



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



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

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et santé*

Intitulé :

**Etude de l'effet des lectines extraites à partir d'écorce des racines de
Morus nigra sur l'activité immunitaire et antimicrobienne**

Présenté et soutenu par : DERRI Nesrine

Le : 16/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB Y Pr. Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : BAHY A MAA. Université des Frères Mentouri Constantine

Examineur : DJEMAIZOUGHLACHE S MAA. MAA. Université des Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire
2014 – 2015*

****Remerciements**

Mes remerciements vont d'abord à Dieu pour m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail au bout.

Mes remerciements vont également Aux honorables membres du jury :(Pr.NECIB Youssef, Dr BAHI Ahlem, Dr DJEMAIZOUGHLACHE Soumia d'avoir examiné mon mémoire et évaluer mon travail.

Je voudrais aussi, à travers ces lignes, exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon encadreur Dr : BAHI Ahlem, qui s'est honnêtement acquittée de son noble devoir de conseillère discrète et de pourvoyeuse d'idées à l'origine de ma réussite. Je lui dois tout,

A Mr le président du jury Pr : NECIB.Y, qui m'a de tous temps orienté et abreuvé en savoir et n'a à aucun moment lésiné dans ma formation et ce, grâce à ses compétences, m'a propulsé au summum de la réussite.

Je remercie le Dr : DJEMAIZOUGHLACHE Soumia , pour l'honneur qu'elle me fait de participer au jury de ce mémoire.

D' autre part, Je voudrais apporter mon témoignage et ma reconnaissance envers mes « Maitres » et mes « modèles » :Mr. DEHIMET, Mr. KACEM CHAOUCH, Mme. MECHAKRA, Mr. MANAD, Mme. MADAH, Mr. KHELIFI, Melle BELLIL, Mr BENSEGNI, Mr NOUADRI, Mr FERHATI, Mme GUERGOURI, Mme KARA ALI, Mr LAKHDARA et Mr MARGHAM ;

Le staff technique et les dirigeants des laboratoires d'immunologie, de Génie microbiologique et applications, de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LAMYBAM), de Biochimie, d'Analyse biologiques, sont à féliciter pour toute l'aide apportée et pour leur excellente manière de servir ;

En signe de profonde reconnaissance, Je remercie tous ceux et celles qui ont Cru en moi, et ont formé les maillons forts de la chaine par leurs conseils prodigués, leurs aides consenties, leur promptitude et leur inépuisable bonté.



Dédicaces

A mon cher père, RACHID (El Mourchid), fidèle compagnon tout au long du bout chemin parsemé de savoir, (de la maternelle au jour d'aujourd'hui),

A ma chère et tendre mère NORA (En-Nour), qui a veillé sans faille à mon bien être et à ma réussite,

QUE DIEU VOUS PROTEGE !

A tous mes professeurs, qui m'ont nourri de savoir et n'ont ménagé aucun effort pour m'instruire et me cultiver,

A tous ceux qui ont cru à mes aptitudes, à mes ambitions, à mes élans vers plus de savoir,

A mon petit cousin Seif El dinne,

A mes amis (es), particulièrement Redouane, Sara, Amina, Aziza, Lamia, Amira, Sarah, Samia, Rym.

A tous mes dévoués collègues depuis ma première année à l'école primaire jusqu'à mon Master 02.

JE VOUS TEMOIGNE MA PROFONDE AFFECTION ET VOUS DEDIE

CE MODESTE OUVRAGE.



Résumé

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques. Le but de cette recherche était d'extraire et d'étudier les différentes spécificités des lectines contenues dans l'écorce des racines de *Morus nigra* qui est une plante sauvage reconnue pour ses diverses propriétés médicinales et cela en débutant par un test d'hémagglutination suivi par la limite d'hémagglutination qui nous a éclairci sur la disponibilité de la concentration des protéines contenues dans notre extrait. Un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et glycoprotéines et qui a montré que les lectines de *Morus nigra* prouvent une grande affinité au mannose par rapport aux autres composés avec une concentration minimale d'inhibition de l'ordre de 0,6g/ml et cela grâce au test de limite d'inhibition. Pour le test d'ABO, les lectines de l'extrait de *Morus nigra* ont donné une forte sélectivité sur les hématies du groupe A contrairement à celles des autres groupes. Un test des métaux a été réalisé, et qui a démontré que nos lectines sont des métalloprotéines et prouvent une grande affinité au calcium. L'activité hémagglutinante de l'extrait de *Morus nigra* a été stable dans la gamme de pH 3-12 et jusqu'à 120°C pendant une heure. Un autre test a montré que plus la dose employée augmente plus le système immunitaire est stimulé, ce qui prouve l'effet qu'exercent les lectines de *Morus nigra* sur le système immunitaire. L'activité antimicrobienne des lectines de l'extrait de *Morus nigra* a permis d'apparaître une grande activité antifongique avec *Aspergillus flavus* à l'opposé de *Aspergillus fumigatus* et *Bacillus cereus*.

Mots clés : Lectines, Extraction, Hémagglutination, Système ABO, Inhibition, Sucres, Affinité.

Abstract

Lectins are a family of proteins and heterogeneous glycoproteins which recognize certain oligosaccharide structures.

The purpose of this research was to extract and study the different specificities of lectins contained in the root bark of *Morus nigra* is a wild plant known for its various medicinal properties and that, beginning with a hemagglutination test track by the limit hemagglutination which we clarified on the availability of the concentration of proteins in our extract.

An inhibition assay was performed subsequently with different monosaccharides and glycoproteins and lectins mounted *Morus nigra* show high affinity to the Galactose compared to other compounds with a minimum inhibitory concentration of about 0,00125g / ml and this limit through inhibition test.

For testing ABO, lectins extract of *Morus nigra* have high selectivity data on group a red cells unlike those of the other group.

A test of metals has been achieved, and which demonstrated that our Lectins are metalloproteins and show a high affinity to calcium.

The hemagglutinating activity of the extract of *Morus nigra* is stable in the pH range 3-12 and up to 120 ° C for one hour.

Another test showed that the higher the dose used increases more the immune system is stimulated, it shows the effect exerted by lectins *Morus nigra* on the immune system.

The antimicrobial activity of lectin extract of *Morus nigra* left appear great with antifungal activity *Aspergillus flavus* opposite *Aspergillus fumigatus* and *Bacillus cereus*.

Keywords: Lectins, Extraction, agglutination, ABO, Inhibition, Sugars, Affinity.

ملخص

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

الغرض من هذا البحث هو استخلاص ودراسة الخصوصيات المختلفة للكتينات الواردة في لحاء جذور *Morus nigra* وهو نبات بري معروف بخصائصه الطبية المتعددة وهذا من خلال اختبار التراص والتراص الحد الذي اطلعنا على نسبة تركيز البروتينات في المستخلص وتوفرها فيه.

تم تطبيق اختبار التثبيط مع مختلف السكريات الاحادية والبروتينات السكرية المختلفة حيث تم اظهار توافق ليكتينات *Morus nigra* مع Galactose مقارنة بغيره من السكريات وذلك بتركيز مثبط ادنى يقدر ب 0,00125g/ml

اما خلال اختبار ABO فقد تم ملاحظة توافق ليكتينات *Morus nigra* مع خلايا المجموعة A وذلك باظهار انتقائية عالية معها مقارنة بالمجموعات الاخرى.

مع المعادن اظهر ليكتينات *Morus nigra* تأثيرها على الكالسيوم من خلال تثبيطه عكس المعادن الاخرى.

نشاط تراص مستخلص *Morus nigra* بقي مستقرا خلال تعرضه لدرجة حرارة 120°C خلال ساعة و عند تعرضه كذلك لنطاق درجة حموضة 3-12 pH .

اختبار اخر قام باظهار تاثير ليكتينات *Morus nigra* على الجهاز المناعي حيث انه كلما ازداد تركيز الجرعة المحقونة كلما حفز الجهاز المناعي اكثر.

اما مع البكتيريا فقد اظهرت ليكتينات التوت الاسود تأثيرها الكبير على *Aspergillus flavus* مقارنة ب *Aspergillus fumigatus* و *Bacillus cereus*

الكلمات المفتاحية: الليكتينات الاستخلاص, التراص, ABO, تثبيط, سكريات, انجذاب .

SOMMAIRE

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre1 : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines-----	page 1
2 .Historique -----	page 2
3. Les sites de liaisons -----	page 6
4. La Structure des lectines -----	page7
5. La Spécificité des lectines -----	page 8
6. La classification des lectines -----	page 10
7. La Distribution des lectines dans le monde vivant- -----	page 11
8. Les fonctions Biologiques des lectines-----	page 13
9. Autres propriétés-----	page 15
10. L'intérêt des lectines pour l'homme -----	page 15
11. Le rôle des lectines dans l'immunité-----	page 17

Chapitre II : Le système sanguin

1. Définition -----	page 18
2. Système des groupes sanguins -----	page 18-1
2.1 Le système ABO-----	page 18-1
2.2 Le facteur Rh-----	page 19
3. Lectines spécifiques des groupes sanguins -----	page 19

Chapitre III: Généralité sur la plante utilisée

1. Etymologie -----	page 20
2. La description botanique de la plante -----	page 20
3. Plantation du mûrier noir -----	page 20
4. La classification scientifique -----	page 20
5. Propriétés médicinales -----	page 21

Matériels et méthodes

1. L'extraction des lectines à partir de <i>Morus nigra</i> -----	page 22
2. Test d'hémagglutination -----	page 23
3. Technique d'hémagglutination avec ABO -----	page 24
4. Limite d'hémagglutination -----	page 24
5. Test d'inhibition -----	page 24
6. Test du pH -----	page 24
7. Test de la température -----	page 25
8. Test des oligoéléments (Métaux) -----	page 25
9. La Chromatographie sur colonne de Sephadex G75 -----	page 25
10. Dosage de l'activité phagocytaire -----	page 26
11. Analyse statistique -----	page 27
12. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique -----	page 27

Résultats et discussion

1. Le test d'héماغglutination	page30
2.La limite d'héماغglutination	page 31
3. La technique d'héماغglutination avec ABO	page 32
4. Le test d'inhibition	page 32
5. L'effet du pH sur l'héماغglutination	page 36
6. L'effet de la température sur l'héماغglutination	page 36
7. Le Test des oligoéléments (Métaux)	page 37
8. La chromatographie sur colonne	page 38
9. Etude de l'activité phagocytaire	page38
10. Etude de l'activité antimicrobienne	page40
Conclusion générale et perspective	page43
Références bibliographiques	page44
Annexes	page51

Liste des tableaux

Tableau 01 : les lectines et leurs applications -----	page2
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines-----	page3
Tableau 03 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines -----	page9
Tableau 04 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines-----	page10
Tableau 05 : Exemples des lectines spécifiques des groupes sanguins-----	page19
Tableau 06 : Les microorganismes utilisés-----	page27
Tableau07 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de <i>Morus nigra</i> -----	page30
Tableau 08 : Activité de la limite d'hémagglutination de <i>Morus nigra</i> -----	page31
Tableau 09 : L'agglutination des hématies humaines par l'extrait de <i>Morus nigra</i> -----	page32
Tableau 10 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par les glycoprotéines-----	page33
Tableau 11 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples-----	page33
Tableau12 : Limite d'inhibition avec les différents sucres -----	page35
Tableau 13 : l'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Morus nigra</i> ---	page36
Tableau 14 : l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Morus nigra</i> ----- -----	page36
Tableau15 : Résultats du test des oligoéléments (Métaux) avec <i>Morus nigra</i> -----	page37
Tableau 16 : Diamètres de zones d'inhibition de <i>Morus nigra</i> avec les différentes souches ----- -----	page41

Listes des figures

Figure 01 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides --- **page 6**

Figure 02 : Représentation graphique d'un monomère de concavaline A de canavalien siformis en complexe avec le trimannosoïde -----**page 7**

Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia coli*-----**page 8**

Figure04 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) -----**page 12**

Figure05 : Filtration de l'extrait de *Morus nigra* sur colonne de sephadex G75-----**page38**

Figure06: Effet des lectines extraites de *Morus nigra* sur l'activité phagocytaire-----**page39**

Figure07: Effet de lectines extraites de *Morus nigra* sur la demi-vie $t_{1/2}$ de carbone dans le sang-----**page39**

Liste des photos

Photo 01 : Racines de *Morus nigra*-----page22

Photo 02 : Test d'hémagglutinine de la lectine extraite de *Morus nigra* avec suspension de lapin érythrocytes à l'œil nu-----page30

Photo 03 : Observation microscopique d'hémagglutinine de la lectine extraite des *Morus nigra* avec suspension de lapin érythrocytes GX40-----page30

Photo04 : Limites d'hémagglutination de *Morus nigra*-----page31

Photo 05: Limites d'inhibition d'extrait de *Morus nigra* avec le D-Glucosamine, Glucose, Mannose et Galactose-----page35

Photo 06: Inhibition de lectine de *Morus nigra* avec le calcium-----page37

Photo 07 : L'effet inhibiteur de l'extrait de *Morus nigra* sur l'activité de *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*-----page41

Schéma 01 : Technique d'extraction des lectines à partir de la poudre de *Morus nigra*.

Partie
Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (Lis and Sharon, 1998). Les lectines initialement connues sous le nom d'hémagglutinines, sont des protéines qui possèdent la propriété d'agglutiner les cellules rouges du sang (Berk, 1993), cette faculté s'explique par leur capacité d'établir des liaisons croisées avec les résidus glucidiques de plusieurs globules rouges (Figure:01). Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (Liener *et al*, 1986). L'agglutination des hématies est toujours le test principal permettant de détecter les lectines. Les lectines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD. Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (Ghopkins et Evrard, 2003), sont parfois des protéines membranaires complètement incluses dans la membrane, l'utilisation de détergent puissants est donc nécessaire pour leur dissolution. D'autres lectines sont d'emblées des protéines solubles (Kamoun, 2003). Les lectines végétales sont actuellement les seules qui soient couramment utilisées pour caractériser ou fractionner des glycoconjugués d'origines diverses (Goldstein et Hayes, 1978; Sharon et Lis, 1989), à l'inverse des anticorps, qui ne sont formés que suite à un stimulus, les lectines sont comme les immunoglobulines des substances présentes naturellement dans les organismes (Nultsch, 1998). Leurs capacités à distinguer entre soi et non-soi rend partie du système de l'immunité innée (yang *et al*, 2011). Bien qu'il existe des lectines thermorésistantes (Guillaume, 1993). Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est en fonction de la température et de la durée de traitement (Meite *et al*, 2006). Le tableau 01 présente certaines lectines et leurs applications :

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

Lectines	Exemple et commentaire
Lectine de légumes	ConcanavalineA, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine

Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E.coli et toxine du choléra
Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectine animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

2. Historique

L'étude des lectines a été introduite par Stillmark en 1888. Celui-ci a dans un premier temps mis en évidence l'existence de molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ces molécules ont ainsi été nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines (Sharon ; Lis, 2004). Le terme de lectine a été proposé par Boyd et Shapleigh à partir du latin *légère* qui se traduit par choisir (Boyd, 1954 ; Shapleigh, 1954). La première de ces molécules a été extraite du ricin (*Ricinus communis*) et a été appelée Ricine. La même activité a ensuite été découverte dans les extraits du pois rouge (*Abrus precatorius*) par Ehrlich : cette molécule a été nommée Abrine. Par la suite, il a été constaté qu'en plus de leur capacité hémagglutinante, ces deux molécules avaient une activité toxique. La découverte de ces molécules végétales a permis de faire les premières observations concernant la spécificité du système immunitaire. En effet, après immunisation de souris par des injections sous-cutanées répétées à des doses non létales de Ricine ou d'Abrine, Ehrlich a constaté que le sérum issu de l'immunisation par la ricine protégeait les animaux contre les effets toxiques d'injections de ricine mais pas d'abrine et vice-versa.

En 1919, Summer a purifié la concanavaline A ou ConA (*Conavalia ensiformis*) et a mis en évidence, en 1936 avec Howell, que cette phytoagglutinine pouvait également agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (comme par exemple les levures) et précipiter le glycogène en solution. Par la suite, il a été observé que l'hémagglutination induite par la ConA peut être inhibée par une solution de sucrose. Ces études ont permis d'introduire la notion de spécificité de reconnaissance des sucres par les phytoagglutinines. En parallèle, après les avancées de Landsteiner concernant les différences d'activité des phytoagglutinines selon les types cellulaires (Lefrere et Berche, 2010), En 1954, Boyd et Sharpleight ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des erythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (Ramata, 2010). Alors qu'en 1957, Mäkelä a réalisé une étude sur des extraits de graines de 743 espèces de légumineuses différentes (OM, 1957). Il a mis en évidence qu'un peu plus d'un tiers de ces extraits possèdent une activité hémagglutinante et qu'environ un dixième d'entre eux révèlent une spécificité envers les groupes sanguins A, B ou O. Ces découvertes ont joué un rôle essentiel dans les études structurales des déterminants antigéniques de groupes sanguins. Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes ont été purifiées et caractérisées, Elles sont utilisées en tant que

réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes. Actuellement, certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour le typage du sang, principalement en raison de l'indisponibilité d'anticorps anti -O (H) naturels et en raison du fait que certaines d'entre elles distinguent les sous-groupes A1 et A2 (Liener, 1976). Le nombre des lectines isolées a augmenté avec l'introduction des purifications sur chromatographie d'affinité. Ainsi, environ 300 lectines de plantes ont été isolées et caractérisées (Van Damme *et al*, 1998). L'intérêt de purifier un très grand nombre de lectines est dû à leur utilisation comme outil de détection, d'isolement et de caractérisation des glycoconjugués présents dans les cellules vivantes (Peumans et Van Damme, 1998). Le Tableau 02 présente historique de la découverte des lectines.

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

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicite de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicite de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	Stillmark	Activite hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicite de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activite hemagglutinante de la graine de <i>Abrus Precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'"hemagglutinine
1902	Landsteiner	La reversibilite de l'hemagglutination par la Chaleur

1902	Kauss	L'inhibition de l'activite hemagglutinante par le serum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activite Hemagglutinante dans les plantes non Toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La specificite des especes de plantes a Hemagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activite hemagglutinante par un traitement thermique de serum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Specificite groupe de sang des plantes a Hemagglutinines
1949	Liener	Inactivation Thermique des hemagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hemagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Demonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des determinants de groupe sanguin
1954	Boyd& Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogenique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>

1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinite pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner <i>et al.</i>	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

3. Les sites de liaisons des lectines

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

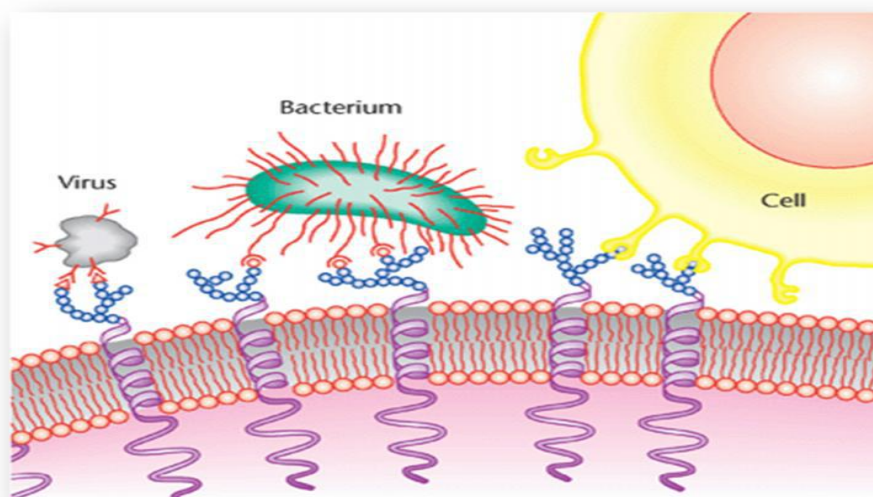


Figure 01 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Sharon et Lis, 1993)

4. La Structure des lectines

Selon leur topologie, et de point de vue structurel, les lectines sont classées en trois grandes classes :

4.1 Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement n'excède pas 40KDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Lenka, 2006) (figure 02)

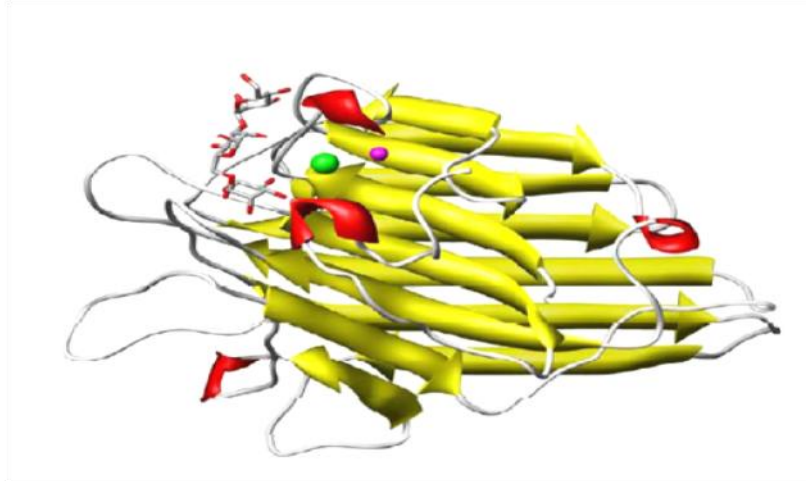


Figure 02 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de *canavaliensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006).

La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boules pour les cations (Lenka, 2006)

4.2. Les lectines en mosaïque

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (Lenka, 2006).

4.3. Les assemblages moléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006) (Figure03).

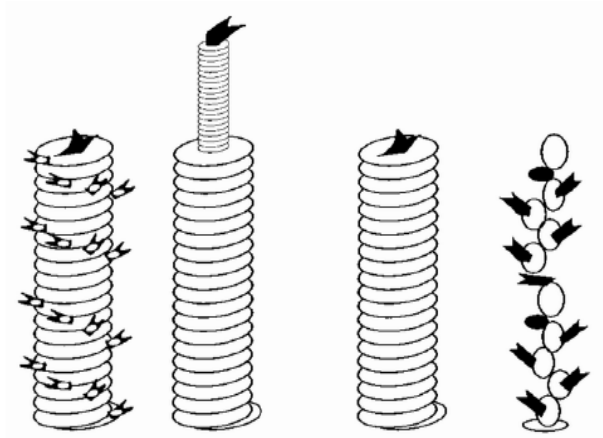


Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichia coli*.

5. La Spécificité des lectines

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que dans la majorité des cas ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celle qui reconnaissent un monosaccharide et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Kumar *et al*, 2012). L'affinité des lectines pour les monosaccharides est généralement assez faible (de l'ordre de 1mM) en comparaison avec leur affinité pour les oligosaccharides (de l'ordre du μM) (Dam et Brewer, 2002; Bianchet *et al*, 2009). De ce fait la spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (Robert, 2008). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose(Gal)/N acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N acetylneuraminique, NeuAc). Très peu des lectines reconnaissent l'acide sialique sous la forme de monosaccharide (Lis and Sharon, 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. Donc, la plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides (Dam and Brewe, 2002). Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire, d'autres lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en carbone (C1) de monosaccharides tels que l' α -methyl-galactoside et le β -methylgalactoside. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la

spécificité des lectines (Park *et col*, 2008). Le tableau 03 représente la spécificité osidique de certaines plantes contenant les lectines :

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

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

6. La Classification des lectines

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes chez tous les organismes vivants en grande variété et diversité structurale. En 1980, les études de biochimie structurale ont mis en évidence

l'oligomérisation des lectines. Certaines sous-unités sont responsables de la reconnaissance glycanique et d'autres ont une activité catalytique cytotoxique. Ces avancées scientifiques ont permis de commencer à classer les lectines selon leur structure quaternaire (Van Damme *et al*, 1998) :

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

La banque de lectine comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont 6 d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1^e famille d'algues (Tableau 04) (Karolina, 2006).

Tableau 04 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines
(Karolina, 2006)

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

Dans chaque famille, les lectines peuvent être sous-classées en fonction de leur spécificité glycanique. De plus, l'activité de liaison spécifique à des glycanes a orienté l'étude des lectines vers la médecine. Les études concernent en majorité la caractérisation de leur structure, la détermination de leur spécificité

glycanique, et de leur activité biologique vis-à-vis de cellules humaines. Un classement selon la phylogénie et la similarité des structures est également utilisé (Van Damme *et al*, 1998) :

- ✚ Les « Legume lectins » ou « légumineuses » (ex : Concanavoline A)
- ✚ Les « chitin-binding proteins » (ex : *Wheat germ agglutinin* ou WGA)
- ✚ Les « monocot-Mannose binding lectins » (*Galanthus nivalis* agglutinin ou GNA)
- ✚ Les « Type 2 RIP (Ribosome Inactivating Protein) » (ex : Ricine)
- ✚ Les « Jacalin Related Lectins » ou JRL (ex : Jacaline)
- ✚ Les « Amaranthin »
- ✚ Les « Curcubitaceae »

7. La Distribution des lectines dans le monde vivant

Selon leurs origines, plusieurs catégories de lectines sont observées.

7.1. Chez les plantes

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g. les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquences et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavoline A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (Edelman *et al*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972) (Figure 04).

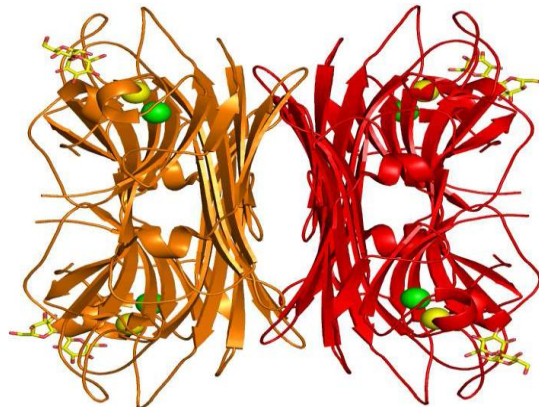


Figure 04 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre *et al*, 2006).

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

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine

hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (Wright, 1980). Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (Chrispeels and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius, 2001).

7.2. Chez les champignons

Les champignons, y compris les moisissures et les champignons proprement dits, font partie d'une importante classe d'organismes. De par leurs propriétés nutritionnelles, les champignons ont toujours gardé une place importante dans notre alimentation, dans nos traditions gastronomiques mais également dans la médecine, spécialement dans la médecine traditionnelle orientale. L'intérêt montré dans les dernières années pour les lectines de champignons est principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (Sze, 1994 ; She, 1998).

7.3. Chez les microorganismes

Dans la nature, les lectines exercent diverses fonctions et participent notamment à la reconnaissance des cellules de l'hôte par les microorganismes pathogènes (Bouchara et Trouchin, 2003). L'adhérence aux tissus constitue une étape cruciale dans le développement de l'infection (Bouchara et Trouchin, 1999). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriaes (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (Imberty *et al*, 2005).

7.4 Chez l'animal

Les lectines animales sont des protéines qui se lient au glucide exprimées dans une variété de tissus. Ils sont excrétés ou des protéines membranaires (Bianchet *et al*, 2009). Les lectines animales sont assez nombreuses et ont probablement des fonctions biologiques importantes (David, 1995). Elles peuvent être impliquées dans l'adhérence cellules-cellules et la différenciation (Basu et Appukuttan, 1983 ; Yuriev et Ramsland, 2013). Elles s'impliquent aussi dans les réponses innées aux pathogènes (Bianchet *et al*, 2009). Elles ont des rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. Chez l'oursin, l'acrosome contient une protéine qui se combine à des glucides, une lectine appelée bindine liant le spermatozoïde à la membrane vitelline située à la surface de l'ovocyte (Wehner *et al*, 1999).

8. Les fonctions biologiques des lectines

Diverses propriétés biologiques sont attribuées aux lectines. Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ses organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (Lis et Sharon, 1998). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Elles sont utilisées lors du test d'hémagglutination en pratique clinique pour distinguer les types du sang (A, B et O), exemple : la lectine de haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) se lie à N-acétyl-D galactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A (Goker *et al*, 2008). Ont également la capacité de se lier avec des sucres spécifiques, cette capacité est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (Miyoshi *et col*, 1982). Aussi comme ligands d'affinités pour purifier des polysaccharides, des protéoglycanes et des glycoprotéines par des interactions hydrophiles spécifiques de groupes glycaniques (Kamoun, 2003). Les lectines ont également été utilisées pour isoler et analyser des glucides complexes et pour séparer des cellules isolées en se basant sur la présence de glucides spécifiques sur leurs surfaces (Ghopkins et Evrard, 2003 ; Genten *et al*, 2010). Elles possèdent une Activité mitogène qui est une des propriétés les plus étonnantes des lectines, celle-ci réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (Barbosa, 2001 ; Falasca, 1989 ; Nachbar *et col*, 1980). Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar *et al*, 2005 ; Gomes *et al*, 2012). Alors que, d'autres purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel que le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (Guillot *et al*, 2004, Zang *et al*, 2010). Les lectines ont la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses, La récente découverte suggère que les cellules malignes sont plus facilement agglutinées par des lectines que les cellules normales. Ces agglutinations sélectives pourraient être utilisées dans le traitement du cancer (Chaudhary et Sood, 1998; Voet et Voet, 2005). Les travaux de Valentier *et col*. (2003) dictent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme *in vitro* comme La lectine dans le son de riz qui démontre *in vitro* la capacité d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses humaines puisque cette lectine résiste bien à son passage dans l'estomac, on croit qu'elle pourrait demeurer active chez l'humain et ainsi conserver ses propriétés (Jodoin, 2010). Quant à Banwell *et col*. (1983), ils montrent que les lectines des graines d'haricot rouge provoquent l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses. De ce fait, de nombreuses lectines sont utiles comme des inhibiteurs viraux, tels que la lectine extraite de la racine de l'*Ortie urtica* (Suttisrisung *et al*, 2011). Aussi, Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies telles le

cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (Guillot *et al*, 2004 ; Zang *et al*, 2010).

9. Autres propriétés

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

10. L'intérêt des lectines pour l'homme

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

. Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar *et al*, 2005). Aussi, elles peuvent être utilisées dans d'autres plusieurs domaines.

10.1. Dans le domaine biomédical

➤ *Hématologie*

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

➤ *Immunologie*

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (Hirabayashi, 2004). Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (Jaffe, 1980).

➤ *Biologie cellulaire*

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

➤ *Cancérologie*

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

➤ *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 col*, 2002). Par exemple, la lectine de blé et celle de graine de *Bauhinia purpurea* ont des effets le taux pour deux insectes (*Ostrinia nubilabis* et *Diabrotica undecimpunctata*) se nourrissant sur le maïs, l'action des lectines peut se faire à des concentrations relativement faibles (Peumans *et col*, 1995).

11. Le rôle des lectines dans l'immunité

Les lectines sont utilisées en immunologie par Paul Ehrlich au début des années 1890, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulé par les lectines in vitro ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent in vivo (Sharon, 1983). Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre d'une réponse de l'immunité innée (De Hoff *et al*, 2009). Le système du complément, son activation peut être initiée par des complexes immuns (voie classique), par des oligosaccharides microbiens (voie des lectines) ou par divers composants de surface des pathogènes (voie alterne) (Cavaillon, 2005). La voie des lectines est initiée par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (Ayméric et Lefranc, 2009). La lectine liant le mannose (mannose binding lectin, MBL) est

une molécule de la reconnaissance de la voie des lectines du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (Roos *et al*, 2007). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (Kawsar *et al*, 2010). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytes. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytes grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – fucose, récepteur de galactose et récepteur de β -glucane (Guénard *et al*, 2001).

Chapitre II : Le système sanguin

1. Définition

Le sang a toujours fasciné les humains. La perte de sang accompagnant souvent la perte de vie, on a, de tous temps, tenté de restituer sinon la vie du moins la vigueur avec du sang. La notion de groupe sanguin est née de la découverte de l'agglutination d'hématies par les sérums. Il peut s'agir d'une allo-agglutination (Landsteiner, 1900) ou d'une hétéro agglutination (Landsteiner et Alexander, 1940). Ce phénomène d'agglutination est en réalité le résultat d'une réaction antigène-anticorps. En 1900, Landsteiner observe que le plasma de différents sujets agglutine les hématies de nombreux autres sujets et, poursuivant ses études, il en déduit l'existence des groupes A, B et O. Un an plus tard, De Castillo décrit un quatrième groupe: AB. En 1940 Landsteiner et son élève Wiener, sont à l'origine de la découverte du système rhésus. En injectant au lapin des hématies du singe *Macacus rhésus*, ils obtiennent des anticorps qu'ils dénomment anti-rhésus. Ces anticorps agglutinent les hématies de 85 % des humains dits rhésus positifs ou Rh⁺, les autres étant Rh⁻.

2. Le système des groupes sanguins

Un système de groupes sanguins est un ensemble d'allo-antigènes portés par la membrane du globule regroupés en systèmes génétiquement déterminés et indépendants les uns des autres. Parmi les systèmes de groupes sanguins connus chez l'homme, les systèmes de groupes sanguins érythrocytaires sont actuellement les mieux connus, les principaux sont : les systèmes ABO et RH.

2.1. Le système ABO

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

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

2.2. Le Facteur Rh

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

3. Les Lectines spécifiques des groupes sanguins

Plusieurs lectines agglutinent les hématies des foies avec une spécificité de groupe sanguin (tableau 05) (Bird, 1974).

Tableau 05 : Exemples des lectines spécifiques des groupes sanguins

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

Chapitre III : Généralités sur la plante *Morus nigra*

1. Etymologie

Le murier noir est un arbre originaire d'Afrique. *Morus* en latin et *morea* en grec sont les noms de l'arbre. *Morum* en latin et *moron* en grec désignent le fruit. Ces termes semblent empruntés à la racine celtique « mor » signifiant noir, ce que le nom d'espèce latin *migra*, noir, dit aussi (Tonelli et Gallouin, 2013).

2. La description botanique de la plante

Le murier noir est un bel arbre trapu, noueux, à la large couronne très dense. Il dépasse rarement une quinzaine de mètres de hauteur et, âgé, son tronc peut atteindre 1,50 m de diamètre. La famille des Moracées comprend près de 70 genres et un millier d'espèces, ils supportent le calcaire et affectionnent la lumière (espèces héliophiles) et la chaleur (thermophiles) (lesarbres.fr/murier).

3. La plantation du mûrier noir

Le mûrier noir est un arbre qu'il est préférable de planter à l'automne. Il peut être mis en terre jusqu'au printemps en dehors des périodes de gel. Il est capable de pousser sur tout type de sol et résiste très bien à des températures négatives. Il a besoin de beaucoup de soleil pour pousser correctement. Les zones souffrant de vents froids durant l'hiver sont plutôt à éviter pour sa plantation (deco.fr/jardin-jardinage/arbre-a-fruits/murier-noir)

4. La Classification scientifique de *Morus nigra*

Règne	Plante
Sous-règne	<i>Viridaeplantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Hamamélidées</i>
Ordre	<i>Urticales</i>
Famille	<i>Moracées</i>
Genre	<i>Morus</i>
Espèce	<i>nigra</i>

5. Les propriétés médicinales de *Morus nigra*

Le murier agit comme un léger stimulant, surtout lorsqu'on l'aiguise de quelques gouttes d'acide sulfurique, ce qui se fait par fois, on le met dans les gargarismes, à la dose d'une deux onces dans des

affections non inflammatoires du gosier, et parfois dans quelques tisanes pour édulcorer et qu'on prescrit dans les fièvres bilieuses. On peut classer les propriétés médicinales de *Morus nigra* comme suit :

- Le murier a un grand usage en médecine contre les angines muqueuses, catarrhales, par infiltration.
- Discoride et Pline ont parlé de sa propriété purgative et vermifuge
- Le murier noir est employé comme jus contre la diarrhée.
- On peut utiliser les feuilles de *Morus nigra* contre la dysenterie et les crachements de sang.
- Le murier noir prouve son efficacité contre le diabète, ce qui permet d'entraîner la diminution, voir même la disparition de la glycosurie.
- Le murier noir est riche en glucides, en acides organiques, en pectine et en vitamines. Renferme des flavonoïdes et des anthocyanes.
- Il sert pour soigner divers troubles menstruels ainsi que les irritations de la bouche et de la gorge.
- Les racines des ronces servaient de remède aux jeunes mères et aux femmes enceintes fatiguées.
- Le murier présente une activité antioxydante in vitro avec des ratios d'inhibition.
- Les feuilles et les bourgeons du mûrier sauvage ont servi à soigner l'hémoptysie, les hémorroïdes, la diarrhée, la dysenterie, les oliguries et le diabète.
- Le murier a une grande activité antibactérienne, astringente, dépurative et tonique.
(<http://www.complements-alimentaires.co/murier-noir/>)

Matériels
Et
Méthodes

Matériels et méthodes

1. L'extraction des lectines à partir de *Morus nigra*

Nos travaux ont été effectués sur l'écorce des racines d'un arbre fruitier sauvage. Il s'agit de *Morus nigra* (mûrier noir). Les racines de *Morus nigra* ont été récoltées de la région de Zouaghi à Constantine au mois de Novembre 2014 (Photo 02).



Photo 01: Les racines de *Morus nigra*

Ensuite ont été collectées et séchées à température ambiante. Les racines de *Morus nigra* ont été concassées, râpées minutieusement puis broyées dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre, cette dernière a été tamisée et conservée dans un flacon fermé Contenant le tampon PBS (0,1M pH 7,2) (annexe 01). Le schéma suivant explique les étapes d'extraction des lectines à partir de la poudre de *Morus nigra* :

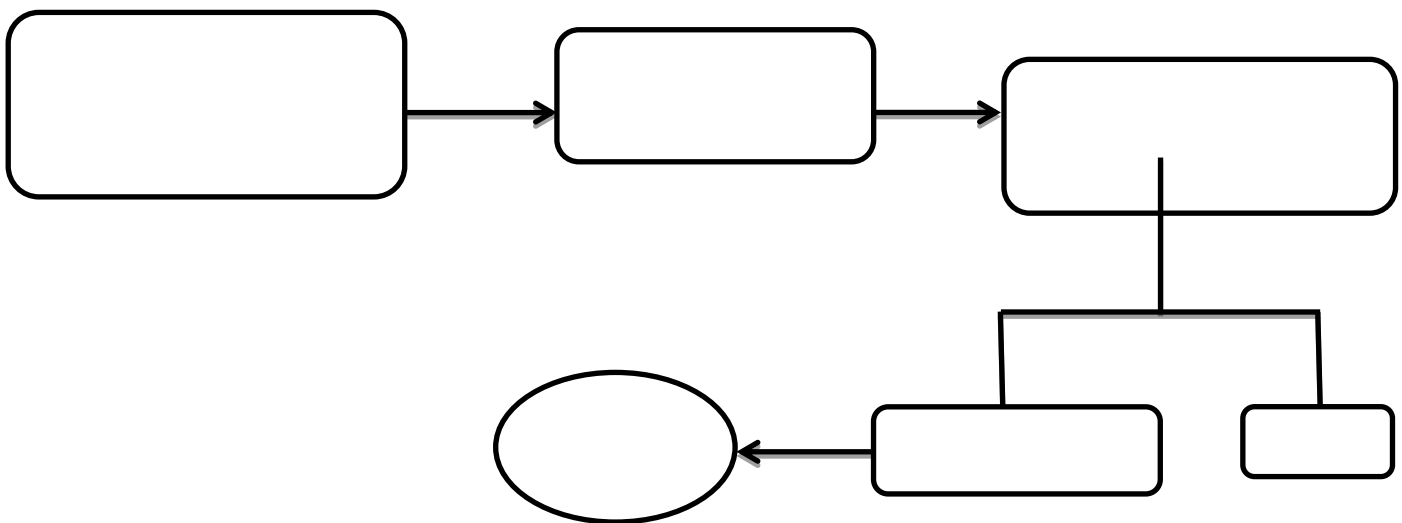


Schéma 01 : Technique d'extraction des lectines à partir de la poudre de *Morus nigra*.

2. Le test d'héماغglutination

Ce test a porté sur les hématies de lapin ainsi que les hématies humaines afin d'effectuer le test d'ABO, Ce test se base sur l'observation de l'agglutination, et par conséquent de la précipitation des érythrocytes en présence de lectine afin d'affirmer leur présence.

➤ La préparation des hématies à 3%

Les hématies sont collectées puis soumises à un lavage ainsi qu'à à une dilution afin de pouvoir mettre en évidence la présence des lectines dans notre extrait.

Après la préparation de plusieurs tubes chacun contenant 2ml du sang, ces derniers centrifugés à 4000tours/minute durant 10min, Avaient résulté un culot et un surnageant qui, par la suite a été éliminé et remplacé par une solution physiologique et à nouveau centrifugé. Cette opération de lavage a été reprise trois fois dans les mêmes conditions. Après le 3ème lavage, les globules rouges sont dilués à l'aide d'une solution d'élution à raison de 1,5ml des hématies dans un volume de 48,5ml d'eau physiologique et cela afin d'obtenir des hématies à 3%.

➤ La technique d'héماغglutination

Au niveau de chaque puits d'une microplaque, 50µl des hématies du lapin ont été déposés tout en ajoutant 50µl d'extrait brut de notre plante. Après 1h, l'agglutination est observée à l'œil nu puis à l'aide d'un microscope optique (GX 40).

3. La technique d'héماغglutination avec ABO

L'étude a été effectuée sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO. Au niveau d'un puits d'une microplaque, 50µl d'extrait de notre plante ont été déposés suivis de 50µl des hématies d'un groupe du sang humain préparés au part avant. La lecture a été effectuée 1heure après le dépôt des hématies à température ambiante.

4. La limite d'héماغglutination

Dans chaque puits, 25µl de solution tampon phosphate ont été ajoutés suivis de 25µl d'extrait brut de *Morus nigra* qui lui, est placé uniquement au niveau du premier puits. Par la suite, on effectue l'ajout de 25µl des hématies du lapin dans tous les puits. La lecture a été effectuée 1heure après le dépôt des hématies à température ambiante. Et cela afin de déterminer l'abondance des protéines au niveau de notre extrait.

5. Le test d'inhibition

L'essai d'inhibition a été effectué en utilisant des solutions mères (dans NaCl à 0,9%), des glucides et des glycoprotéines. 50 µl d'extrait de lectines sont déposés dans chaque puits suivis de 50µl des inhibiteurs (glucides ou glycoprotéines) qui ont été ajoutés dans le premier puits ; une série de double dilution a été préparée. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1h, avant l'addition de la suspension d'érythrocytes (50µl). L'activité d'inhibition de l'hémagglutination a été enregistrée comme étant la dilution la plus élevée de glucides ou glycoprotéines qui inhibent l'activité d'agglutination.

6. Le test du pH

Un tampon phosphate (0,1 M) a été utilisé afin d'étudier la stabilité des lectines de *Morus nigra* dans différentes conditions de pH en allant de 1 à 12, chaque tampon a été mélangé avec l'extrait de l'écorce des racines. Après 24h la centrifugation a été réalisée d'où le surnageant a été récupéré. Enfin un test d'hémagglutination a été effectué.

7. Le test de la température

Le test de la température de *Morus nigra* a été déterminé en incubant des aliquotes de l'extrait brut à des degrés différents de température (40, 60, 80 ,100°et 120°C) dans un bain marie durant une heure de temps. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à température ambiante, enfin le test d'hémagglutination a été effectué.

8. Le test des oligoéléments (Métaux)

Dans un premier temps, l'extrait de *Morus nigra* est ajouté à l'EDTA à la valeur de (1V-1V respectivement).Après une heure 50µl du surnageant de notre composé sont ajoutés à 50µl de l'un des métaux (Mn^{2+} - Mg^{2+} - Ca^{2+}), après une heure 50µl de sang de lapin sont ajoutés au mélange. L'observation est faite à l'œil nu.

9. La Chromatographie sur colonne de Sephadex G75

➤ La préparation de la colonne de Sephadex G75

4 g de Sephadex G75 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH: 7,2). Le mélange a ensuite été incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne de 12x1.2.

➤ **La filtration des lectines de *Morus Nigra***

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

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

10. Le dosage de l'activité phagocytaire

L'étude de l'activité phagocytaire a été effectuée sur des souris ayant un poids moyen de 25g, et qui ont été logés au niveau de l'animalerie dans des bonnes conditions d'hygiène à une température de 21 ± 1 °C, exposés jusqu'à 12h de lumière tout en suivant un régime alimentaire de culot standard (Annexe02) et ayant accès libre à l'eau. Toutes les expériences qui ont été effectuées sont conformées avec le comité institutionnel de l'éthique animale.

Le traitement des souris

Afin d'étudier l'activité phagocytaire, 28 souris ont été partagées en 4 groupes chacun contenant 7 d'entre elles. Le groupe I a été retenu comme témoin, alors que les groupes II, III et VI ont reçu par injection intrapéritonéale des doses de : 25mg/Kg, 50mg/Kg et 100mg/Kg respectivement de l'extrait des lectines d'écorce des racines de *Morus nigra*. Après 48 h, l'activité phagocytaire a été déterminée. Les souris ont reçu une injection de suspension d'encre de carbone à une dose de 0,1ml/100g via la veine caudale, le mélange est composée de 3ml de noir de carbone, 4 ml de solution saline et 4ml solution de gélatine à 3%. Des échantillons de sang ont été prélevés via la veine rétro-orbital en utilisant des tubes capillaires en verre, après 5 et 15 min. Des gouttes d'échantillon de sang ont été mélangées avec une solution de carbonate de sodium à 0,1% (4 ml) pour la lyse des érythrocytes et enfin l'absorbance a été mesurée à 675 nm en utilisant un spectrophotomètre.

L'activité phagocytaire a été exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure toutes les fonctions du système réticulo-endothélial lors d'un contact avec le sang circulant. Le taux de clairance est exprimé comme la demi-vie du carbone dans le sang ($t_{1/2}$ min). Celles-ci sont calculées au moyen des équations suivantes (Biozzi *et al*, 1953) :

$$K = \frac{\ln OD_1 - \ln OD_2}{t_2 - t_1}, \quad t_{1/2} = \frac{0.963}{k}$$

Où DO_1 et DO_2 sont les densités optiques à des moments t_1 et t_2 respectivement.

11. Analyse Statistique

Les résultats de l'activité phagocytaire et le taux de clearance du carbone sont représentés sous forme de moyennes et écart-type. La comparaison entre les différents groupes est effectuée par le test t de student.

* : Différence significative comparant au témoin $P \leq 0.05$

** : Différence hautement significative comparant au témoin $P \leq 0.01$

*** : Différence très hautement significative comparant au témoin $P \leq 0.001$

12. L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique

Le but de cette manipulation est d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de notre extrait.

➤ Les Souches Microbienne et condition de culture

Les bactéries et les champignons utilisés dans ce travail ont été isolés à partir des prélèvements cliniques fournis par le laboratoire de bactériologie (CHU) et d'autres souches identifiées à partir de laboratoires de génie microbiologique et application et le laboratoire de Mycologie Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie. Le tableau 06 présente les microorganismes utilisés :

Tableau 06 : les microorganismes utilisés

Microorganismes	Type de Gram	Pathologie	Localisation
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 433000	positif	septicémies	muqueuse nasale
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	négatif	Infections urinaires, Méningites,	Les intestins
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	négatif	Pneumonies nosocomiales	Le tube digestif L'appareil respiratoire
<i>Bacillus cereus</i> (souche clinique)	positif	Infection opportuniste bénigne	Le sol
<i>Actinobacteria sp</i> (souche clinique)	positif	Abcès indurés	Les amygdales - Les Intestins.
<i>Aspergillus niger</i>	-	Mycoses pulmonaires	Légumineuses
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Pneumonie-fièvre	L'air, Le sol, Les céréales.

<i>Aspergillus flavus</i>	-	Sinusite	L'air, Les céréales, L'arachides
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	Infections opportunistes	Le sol
<i>Candida albicans</i>	-	infections fongiques	Les zones chaudes et humides

➤ Le test de l'activité inhibitrice

La méthode diffusion appelée également méthode de disques, a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne et antifongique de notre extrait (Rahal, 2005).

Cette manipulation comporte plusieurs étapes :

1. La préparation des disques et stérilisation du matériel

Tout d'abord on doit stériliser l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20min, ainsi que l'eau distillée et les tubes à essais utilisés lors de la préparation des solutions bactériennes (inoculum) et aussi dans la préparation des dilutions de notre échantillon. Stériliser les disques du papier Wathman N°1 (6mm de diamètre) après enrobage dans du papier aluminium.

2. Le Milieu

Mettre la gélose MUELLER-Hinton au bain marie (100°), une fois fondue, la maintenir à 45°C jusqu'à utilisation coulée en boîtes de Pétri et séchée avant l'emploi.

3. La préparation des inoculums

Dans la zone septique du bec benzène, et à partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement gélose MH, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester, puis suivre les étapes suivante :

- Décharger l'anse dans 10ml d'eau distillée stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5MC Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau distillée stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

4. L'ensemencement et dépôt des disques

On doit tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis on l'essor en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, ensuite frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface

gélifiée, de haut en bas, en stries serrées. Cette opération a été répétée deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois. L'ensemencement s'est achevé en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés ensuite d'une petite quantité d'extrait de notre plante, puis déposés sur la surface de la gélose par une pince stérile. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve durant 24h.

5. La lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite à l'aide d'un pied à coulisse, elle a été réalisée à l'extérieur de la boîte pour les milieux MH. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

La même procédure de l'activité antibactérienne a été suivie pour tester l'activité antifongique de notre extrait, le milieu de culture utilisé pour le repiquage est PDA. La durée d'incubation de l'antibiogramme est de 48heures.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Le test d'héماغglutination

Le tableau 07 présente l'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de *Morus nigra*.

Tableau07: L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de *Morus nigra*

Plante	Test d'agglutination
<i>Morus nigra</i>	+++

+++ : Très forte agglutination

L'extrait du *Morus nigra* montre une très forte agglutination vis-à-vis des hématies de lapin, cette agglutination a été observée à la fois à l'œil nu et au microscope ce qui prouve que *Morus nigra* contient des lectines, L'interaction entre les lectines et les globules rouges, se manifeste généralement lors du dépôt des lectines au niveau du puits contenant les hématies, ces dernières vont sédimenter au fond du puits dès lors dépôt ; alors que les lectines vont interagir avec elles, et former un amas homogène sous forme d'une phase gélatineuse ; c'est le phénomène d'héماغglutination (Photo02).



Photo 02 : Test d'héماغglutination de la lectine extraite de *Morus nigra* avec la suspension de lapin à l'œil nu.

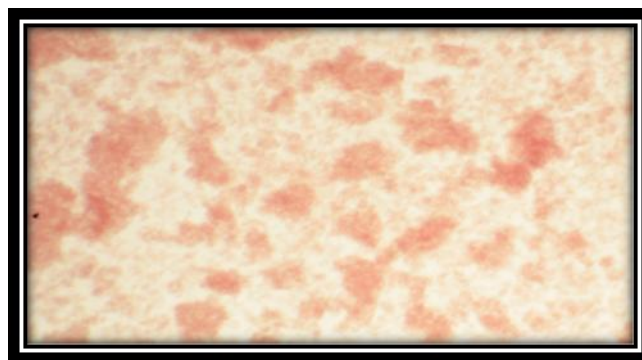


Photo 03 : observation microscopique d'héماغglutination de la lectine extraite à partir de l'écorce des racines de *Morus nigra* avec la suspension de lapin GX40

La lectine au niveau de la plante s'attache au récepteur sur la surface des hématies, et parce qu'il est polyvalent, forme un réseau de globules rouges qui se déposent en couche fine, rosée, ce résultat est observé au microscope: on parle d'héماغglutination positive (Photo 03). En absence de lectine, les cellules roulent au fond du puits où elles s'accumulent en un bouton rouge dense: l'héماغglutination est négative. Le

potentiel d'hémagglutination des lectines a été étudié en utilisant des érythrocytes natifs de lapin ce qui a montré une bonne hémagglutination. C'est résultats ont été similaires à ceux des lectines extraites des racines des plantes (Necib *et al*, 2014) ainsi qu'à ceux de *Moringa G* et *Moringa M* et qui ont montré également de très fortes agglutinations lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes de lapin (Necib *et al*, 2014).

2. La limite d'hémagglutination

La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination. Le Tableau 08 et Photo 04 montrent les résultats obtenus lors du test de limite d'hémagglutination.

Tableau 08 : Activité de la limite d'hémagglutination de *Morus nigra*

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Extrait											
Morus nigra	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Très forte agglutination

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination

- : Absence d'agglutination

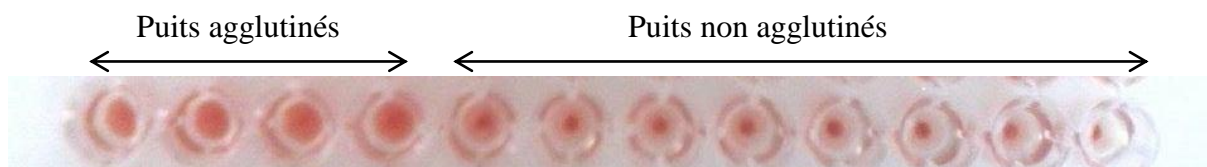


Photo 04: La limite d'hémagglutination de *Morus nigra*

L'extrait de *Morus nigra* a montré une très forte agglutination vis-à-vis des globules rouges lors de sa dilution au niveau des 2 premiers puits, alors qu'elle diminue au niveau des 2 puits qui suivent, et disparaît complètement au niveau des puits suivants (5→12) ce qui donne une concentration de (16UH.ml⁻¹); contrairement à *Terfezia bouderei* qui a montré une forte agglutination allant jusqu'au 7^{ème} puits (128 UH.ml⁻¹) (Zitouni *et al*, 2014). Alors que l'absence d'agglutination au niveau des autres puits est due à la dilution effectuée donc les fractions contenues sont des diluâtes de l'extrait brût.

3. La technique d'hémagglutination avec ABO

Tableau 09 : L'agglutination des hématies humaines par l'extrait de *Morus nigra*

Groupe sanguin \ Extrait	A	B	O
<i>Morus nigra</i>	+++	-	-

+++ : Forte hémagglutination.

- : Absence d'hémagglutination.

Les résultats du tableau 8 montrent que l'extrait de *Morus nigra* a prouvé une grande affinité vis-à-vis des globules rouges du groupe A ce qui a abouti à une forte agglutination. Ces résultats sont comparables à ceux d'Escargot *Helix pomatia* (HPA) (Camus, 1899) qui lui aussi avait prouvé le même type de résultats. Alors qu'il ne présente aucune hémagglutination avec les autres groupes sanguins (B et O) ce qui n'est pas le cas de *Pterocladia capillacea* (algue rouge) qui lui a une activité avec le groupe B (NecibY *et al*, 2014). Donc, notre lectine est spécifique au groupe A uniquement. Tandis que les graines extraites à partir de *Senegalesis* avaient indiqué un autre genre de lectines non spécifique (Doumbia, 2005). Notre résultat indique que nous pouvons utiliser la lectine de *Morus nigra* comme réactif de groupage.

4. Le test d'inhibition

Le test d'inhibition a été réalisé afin de terminer la spécificité des lectines présentes au niveau de *Morus nigra* en utilisant un grand nombre de sucres simples et de glycoprotéines et cela grâce à la technique HLA.

Tableau10 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par les glycoprotéines

Glycoprotéines	Activité d'hémagglutination
Fetuin	+
Insuline	-
Caseine	+
BSA	-
Ovalbumine	-

+ : Inhibition de l'activité d' hémagglutination

_ : Absence d'inhibition

Tableau 11 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples

Monosaccharides	Activité d'hémagglutination
Glucose	+
Galactose	+
Lactose	-
Mannose	+
D-glucosamine	+
Xylose	+
Galactopyranose	+
Manitol	-
Maltose	-
Melibiose	-
Inositol	-
Fucose	-
Raffinose	-
Arabinose	-
Fructose	-
N-acétyl-glucosamine	-
Sorbose	-
Saccharose	-
Méthyl-fucopyranoside	-
Méthyl-mannopyranoside	-
	-

N-acétyl-galactosamine	
Sorbitol	-
Methyl-B-L-fucopyranoside	-
Xylitol	-
Cellulose	-
Rhamnose	-

+ : Inhibition de l'activité hémagglutination

_ : Absence d'inhibition

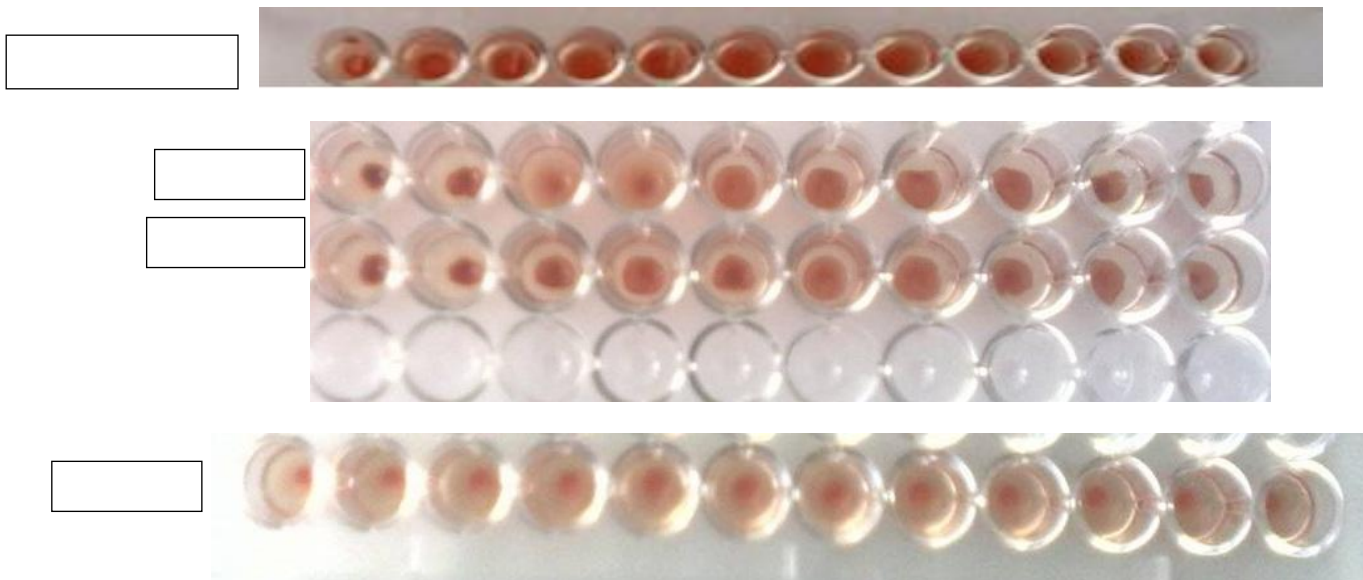


Photo05 : La limite d'inhibition d'extrait de *Morus nigra* avec le D-Glucosamine, Glucose, Mannose et Galactose.

Tableau12 : Limite d'inhibition avec les différents sucres

Dilution Sucre	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Mannose	-	-	-	+	+	+	++	++	+++	+++	++++
Glucose	-	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
D- glucosamine	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Galactose	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : Absence d'agglutination

+ : Faible agglutination

++ : Forte agglutination

+++ : Très forte agglutination

L'extrait du *Morus nigra* a démontré une inhibition avec certaines glycoprotéines (fetuïn, caseïne) ainsi que des monosaccharides (D-glucosamine, Galactopyranose, glucose, galactose et le mannose) ce qui prouve la différenciation de ses récepteurs. La concentration minimale a été calculée avec le D-Glucosamine et a été démontrée qu'elle est de l'ordre de 0,00625g/ml au niveau du 4ème puits, en utilisant une concentration initiale de 0,1g/ml, alors que le Glucose prouve une concentration minimale de 0,05g/ml dans le 2ème puits, et celle du Mannose est de 0,025g/ml au niveau du 3ème puits et celle du Galactose est de 0,0125g/ml au 4ème puits ; quand la concentration initiale est de 0,2g/ml. Ce qui prouve que le Galactose a la plus grande affinité. Cela révèle que la lectine n'est pas inhibée par les sucres simples uniquement mais par des glycoprotéines également. Ce qui a aussi été observée chez certaines algues marines comme *Agardhiella tenera* Schmitz, *Ulva lactuca*, *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kützing *B. triquetrum* et *Amansia multifida* Lamouroux . Tandis que Le corail *Sinularia lochmodes* reconnaît spécifiquement les sucres D-galactose et N-acétyl- D-galactosamine (Jimbo *et al*, 2000). Ceci prouve une affinité différente des lectines, alors qu'il existe des lectines non spécifiques comme celles extraites à partir de *Moringa pterygosperma* [12-200 Da] (Maricel *et al*, 2004).

5. L'effet du pH sur l'hémagglutination

Tableau 13 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Morus nigra*

Ph	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Activité d'hémagglutination	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : Absence d'agglutination

+++ : Très forte agglutination

L'extrait de *Morus nigra* avait prouvé une activité d'agglutination stable dans un intervalle allant de [3 à 12] par contre de [1 à 2] l'agglutination est nulle .ces résultats ont été comparés çà ceux de Chaudhary et Sood (2008) qui ont montré que la lectine de *Ricinus communis* est stable au pH [3-7].

6. L'effet de la température sur l'hémagglutination

Tableau 14: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Morus nigra*

Température	40°C	60°C	80°C	100°C	120°C
Activité d'hémagglutination	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination

Lors de son exposition à différentes températures de 40 C° - 60C°-80C°-100C°et 120C°durant 1h, *Morus nigra* garde toujours son activité d'agglutination donc cette lectine présente une forte résistance à haute température. Le même résultat est prouvé également pour *Pterocladia capillacea* qui présente les mêmes caractéristiques que notre lectine (Necib *et al.*2014).

7. Le Test des métaux

Tableau15 : Résultats du test des métaux avec *Morus nigra*

Les oligoéléments	EDTA	MnCl ₂	MgCl ₂	CaCl ₂
Activité d'agglutination	+++	+++	+++	-

+ : Agglutination

- : Inhibition

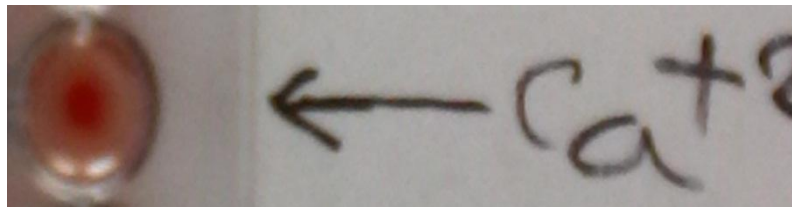
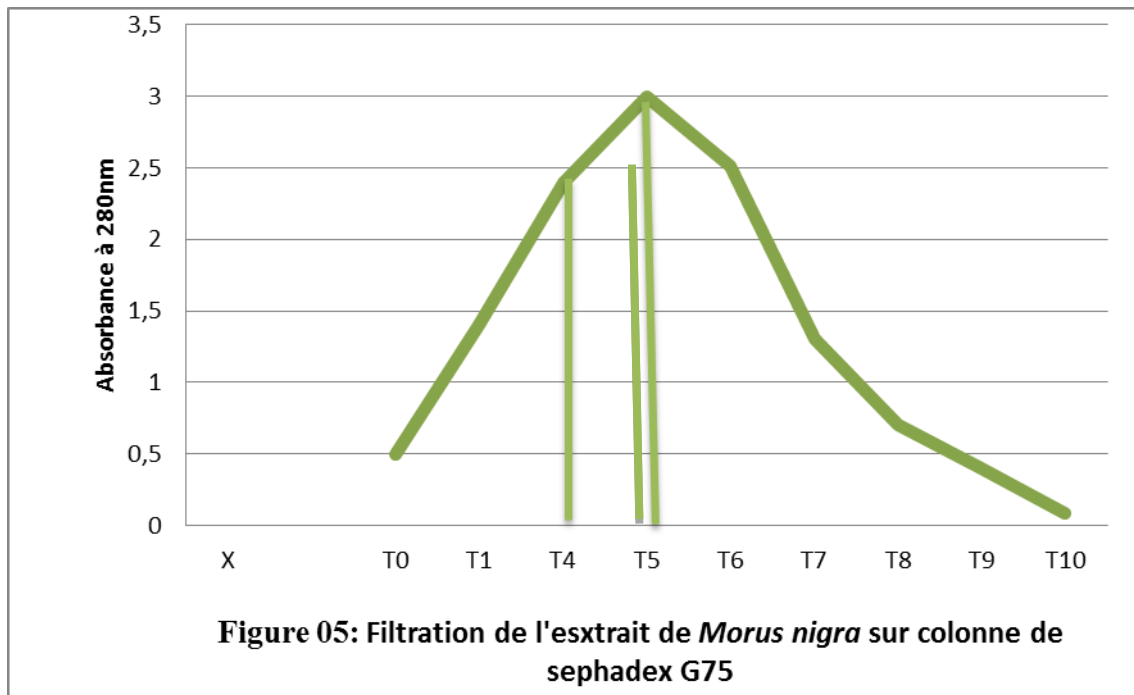


Photo05: Inhibition de lectine de *Morus nigra* avec le calcium

Le *Morus nigra* présente une inhibition vis à vis du calcium (Ca^{2+}) contrairement aux autres métaux (magnésium et manganèse) qui eux ont présenté une agglutination lors du contact avec l'extrait. Ce résultat montre que notre lectine est une métalloprotéine contrairement à red alga *Pterocladia Capillacea* qui ne présente aucune activité avec les métaux ce qui fait d'elle une lectine non métalloprotéine (Necib *et al.*, 2014).

8. La Chromatographie sur colonne de sephadex G75



Eluant : PBS pH 7,2

Absorbance à 280nm

Volume de la fraction: 5ml

La filtration de l'extrait de *Morus nigra* sur colonne de sephadex G75 et la lecture à 280nm a montré un pic (Figure05). Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces trois tubes, un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit dans le chapitre précédent. Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence de lectines avec une très forte hémagglutination. Par la suite les trois tubes ont été mélangés et lyophilisés pour être utilisés dans le test de l'activité phagocytaire.

9. Etude de l'activité phagocytaire

Afin de déterminer le rôle des lectines de *Morus nigra* dans le système immunitaire, un test d'activité phagocytaire (Figure06) a été réalisé où la vitesse d'élimination du carbone a été calculée (Figure 07). Les résultats illustrés dans la figure 06 démontrent une augmentation statistiquement non significative chez les souris traitées par la dose 25mg/kg et significative chez les souris traitées par les doses 50mg/kg et 100mg/kg respectivement par rapport au témoin, par contre on observe une diminution non significative dans la clearance de carbone chez les souris traitées par la dose 25mg/kg et significative chez les souris traitées par les doses 50mg/kg et 100mg/kg respectivement par rapport le témoin (Figure 07).

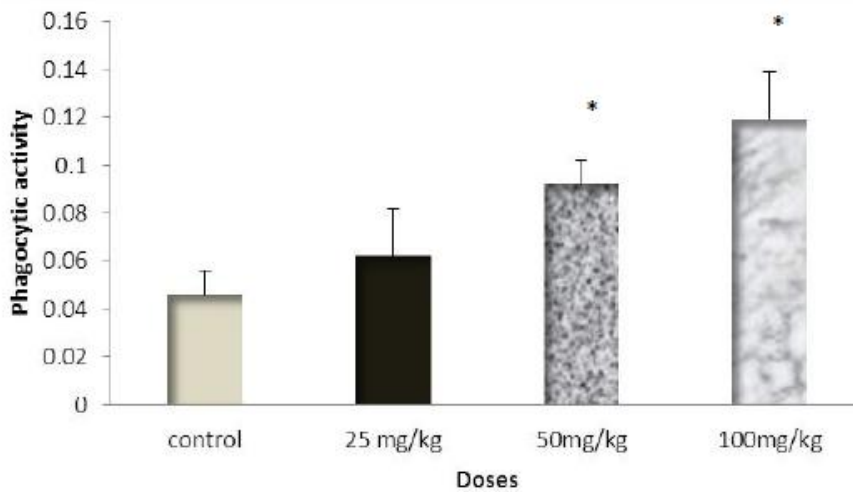


Figure06 : Effet des lectines extraites de *Morus nigra* sur l'activité phagocytaire

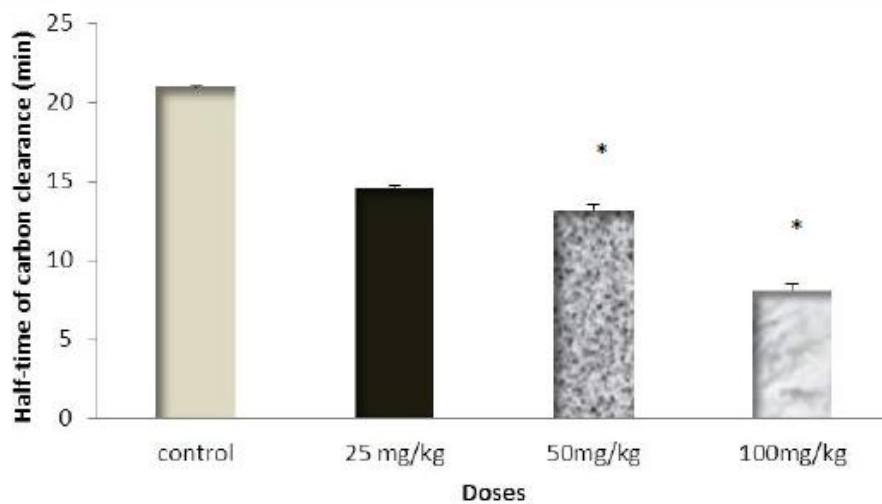


Figure07 : Effet de lectines extraites de *Morus nigra* sur la demi-vie $t_{1/2}$ de carbone dans le sang.

Le système réticulo-endothélial (RES) se compose de la rate, le thymus et d'autres tissus lymphoïdes, ainsi que les cellules qui tapissent les sinus de la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques et l'endothélium capillaire du foie (cellules de Kupffer), et de la surrénale et la glande pituitaire, ceux-ci comprennent l'essiles ou macrophages fixes, qui sont transportées par les fluides corporels ou errent à travers les tissus. Par conséquent, l'activité phagocytaire des macrophages est un indicateur important des fonctions immunitaires de l'organisme, et ce qu'il a été remarqué dans notre test : au fur et à mesure qu'on augmente la dose on a une augmentation parallèle de l'activité phagocytaire. L'élimination est la phase qui assure la disparition d'une substance de l'organisme soit parce qu'elle est excrétée, soit parce qu'elle est transformée en autres produits qui ne sont plus décelables. Pour confirmer l'effet de lectine extraite de *Morus nigra* sur l'activité phagocytaire, un test (clairance du carbone) a été

réalisé et a ainsi révélé que de plus en plus la dose est injectée ; le temps de clairance du carbone dans le sang diminue graduellement. Ceci indique que la lectine extraite de *Morus nigra* influence le mécanisme de phagocytose, largement distribué par les monocytes, macrophages ou RES qui se traduisent par une augmentation significative de l'indice phagocytaire du test de clairance de carbone, ce qui en accord avec les expériences de Hou *et al.* (2010), Necib *et al.* (2014), Bouadi *et al.* (2014) .

10. Etude de l'activité antimicrobienne

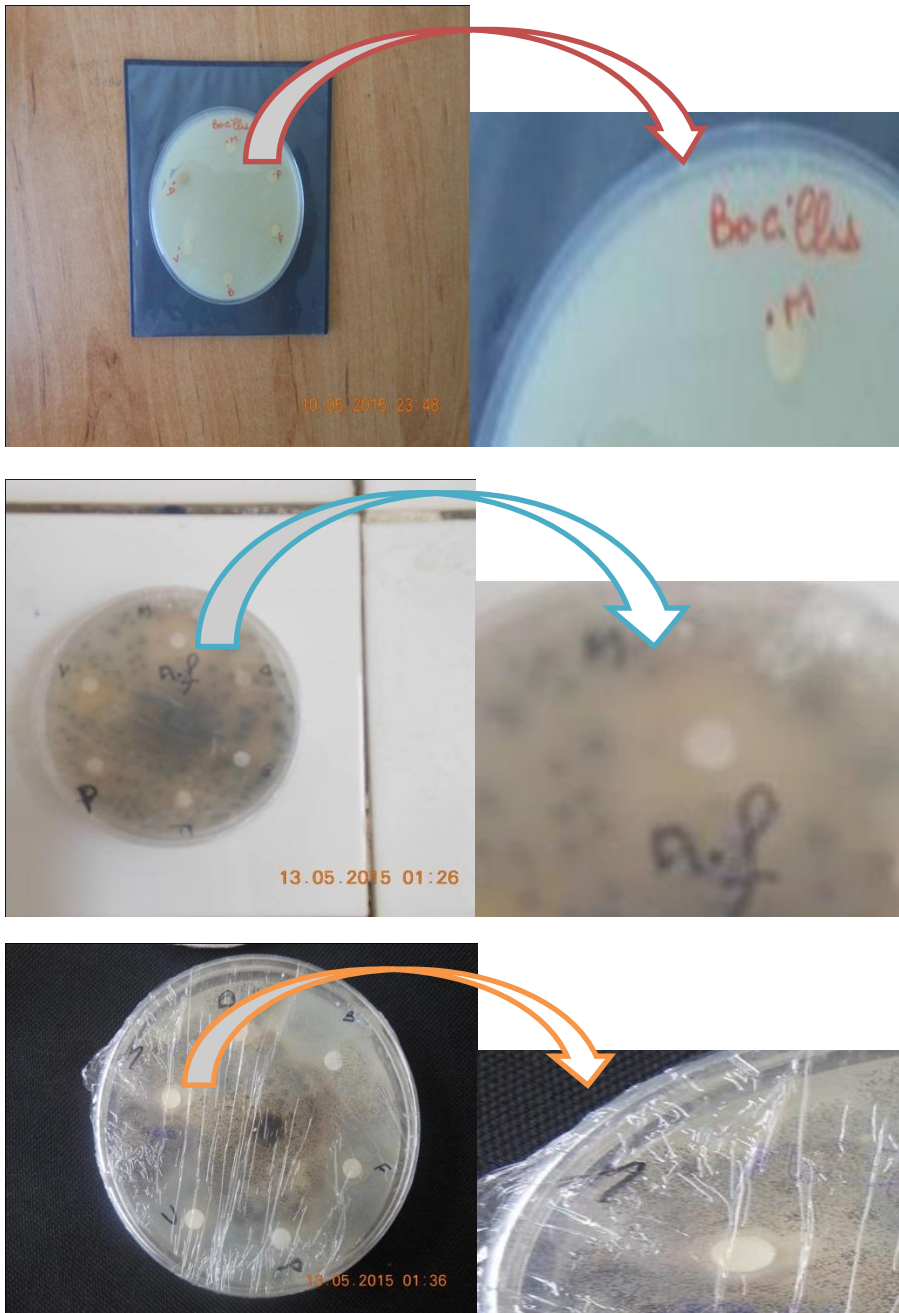


Photo07 : L'effet inhibiteur de l'extrait de *Morus nigra* sur l'activité de *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*.

Tableau 16: Diamètres de zones d'inhibition de *Morus nigra* avec les différentes souches microbiennes

Microorganismes	Zone D'inhibition (mm)
<i>staphylococcus aureus</i> ATCC 433000	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	-
<i>Bacillus cereus</i> (souche clinique)	+
<i>Actinobacteria sp</i> (souche clinique)	-
<i>Aspergillus niger</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	++
<i>Aspergillus flavus</i>	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-

+ : Faible zone d'inhibition.

++ : Zone d'inhibition moyenne.

+++ : Forte zone d'inhibition.

- : Absence d'inhibition.

La lectine contenue au niveau de l'extrait de *Morus nigra* présente une activité inhibitrice à la fois antifongique et antibactérienne avec les différents microorganismes (Photo 07). On remarque que la zone inhibitrice antifongique avec *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* est suffisamment apparente, par contre les autres souches fongiques ne présentent aucune zone d'inhibition, en revanche l'activité antibactérienne présente une faible zone d'inhibition juste avec *Bacillus cereus* tandis que les autres souches bactériennes ne présentent aucune activité antibactérienne (Tableau 16). Cette différenciation de diamètres montre que probablement notre lectine au niveau de l'extrait de *Morus nigra* est plus spécifique à *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Bacillus cereus*. Ces résultats sont comparables à ceux de (Ananil *et al*, 2000).

*Conclusion
générale
Et
Perspectives*

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressés à une plante choisie et identifiée qui a fait l'objet d'une étude d'extraction de nouvelles lectines. Il s'agit de « *Morus nigra* ».

- ✚ La recherche des lectines à partir de *Morus nigra* a conduit à une activité d'hémagglutination, tandis que le test d'inhibition d'hémagglutination révèle qu'il y a une affinité différente chez les monosaccharides et les glycoprotéines, affinité qui peut être utilisée pour leur purification.
- ✚ L'extrait de *Morus nigra* étudié a pour sa part démontré une spécificité pour le groupe sanguin A du système ABO. Ceci permet son utilisation en tant que réactif de groupage qui agglutine avec les hématies A.
- ✚ Une autre spécificité de l'extrait de *Morus nigra* le distingue à son inhibition au calcium par rapport aux autres métaux lourds. Ce qu'il peut faire de lui un remède en cas d'hypercalcémie.
- ✚ D'autre part, l'extrait de *Morus nigra* est thermorésistant, stable dans la gamme de pH acide.
- ✚ Le test immunomodulateur montre un effet positif de l'extrait de *Morus nigra* sur l'activité phagocytaire et l'amélioration de la vitesse d'élimination des substances étrangères de l'organisme.
- ✚ L'activité antimicrobienne de l'extrait de *Morus nigra* présente une forte zone d'inhibition fongique d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* et une faible inhibition bactérienne (*Bacillus cereus*) Ce qui peut faire de lui un antibiotique en cas d'infection bactérienne ou fongique.

Les perspectives de ces travaux de recherche visent la poursuite des évaluations biologiques qui permettront la purification par chromatographie d'affinité et HPLC et de vérifier dans les faits les tests anti cancer, anti-virus, devant déboucher vers une éventuelle production de remèdes qui sera une avancée pour la médecine.

Références

Références

- Alencar N.M, Cavalcante C.F, Vasconcelos M.P, Leite K.B, Aragao K.S, Assreuy, A.M, Nogueira N.A., Cavada B.S. and Vale M.R.** (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*, (57): 919-922.
- Ananil K , Hudson J. B. de Souza c, AkpaganalK , Toweg. H.N, Amason J. T and Gbeassor.** (2000) Investigation of medicinal plants of TOGO for antiviral and antimicrobial activities. *Phannaceutical Biology* 38 (1) : 40-45
- Assreuy A. M. S**(1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation*, (6): 201-210.
- Assreuy A. M. S , Fontenele S. R., Pires A. F, Fernandes D. C, Rodrigues N. V, Bezerra E. H, Moura T. R., Do Nascimento K.S, Cavada B. S.** (2009) Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380(6) : 509-521.
- Ayméric J-L, Lefranc G.** (2009) *Immunologie Humaine*. De Boeck & Laccier S.A. Paris : 24.
- Bouadi H, Necib Y, Bahi A.** (2015) Immunomodulatory Activity of Lectins Extracted from *Illicium Verum*.. *Int. J. Pharm. Sci* (31): 129-131.
- BANWELL J.G.** (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean : a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology*.(84): 506-515.
- Basu Debkumar, Appukuttan P. S.** (1983) Plant lectins specific for N-acétyl-B-Dgalactosamine. *Biosci* (5). Supp (1):131-135.
- Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro T. B, Freitas L. A. R., Barral-Netto M.** (2001) In vitro lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae subtribe*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (5): 673-678.
- Berk Z.** (1993) *Technologie de Production de Farine alimentaire et de Produits protéiques*. FAO : 14.
- Bianchet M. A, Ahmed H., Vasta G. R, Amzel L.M.** (2009) Structural aspects of lectin-ligand interaction In Vasta G0 R., Amzel L. M. *Animal lectins: a functional view*. TAYLOR&FRANCIS. LLC: 13-14.
- Bird G.W.G .**(1974). Plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte anomalies. *Ann. N.Y. Acad.Sci* ; 234,129.
- Bothan M. B, Weil K. R.** (2011) *Biochimie de harper*. 4^{ème} édition. DE BOECK : 510.
- Bouchara J. P, Tronchin G.** (1999) *Adhésion et Pathogénicité dans les infections*

aspergillaires. *Méd. Mal. Infect* 29: 705-711.

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

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

Biozzi, G. Benacerraf B, Halpern B.N (1953): Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system II.J. *Exp.Path.*(34): 441-454.

Boyd W.C, Shapleigh E. (1945) Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). (119): 419

Boyd, W.C. and ShaopleiGgh, E, (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) : 119, 419.

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

Chrispeels, MJ and Raikhel, NV (1991). Lectins, Lectin genes and their role in plant defense.*Plant cell.* (3): 1-9.

Cummings R.D. (1997). Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization.*In Glycoscience, status and perspectives.* (H.J. Gabius & S. Gabius, eds.) Champman & Hall GmbH, Weinheim. (1981): 191-199.

Chaudhary H, Sood N. (2008). Purification and partial characterization of lectins from in vitro cultures of *Ricinus communis*. *Plant Tissue Cult & Biotech* **18(2)** : 89-102.

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

David S (1995). Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres: introduction chimique aux glycoprotéines. CNRS : 245.

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

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

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

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

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

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

Guénard H et al. (2001). *Physiologie humaine*. 3^{ème} édition. PARDEL : 497

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

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

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

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

Gomes B. S, Siqueira A. B. S, Maria R. C. C , Teisceira V. G. E. H, Anuda F. V.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lefrere JJ, Berche P. (2010). [Karl Landsteiner discovers the blood groups]. *Transfus Clin Biol* (17): 1-8.

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

Liener I. E. (1976). Phytohaemagglutinins (Phytolectins). *Annu. Rev. Plant Physiol* 27: 291–319

Liener, I. E.; Sharon, N. and Goldstein, I.J., (1986). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, Orlando, FL. pp: 600.

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

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

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

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

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

Necib .Y, Bahi.A, Merouane.F, Bouadi. H, Boulahrouf. K. (2014). Immunomodulatory activity of lectin extracted from THE RED MARINE ALGA *PTEROCLADIELLA CAPILLACEA* .Volume 4, Issue 1, 1693-1706.

Nultsch W. (1998) *Botanique Générale*. DE BOECK : 51.

OM (1957) Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann Med Exp Biol Fenn* 35:1.

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

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

Peumans WJ, Van Damme EJ (1998) Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 209-258.

Peumans WJ, Hause B, Van Damme EJM. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different subcellular compartments. *FEBS Lett*, 2000a; 477: 186–192.

Pontet M. (1996) Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales: les galectines. *Immunoanal.Biol. Spéc* 11: 297-305.

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

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

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

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

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

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

Sharon, N., Lis, H. (1989). Lectins.Chapman and Hall, London.

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

Sharon N (2008) Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 36: 1457-1460.

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

Tonelli.N, Gallouin.F (2013) Des fruits et des graines comestibles du monde entier. LAVOISIER S.A.S.

Van Damme EJM, Barre A, Bemer V, Rouge P, Van Leuven F, Peumans WJ. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant Mol Biol*, 1995a; 29: 579–598

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

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

Wehner R., Ghring W.J., Meyer C., Kirsch R. (1999) Biologie et physiologie animales : bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles. 23ème édition, DE BOECK : 180.

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

Yang X., Cheng Y., Wang B. (2011) Synthetic lectin mimics artificial carbohydrate receptors In Wang B., Booms G-J. *Carbohydrate recognition: Biological problems, methods and applications*. John Wiley and Sons.INC :330.

Yeh KW, Chen JC, Lin MI, Chen YM, Lin CY. Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Mol Biol*, 1997; 33: 565–570.

Zang G., Sun J., Wang H., Ng T. B. (2010) First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom*. *Phytomedicine* 17:775-781.

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

Références électroniques

deco.fr/jardin-jardinage/arbre-a-fruits/murier-noir

<http://www.complements-alimentaires.co/murier-noir/>

Annexes

Annexes

Annexe01 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (ph=7,2)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 1,44\text{g}$

$\text{KH}_2\text{HPO}_4 = 0,24\text{g}$

$\text{NaCl} = 5\text{g/l}$

$\text{KCl} = 0,2\text{g/l}$

Annexe 02 : Composition de l'alimentation des souris

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

Résumé
