anacyclus pyrethrum L* présentent une stabilité dans le pH de 2 à 12. Le traitement thermique des lectines des quatre plantes de 40 °C jusqu'à 120 °C n'a été pas suffisante pour leur inactivation. Ces derniers ont une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus*, et antifongique vis-à-vis *Aspergillus sp*, sauf l'extrait d'*Urtica dioica L* qui a été seulement présenté une activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus flavus*.

L'application de la chromatographie sur colonne de séphadex G 200 sur les extraits d'*Anacyclus pyrethrum L*, *Urtica dioica L* et *Calycotome spinosa L* a donné un seul pic, par contre pour *Brassica napus L*, elle a donnée deux pics, avec une amélioration de leur activité hémagglutinante.

Mots clés : Lectines, Extraction, Activité hémagglutinante, Plante médicinale, Saccharide, Activité antimicrobienne.

Laboratoire de recherche: Laboratoire d'Immunologie et laboratoire de Génie de Microbiologie et Application, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine

Président: MECHAKRA A.

(Pr) Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur: NECIB Y.

(Pr) Université des Frères Mentouri Constantine

Examineur: BAHY A.

(M.A) Université des Frères Mentouri Constantine