



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie moléculaire et santé*

Intitulé :

**Etude de l'activité antioxydante in vitro extraites à partir des
plantes :**

Punica granatum , Olea europaea , ficus carica

Présenté et soutenu par :

❖ **RABHI HADJER**

❖ **BACHIRI KHAWLA**

Le : 05-6-2016

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : NECIB Y. (Pr.UFM Constantine)

Rapporteur : BAHY A. (MCB.UFM Constantine)

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

*Année universitaire
2015 /2016*

Remerciement

Tout d'abord Dieu merci d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner et d'exploiter les vérités de l'univers et le tout puissant qui nous a donné la patience, la force et le courage pour pouvoir mener à terme ce travail.

Merci infiniment à notre encadreur Mlle Bahi. M. C à Université des Frères Mentouri Constantine, pour ses aides techniques et ses orientations. Pour tous les conseils et l'attention qu'elle nous a prodigué tout au long de la réalisation de ce travail. Pour sa gentillesse, simplicité, sa sympathie nous sommes très honorés que nous avons la chance de travailler avec lui.

Grand et respectueux remerciement va au monsieur necib y professeure au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à Université des Frères Mentouri Constantine qui se considéré comme un père spirituel de se thème d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire. On vous remercie surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.

Je tiens aussi à témoigner ma gratitude à l'égard du Melle DJEMAIZOUGHACHE Soumia pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Ses remarques et ses critiques seront pour nous une source d'enrichissement.

Merci aux membres du jury (Pr. NECIB Youssef, Dr BAHI Ahlem, Melle DJEMAIZOUGHACHE Soumia) d'avoir examiné notre mémoire et évaluer notre travail. pour leurs présence nécessaire et utile au sein du jury. Et la confiance qu'ils nous ont accordée tout au long de ce parcours.

Sans oublier de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir
donnée la force et la patience.*

*A ceux qui m'ont donné sans rien en retour,
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus
difficiles,
Et ceux à qui je dois tant*

*A mes chers parents et grande parents pour leur amour et leur support
continu,*

*Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies.
Je suis très heureuse et fière de votre présence à mes côtés.*

*A mes chers oncles et ma tante
A mon frère et ma sœur
A mes adorables cousins et mes cousines*

*A toute ma famille
A tous mes enseignants du primaire, du secondaire et du supérieur, qui
supporte moi
A mes amies*

*Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur
et tranquillité.*

khawla

Dédicace

Cette thèse est l'histoire d'une jeune fille qui s'est dit un jour: je serai chercheur en sciences. J'ai progressé dans la vie et dans mes études en m'attachant à cette idée. Et voilà un de mes rêves achevé; le fruit de plusieurs années de travail et de maturation au niveau spirituel et scientifique: Ma Thèse „Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.

À l'issue de la rédaction de cette thèse, je voudrais rendre hommage à ceux qui ont gravés dans mon esprit, comme ce travail de recherche est gravé sur ce manuscrit. A mon meilleur papa, meilleur ami, meilleur inspirateur, Un énorme merci à maman On partage beaucoup de moments ensemble qui sont gravés dans nos cœurs pour la vie.ma réussite dans la vie est Grâce à ses prières.

J'ai eu la chance de mener cette expérience spéciale

Je remercie vivement le Dr Bensegueni pour tout le support et les informations pertinentes aux niveaux scientifique et technique qu'il a pu m'apporter durant la période que j'ai passée parmi eux. Sa patience, sa très bonne humeur et sa gentillesse m'ont permis d'évoluer dans un cadre agréable.

Un énorme merci pour mes sœurs, mes frères, mes belles sœurs, mes beaux-frères, mes nièces, mes neveux et surtout mon idole Aidou .

Les mots sont bien petits pour exprimer mon admiration. Tous les merci du monde n'est pas suffisant à ma sœur naima, qui m'a toujours soutenue, encouragée et conseillée dans toutes les situations que j'affronte et réelement je la considère comme ma mère.

Je suis arrivée là. À toutes mes amies, Merci d'avoir émerveillé ces années avec tant de souvenirs inoubliables, des moments de plaisirs et de chagrins. À ceux qui m'ont aimée sincèrement, mes seuls les vrais amis laissent leurs vives empreintes. nouhad , zineb, khaoula

HADJER

Résumé

Ce travail porte sur la recherche de la présence des lectines et la propriété biologique qui est l'activité antioxydante de *Punica granatum*, *ficus carica* et les feuilles d'*Olea europaea* la présence des lectines dans les extraits de ces plantes a été effectué par le test d'hémagglutination et leur étude biologique. L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon. l'activité hémagglutinante d'extraits de *Punica granatum*, *ficus carica* et l'*Olea europaea* (les feuilles) a été de 1 :32, 1 :8 et 1 :16 respectivement. le traitement thermique des lectines de *Punica granatum*, *ficus carica* et l'*Olea europaea* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour inhibe l'agglutination. l'activité hémagglutinante de *Punica granatum* et *ficus carica* est stable à Ph [1 à 12], celle de l'*Olea europaea* stable à pH [1 à 2] et [7 à 9]. un test a été effectué par la suite avec différents saccharides (glucose, galactose, mannose, xylitol, melibiose, rhamnose, lactose) et avec des glycoprotéines (casine et fétuine) qui à montrer aucune spécificité pour les saccharides testés et les glycoprotéines testé. pour le test d'ABO les lectines de *Punica granatum* et *ficus carica* désignées comme non spécifique, . Au contraire l'extrait d'*Olea europaea* ne présente aucune sélectivité pour les groupes du système ABO. Les lectines de *Punica granatum* et *ficus carica* montre une agglutination avec tous les métaux testé Ce résultat montre que notre lectine est une non métalloprotéine contrairement à l'extrait d'*Olea europaea* ne présente aucune activité avec les métaux testé ce qui fait d'elle une lectine métalloprotéine. L'extraction de nos lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G25 et G75 à donner un seul pics pour toutes les plantes par contre L'extraction de nos lectines par chromatographie sur colonne échangeuse d'ion à donner deux pics pour toutes les plantes. L'activité antioxydant des plantes médicinales est évaluée soit par le dosage des produits formés (en particulier des hydroperoxydes) par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres.

Les méthodes appliquées pour mesurer l'activité antioxydant *in vitro* sont: le dosage des protéines et le test du SOD (superoxyde dismutase) et le fer ferrique ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH (diphenyl-picrylhydrazyle)

L'évaluation de l'activité antioxydante par ces tests, a révélé un grand pouvoir antioxydant surtout pour l'extrait *Punica granatum* puis, *ficus carica* et *Olea europaea*

Mots clés : plantes médicinales, lectines, hémagglutinante, système ABO, inhibition, activité antioxydant, piégeage des radicaux libres, SOD, DPPH, fer ferrique,

Abstract

This work deals with the search for the presence of lectins and the biological property is the antioxidant activity of Punica granatum, ficus carica and leaves of Olea europaea the presence of lectins in the extracts of these plants was made by the test hemagglutination and biological study. The extraction was made by grinding and maceration in a buffer solution of extract from hemagglutinating. The activity of Punica granatum, Ficus carica and Olea europaea (leaves) was 1: 32, 1: 8 and 1: 16 respectively. The heat treatment of lectins of Punica granatum, ficus carica and the Olea europaea 40 ° C to 90 ° C was not enough to inhibit agglutination. The activity of hemagglutinating of Punica granatum and ficus carica is stable to pH [1-12], that of the Olea europaea stable at pH [1 to 2] and [7 to 9]. A test was carried out subsequently with different saccharides (glucose, galactose, mannose, xylitol, melibiose, rhamnose, lactose) with glycoproteins (casein and fetuin) which showed no specificity for the tested saccharides and tested glycoproteins. For the test of ABO lectins Punica granatum and ficus carica designated as non-specific. Instead extract Olea europaea has no selectivity for groups of ABO system. Lectins of Punica granatum and ficus carica shows agglutination with all the tested metals. This result shows that our lectin is a non metalloprotein unlike the extract of Olea europaea has no activity with the tested metal which makes it a lectin metalloprotein. The extraction of our lectins by chromatography on a G25 sephadex column and G75 to give a single peak for all plants by extraction against our lectins by chromatography on an ion exchange column to give two peaks for all plants. The antioxidant activity of medicinal plants is measured either by assaying the products formed (in particular hydroperoxides) by more or less direct photometric techniques, or by measurement of the compound efficacy at trapping free radicals

the methods applied to measure the antioxidant activity in vitro are: the determination of protein and testing of SOD (superoxide dismutase) and ferric iron and the method using the free radical DPPH (diphenyl-picrylhydrazyl). The evaluation of the antioxidant activity of these tests revealed a great power especially for the antioxidant extract Punica granatum then, ficus carica and Olea europaea

Keywords: medicinal plants, lectins, hemagglutinating, ABO system, inhibition, antioxidant activity, scavenging free radicals, SOD, DPPH, ferric iron

ملخص

يركز هذا العمل على البحث عن وجود اللكتينات والخصائص البيولوجية التي هي النشاط المضاد للأوكسدة لنبات

Punica granatum , ficus carica , Olea europaea اوراق

الاستخلاص تم بواسطة الطحن ذو النقع في محلول ملحي. نشاط التراص لمستخلص

Punica granatum, ficus carica , Olea europaea

من 1 إلى 1/32 و من 1 إلى 1/8 ومن 1/16 على الترتيب. إخضاع اللكتينات لدرجة حرارة من 60 إلى 90 درجة غير كافي لتثبيط علمها. نشاط التراص للكتينات في يبقى ثابت عند درجة حموضة من 1 إلى 12 و من كذلك من 1 إلى 12 بالنسبة للكتينات الأولى والثانية على الترتيب أما بالنسبة للثالثة فان النشاط يبقى ثابت عند الدرجة من 1 إلى 2 ومن 7 إلى 9. ثم تم تطبيق اختبار التثبيط مع عدة سكريات هي الغلوكوز , الغالكتوز , المانوس , الميليبوز , الرامنوس و الاكتوز وكذلك مع الغليكوبروتينات الكازين و الفيتوين و قد بين الاختبار عدم وجود اي خصوصية من طرف لكتينات النباتات المستعملة لأي من السكريات و الغليكوبروتينات المجربة في هذا العمل. بالنسبة للاختبار الذي تم مع نظام الزمر الدموية للإنسان فيمكن ترتيب لكتينات النبتتين الأولى والثانية على أنها غير خاصة على عكس لكتينات أوراق النبتة الثالثة التي لم تبين أي انتقائية معدنية على عكس لكتينات النبتة الثالثة للزمر الدموية , اختبار المعادن بين أن لكتينات النبتة الأولى و الثانية هي بروتينات التي تبين أنها بروتينات معدنية .

الاستخلاص بواسطة هلام السيفادكس 25 و 75 اعطى ذروة واحدة لكل اللكتينات المجربة في هذا العمل إما الاستخلاص

بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا التبادل الأيوني فقد أعطى ذروتين لكل لكتينات النباتات المستعملة في هذا العمل

الخاصية الضادة للأوكسدة للنباتات الطبية المستعملة تتضح إما بواسطة تحديد تركيز المركبات المتشكلة خصوصا (

الهيدروبيروكسيد) من خلال التقنيات الضوئية المباشرة، أو عن طريق قياس فعالية المركب في إمساك الجذور الحرة

الأساليب التي تم تطبيقها لقياس نشاط مضادات الأوكسدة في المختبر هي: اختبار الهيئة العامة للصبود (ديسموتاز الفائق)

وثيوسانات الحديد واختبار تحديد الجذور الحرة

و قد بينت اختبارات الكشف عن نشاط مضادات الأوكسدة فعالية كبيرة لهذا النشاط في كل من مستخلصات النباتات المستعملة

على الترتيب

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية , اللكتينات , النشاط المضاد للأوكسدة , نشاط التراص , نظام الزمر الدموي , إمساك الجذور

الحرة , الهيئة العامة للصبود , ثيوسانات الحديد

Sommaire

SOMMAIRE

Rsumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction

Section I : Etude bibliographique

Chapitre I : les lectines

Généralités sur les lectines

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

7.3 Les lectines des microorganismes.....	13
8. Fonction biologique des lectines.....	14
8.1 Chez les plantes	14
8.2. Chez l'homme	14
9. Propriétés des lectine	14
9.1 L'interaction lectine–glucide.....	15
9.2 L'agglutination des cellules.....	15
9.3 L'activités mitogène.....	15
9.4 Effets mimétiques des hormones.....	15
9.5 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	15
9.6 La propriété antivirale.....	16
9.7 La propriété antibactérienne.....	16
9.8 Autres propriétés.....	16
10. L'intérêt des lectines.....	17
9.9 En biochimie et protéomique.....	17
9.10 Dans le domaine biomédical.....	17
a) <i>Hématologie</i>	17
b) <i>Immunologie</i>	17
c) <i>Biologie cellulaire</i>	18
d) <i>Cancérologie</i>	18
9.11 Dans le domaine agronomique.....	18
11. Le rôle des lectines dans l'immunité.....	18

Chapitre II : Le système sanguin

Les groupes sanguins

1. Historique.....	20
2. Le système ABO.....	20
3. Facteur rhésus	21
4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO.....	21
5. Détermination du groupe sanguin.....	22

Chapitre III : Les plantes médicinales

Les plants médicinales.....	23
1.1 <i>Olea europaea</i>	23

<i>1.2 Punicagranatum</i>	26
<i>1.3 ficuscarica</i>	28

Chapitre VI : Le stress oxydant

Le stress oxydant

1. Définition.....	31
2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	32
3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	33
3.1. Les lipides.....	34
3.2. Les protéines.....	35
3.3. Les acide nucléiques.....	37
4. Le stress oxydant et les pathologies.....	38
5. Systèmes de défenses antioxydants	39
5.1. Les systèmes enzymatiques.....	40
a) La Superoxydedismutase.....	40
b) La catalase	41
c) Les glutathions peroxydases et réductases.....	41
5.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	41
5.2.1. Le Glutathion réduit (GSH).....	42
5.2.2. La Vitamine E.....	42
5.2.3. La Vitamine C.....	42
5.2.4. Les métallothionèines (MTs).....	42
5.2.5. Le Sélénium.....	43

Section II : Matériels et méthodes

I Le matériel	44
II.1 L'extraction des lectines par la solution tampon.....	45
II Etude biologique.....	46
II.2 Le test d'hémagglutination.....	47
II.3 Le teste de limite d'hémagglutination.....	47

II.4 L'effet de la température sur l'héماغglutination.....	47
II.5 L'effet du pH sur l'héماغglutination.....	47
II.7 Le test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides.....	48
II.8 Le test de la limite d'inhibition d'héماغglutination par les saccharides	48
II.9 Le Test des métaux (oligoéléments).....	48
II.10 Le test d'agglutination sur les héماغtes humaines ABO	48
III.1 La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions ...	49
III.2 L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 et G25.....	49
III.2.1 La préparation de la colonne de Sephadex G75 et G25.....	49
III.2.2 La préparation de colonne.....	49
IV.L'activitéantioxydant des lectines in vitro.....	49

Section III : Résultats et discussion

I.Résultats et discussion des tests biologiques.....	51
II. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne.....	61
II .1.L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G25.....	61
II.2. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G75.....	62
II. 3. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne échangeuse d'ion.....	63
III .Test de l'activité anti oxydante in vitro	65
1. Dosage des protéines	65
2. test de DPPH	68
3. test du fer ferrique (FTC)	69

4. le test dusuperoxydedismutase (SOD).....70

Conclusion et Perspectives

Références bibliographiques

Liste des abréviations

% = pourcent

4-HNE = 4-hydroxynonéal

ADN = acide désoxyribonucléique

Ca⁺⁺ = Ion calcium

DPPH = 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EDTA = Ethylene diamine tetraacetic

ERO = espèces réactives de l'oxygène

FTC = thiocyanate de fer

H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène

HO[°] = radical hydroxyle

KD = kilodalton

LH = hydrogène du l'acide gras

Mg⁺⁺ = Ion Magnisium

Mn⁺⁺=Ion Manganèse

MDA = malondialdéhyde

ml = Millilitre

mg /ml = Milligramme/ Millilitre

nm = Nanomètre

O₂^{°-} = anion superoxyde

O₂^{°-} = anion radicalaire superoxyde

1O₂ = oxygène singulet

pH = potentiel Hydro isoélectrique

PBS = la solution tampon phosphate di-sodique

ROS =reactive oxygen species

RL = radicaux libres

ROO° = les radicaux peroxyes

SOD = superoxyde dismutase

μl = Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *canavaliensiformis* en complexe avec le trimannosoïde

Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique

Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichia coli*.

Figure 4: Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides

Figure 5: Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) (Somers, *et al.* 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

Figure 6: Tétramère de la protéine ConM de *Canavaliamaritima* 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

Figure 7 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO

Figure 8 : *Olea europaea*

Figure 9 : *Punica granatum*

Figure 10: *ficus carica*

Figure 11: Stress oxydant

Figure 12: Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie

Figure 13: Réactions de la peroxydation lipidique

Figure 14: Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire

Figure 15 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires

Figure 16: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants

Figure 17: Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique

Figure 18: Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes

Figure 19: La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G25 des extraits de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C)

Figure 20 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G75 des extraits de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C)

Figure 21 : chromatographie sur colonne échangeuse d'ion des extrait de de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C)

Liste des Tableaux

Tableau 1 : les lectines et leurs applications

Tableau 2 : Historique de la découverte des lectines

Tableau 3: La Specificite osidique de certaines plantes a lectines

Tableau 4 : : La classification structurale des lectines des plants

Tableau 5: Les Lectines spécifiques des groupes sanguins

Tableau 6: L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut d' *Punica granatum* ,
Olea europaea et *ficus carica*

Tableau 7: L'activité hémagglutinante des extraits *ficus carica* , *Punica granatum* , *Olea europaea*

Tableau 8 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d' *ficus carica* , *Punica granatum* , *Olea europaea*

Tableau 9: Le test d'inhibition des extraits bruts avec le glucose, galactose, mannose, xylitol, melibiose, rhamnose, lactose et le glucose 0,2

Tableau 10 : Le test d'inhibition des extraits bruts avec le casine et fetuine

Tableau 11: L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* ,
Olea europaea et *ficus carica*

Tableau 12: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica*

Tableau 13: L'effet des métaux sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica*

Tableau 14: L'effet d'EDTA sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica*

Tableau 15 : test de dosage des proteines des plantes *Punica granatum*, *Olea europaea*, *Ficus carica*

Tableau 16: tests de l'activité anti oxydante

Liste des photos

Photo 1 : Les racines et Les feuilles d'olivier sèches des plantes médicinales

Photo 2 : Poudre des plantes

Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C) A l'œil nu.

Photo 4 : L'agglutination des hématies humaines(A, B, O, AB) par l'extrait brut de *Punica granatum*(A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C) A l'œil nu.

Photo 5 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Punica granatum*(A) , *Olea europaea* (B), *ficus carica*(C) A l'œil nu en présence des saccharides

Photo 6 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum*(A) , *Olea europaea*(B) et *ficus carica*(C) A l'œil nu

Photo 7 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits de, et *Punica granatum*(A) *Olea europaea*(B) et *ficus carica*(C) A l'œil nu.

Photo 8: L'effet d'EDTA sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica* A l'œil nu .

Photo 9 : L'effet de Mn^{++} (A) Ca^{++} (B) Mg^{++} (C) sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica* A l'œil nu

Introduction

Introduction

Les lectines constituent un groupe de protéines ou de glycoprotéines d'origine non-immunitaire, qui se lient de façon réversible aux hydrates de carbone et le plus souvent agglutinent les cellules ou précipitent les polysaccharides et des glycoconjugués. (Goldstein *et al*, 1980). Les lectines ont été redéfinies par Peumans & Van Damme (1995) en tant que protéines possédant au moins un domaine non catalytique, qui se lie de façon réversible à un mono ou oligosaccharide spécifique. Toutefois, selon Cummings (1997), des protéines à activité enzymatique liés à des hydrates de carbone ne peuvent être considérés comme des lectines. En conséquence de leurs propriétés chimiques, ils sont devenus un outil dans plusieurs domaines de la recherche biologique (immunologie, biologie cellulaire, structure de la membrane, recherche sur le cancer et le génie génétique). Les lectines sont présentes dans un large éventail d'organismes de la bactérie aux animaux, étant présentes dans toutes les classes et les familles, mais pas dans tous les genres et espèces (Lis et Sharon, 1994). Beaucoup de plantes à fleurs de groupes taxonomiques divers s'accumulent de grandes quantités de ce qu'on appelle VSP (végétatif stockage protéines) dans divers organes de stockage végétatif. Ces VSP jouent un rôle primordial dans l'accumulation d'azote, le stockage et la distribution dans les plantes bisannuelles et vivaces, et en conséquence, on pense à contribuer à la survie de la plante dans son environnement naturel (Staswick, 1994). En outre, certains VSP avec une activité enzymatique particulière ou autre activité biologique agissent comme des protéines de défense contre les animaux herbivores spécifiques ou des invertébrés phytophages par exemple, et peut donc jouer un double rôle de stockage / défense (Peumans et Van Damme, 1995 ; Yeh *et al*, 1997).

Plusieurs arbres de légumineuses non seulement ont démontré l'apparition de VSP spécifique à écorce abondante, mais aussi conduit à l'identification de certains de ces VSP d'écorce.

La présente étude a été réalisée afin d'étudier la présence des lectines dans les racines de *Olea europaea*, *Punicagranatum*, *Ficus carica*. Ces plantes n'ont été jamais étudiées en Algérie sur l'extraction des lectines, raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- Etude la présence des lectines par le test hémaagglutination avec le sang des lapins.
- Etude l'effet de la température, pH et métaux sur l'activité de ces lectines.

- Etude l'affinité de ces lectines vers le glucide et les glycoprotéines par le test d'inhibition d'une part et vers les globules rouges de l'être humain par le test ABO d'autre part.
- Etude de L'activité anti-oxydante des lectines in vitro.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : les lectines

Chapitre I : les lectines

-Généralités sur les lectines

7. Définition des lectines

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

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

Lectines	Exemple et commentaire
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

Chapitre I : les lectines

	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

8. Historique

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

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

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

Chapitre I : les 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'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicite de la graine de Ricinuscommunis
1888	Stillmark	Activitehemagglutinante de la graine de Ricinuscommunis Toxicite de la graine de Croton triglium
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activitehemagglutinante de la graine de AbrusPrecatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hemagglutinine
1902	Landsteiner	La reversibilite de l'hemagglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation dela Concanavalina A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines surles groupes sanguins

Chapitre I : les lectines

1947-9	Boyd & Reguera / Renkonen	Specificite groupe de sang des plantes a Hemagglutinines
1949	Liener	Inactivation Thermique des hemagglutinines de Phaseolus vulgaris
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hemagglutinines de Phaseolus vulgaris
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 Phaseolus vulgaris
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinite pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

9. La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

9.1. Les lectines simple

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 40KDa. Cette classe comprend pratiquement

Chapitre I : les lectines

toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Lenka, 2006) (figure 01)

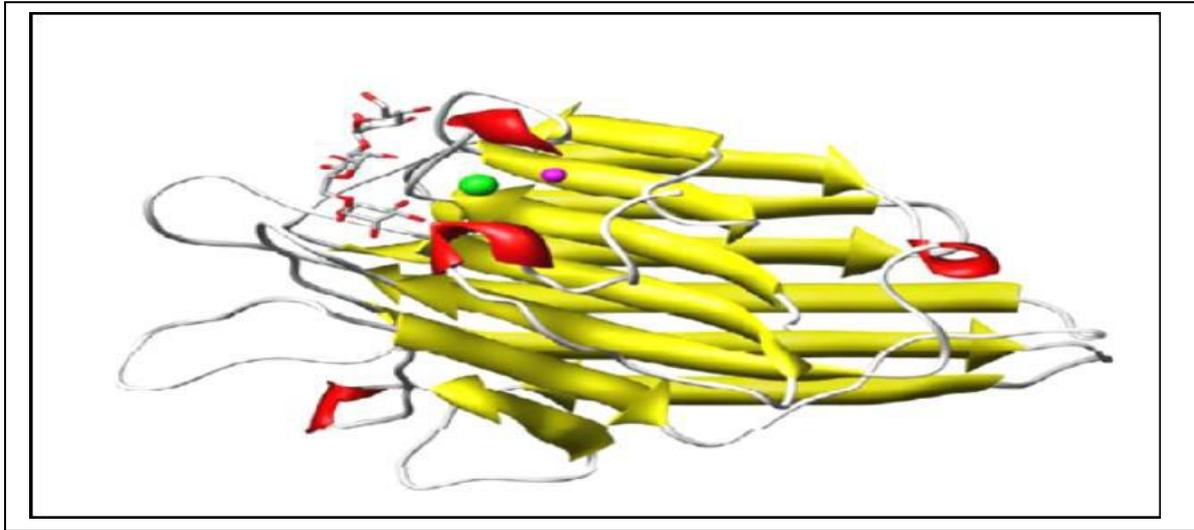


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de *canavaliensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006).

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

9.2. les lectines en mosaïques

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

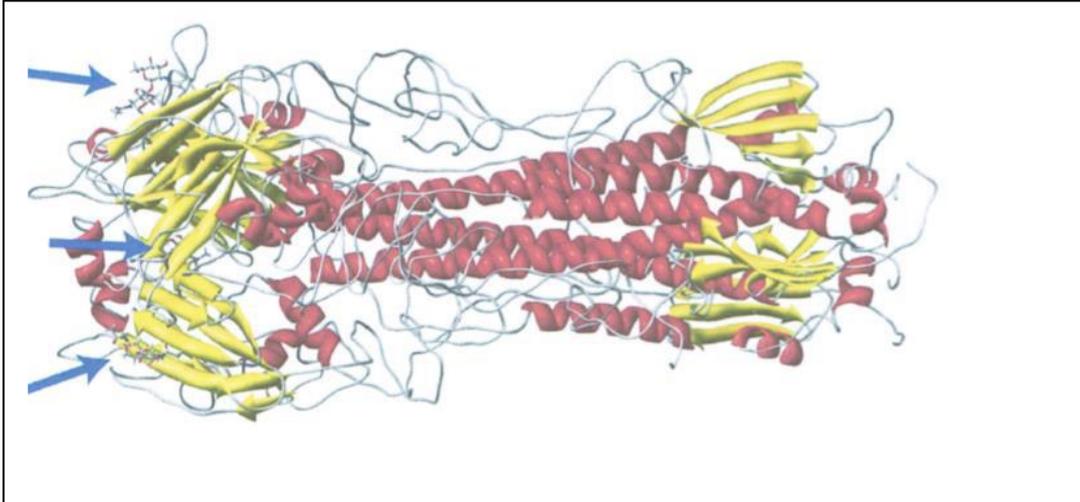


Figure 2: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

9.3. Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm 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).

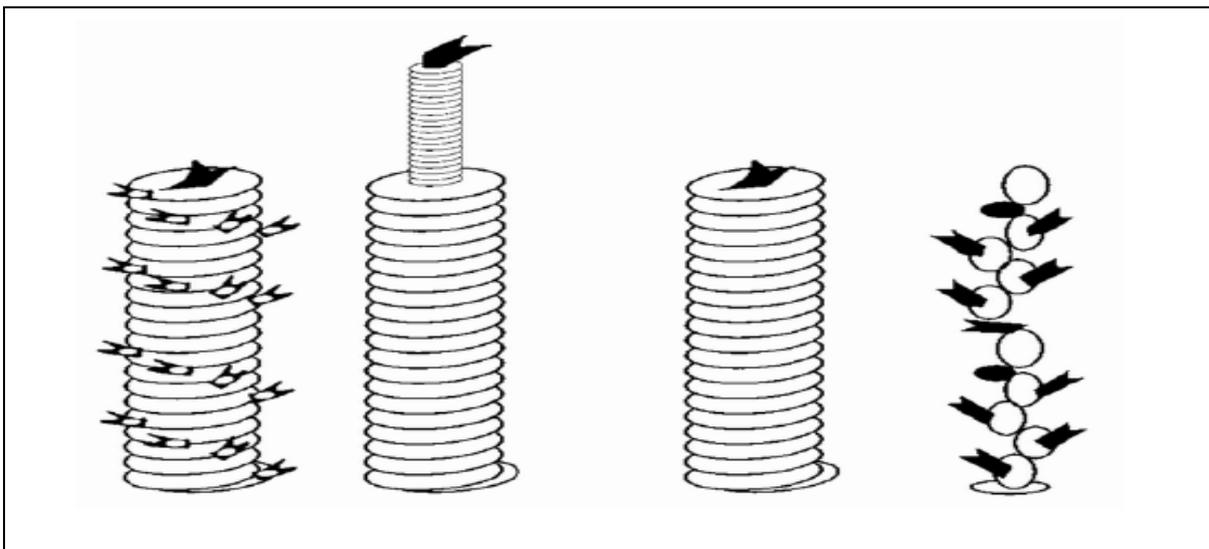


Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichia coli*.

Chapitre I : les lectines

10. 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 (**Gabius, 1985**).

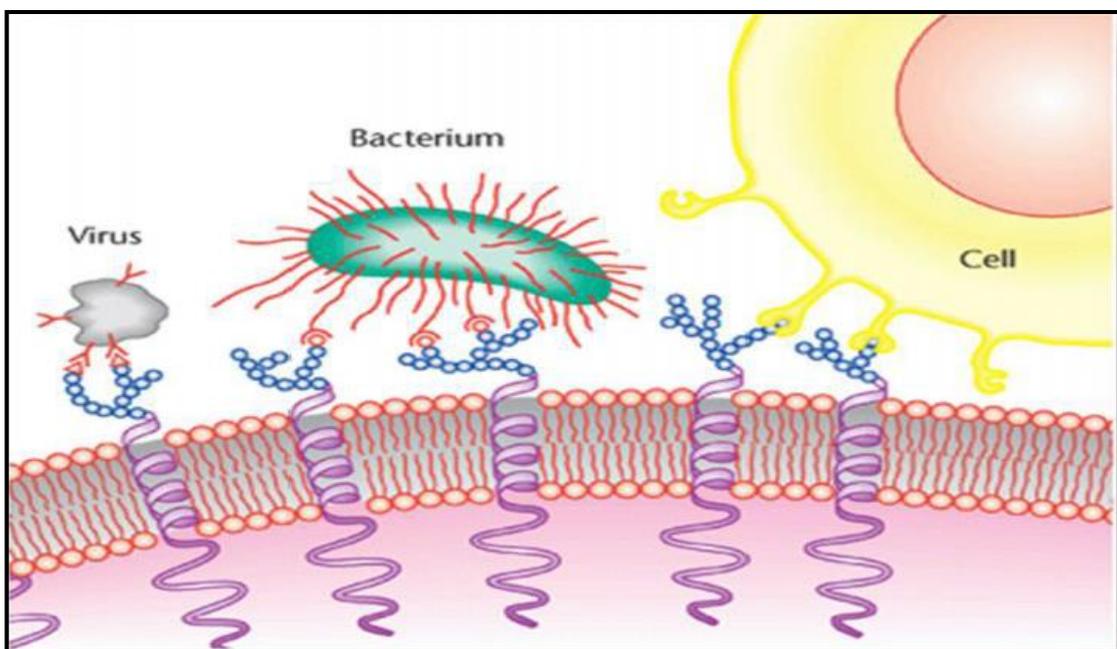


Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharon et Lis, 1993**)

11. La spécificité et l'affinité des lectines

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (**Robert, 2008**). La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent

Chapitre I : les lectines

exclusivement des oligosaccharides (**Sharon ,2003**). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine presente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose(Gal)/N acetylgalactosamine(GalNAc), le N-acetylglucosamine(GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc) (**Lis and Sharon ,1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les epitopesglycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (**Dam and Brewer ,2002**).

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

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adeniadigitata</i>	Gal
<i>Aleuriaaurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavaliabrasilensis</i>	Man >Glc
<i>Canavaliaensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichosbiflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolusvulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulexeuropaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordicacharantia</i>	GalNAc
<i>Cytissussessilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc

Chapitre I : les lectines

12. La Classification des lectines

12.1. Chez les animaux

e) Les lectines extracellulaires

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

f) Les lectines intracellulaires

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

12.2. Chez les végétaux

a) Les mérolectines

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

b) Les hololectines

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

Chapitre I : les lectines

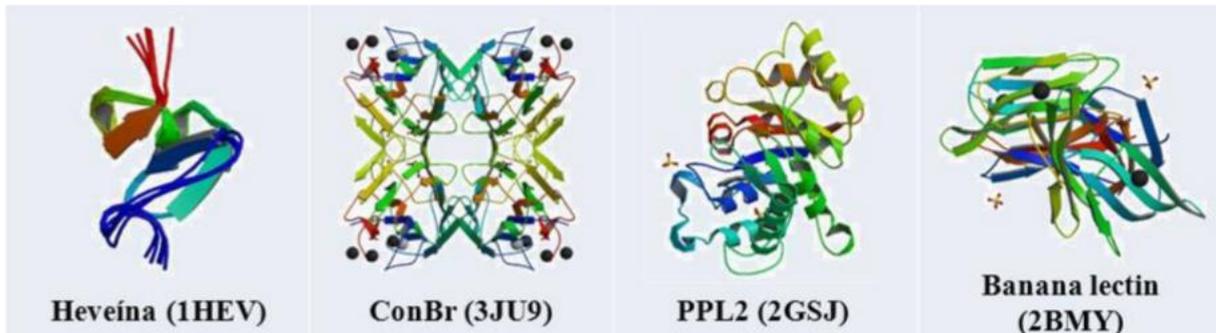
c) Les chimérolectines

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

d) Les superlectines

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

Tableau 04 : La classification structurale des lectines des plants (**Van Damme et al., 1998**).



13. Distribution des lectines dans le monde de vivant

Initialement décrites dans le règne végétal où elles sont particulièrement abondantes, notamment chez les légumineuses et les graminées, les molécules sont en fait des molécules universelles. Elles sont en effet largement répandues dans le monde vivant puisque l'on en rencontre même chez les virus et les bactéries. A titre d'exemple, le virus grippal présente des spicules d'hémagglutinine qui permettent son ancrage à la surface des cellules épithéliales de l'oropharynx. Des lectines sont également décrites chez les protozoaires tels que *Entamoebahistolytica* et *Entamoebadispar*, on en rencontre même chez les animaux

Chapitre I : les lectines

supérieurs, notamment chez l'homme où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Bouchara et Trouchin, 2003).

13.1. Les lectines animales

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

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

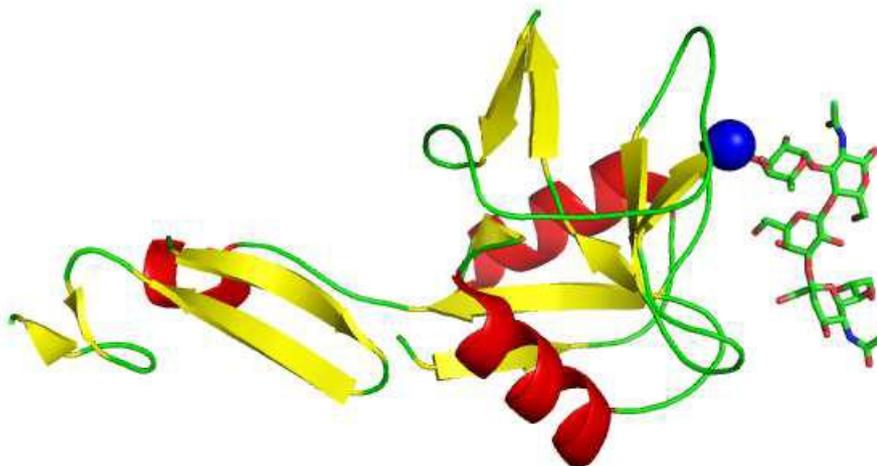


Figure 5 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) (Somers, *et al.* 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- Les *Siglecs*, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique (Crocker, 2002).
- Les autres classes de lectines animales comprennent les lectines du *type P* qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CDMPR (Roberts, *et al.*, 1998). Les *pentraxines* qui sont une famille des lectines

Chapitre I : les lectines

capables de se lier à des ligands de manière Ca^{2+} dépendante (Emsley, *et al.*, 1994) La plupart des lectines des vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (Aragao, 2009).

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

13.2. Les lectines des plantes

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine 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)

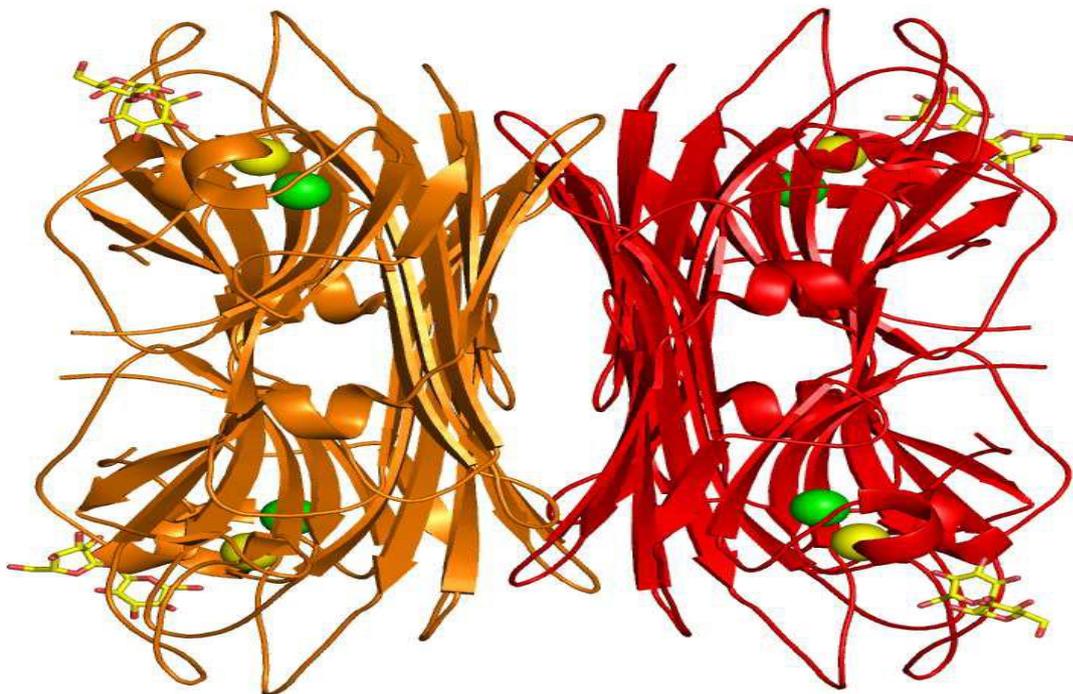


Figure 6 : Tétramère de la protéine Con M de *Canavaliamaritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre, *et al.*, 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets

Chapitre I : les lectines

La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthusnivalis* agglutinine (GNA) (**Wright, C.S. and Hester ,1996**). La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose telle que la jacaline isolée des graines de *Artocarpus integrifolia* (**Sankaranarayanan, et al.,1996**). La famille Amaranthaceae contient la lectine ACA de *Amaranthuscaudatus* qui a été cristallisée avec le Gal1-3GalNAc (**Transue, et al., 1997**).

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

13.3. Les lectines des microorganismes

Les infections sont toujours initiées par l'attachement du microorganisme aux tissus de l'hôte. Ce phénomène implique la reconnaissance des cellules de l'hôte le microorganisme, et nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (**Bouchara et Trouchin,2003**). Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imberty and Varrot ,2008 Sharon ,1996**). L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétyl neuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue

En complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (Weis, *et al.* 1990). Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymère hydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (**Imberty, 2011**). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriales (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (**Imberty et al., 2005**) *Entamoeba histolitica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes via un mécanisme dépendant du contact. Cette assassinat implique la protéine de surface amibienne dénommé le Gal / Gal Naclectine se lie au galactose et au Nacétyl galactosamine permettant l'adhérence des amibes aux cellules hôtes (**Boettner et al., 2002**). Les lectines des champignon ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système

Chapitre I : les lectines

immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (Sheet *al.*, 1998 ; Szeet *al.*, 2004).

14. Fonction biologique des lectines

14.1. Chez les plantes

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

14.2. Chez l'homme

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

15. Propriétés des lectine

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

Chapitre I : les lectines

15.1. L'interaction lectine–glucide

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

15.2. L'agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans *et coll*, 1995 ; Wang *et coll*, 1998**).

15.3. L'activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Nachbaret Oppenheim, 1980 ; Falasca, 1989 ; Babosa, 2001**).

15.4. Effets mimétiques des hormones

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

15.5. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Chapitre I : les lectines

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

15.6. La propriété antivirale

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wang et coll, 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius* (**Lopez, 2003**).

15.7. La propriété antibactérienne

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

15.8. Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbar et coll, 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes, 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy, 1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni, 1998**).

Chapitre I : les lectines

16. L'intérêt des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon ,1998**). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

16.1. En biochimie et protéomique

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

16.2. Dans le domaine biomédical

e) 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.

f) Immunologie

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

Chapitre I : les lectines

g) 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**).

h) Cancérologie

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

16.3. Dans le domaine agronomique

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

17. 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 lectine est initié par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet de l'activation des

Chapitre I : les lectines

protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**). La lectine liant le mannose (mannose bindinglectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine du complément qui joue un rôle dans l'immunité inné (**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 phagocytoses. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytoses 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

Chapitre II : Le système sanguin

Les groupes sanguins

6. Historique

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

7. Le système ABO

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

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

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

Chapitre II : Le système sanguin

8. Facteur rhésus

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

9. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO

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

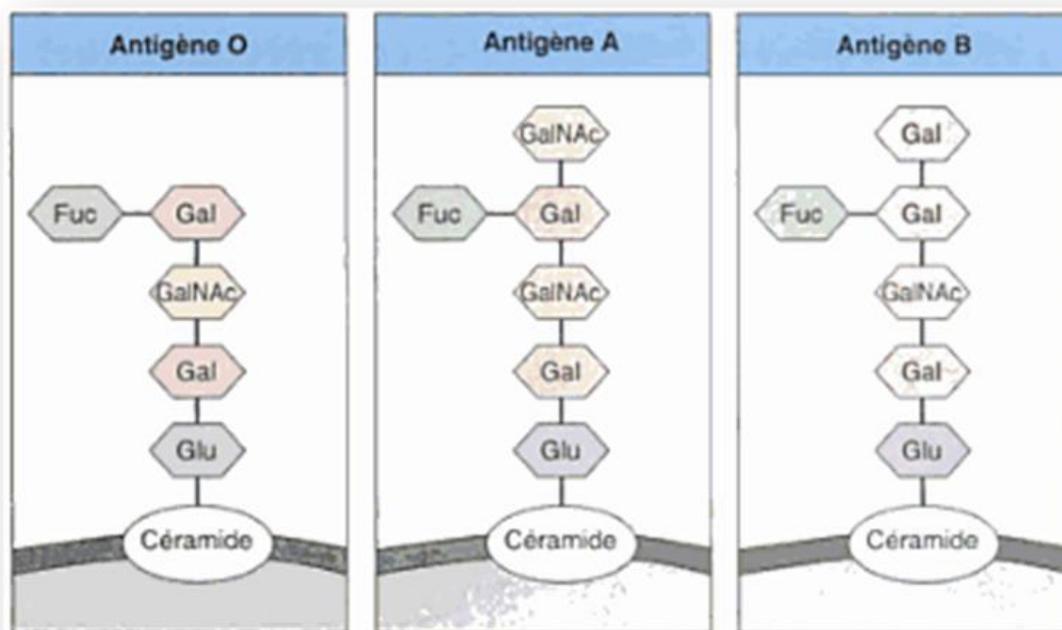


Figure 07 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (Parham, 2000).

Chapitre II : Le système sanguin

10. Détermination du groupe sanguin

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

Tableau 05: Les 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	Gokeret <i>al.</i> , 2008

Chapitre III : Les plantes
médicinales

Chapitre III : Les plantes médicinales

Les plants médicinales

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus. Dans les cas extrêmes, l'action de la médecine moderne soulage les patients de manière indéniable et sauve de nombreuses vies. Un article paru dans la presse en 1993, décrivant la situation catastrophique dans laquelle se trouvait un hôpital de Sarajevo, la capitale bosniaque assiégée, signalait que les médecins, totalement dépourvus de médicaments, étaient contraints d'utiliser une plante très répandue en Europe, la valériane comme analgésique anesthésiant pour soigner les blessés. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'absinthe chinoise (**Bruneton . J ,2002**)

I .Olea europaea

I. 1.DESCRPTION de la plante *Olea europaea*

L'olivier est un arbre au tronc tortueux et à l'écorce crevassée, qui peut être plusieurs fois centenaire. Les feuilles sont persistantes, petites et résistantes, grisâtres sur leur face supérieure et blanchâtres sur la face inférieure. Les petites fleurs blanchâtres donnent des drupes à noyau dur et à fruits verts ovoïdes devenant noirs à maturité.

Chapitre III : Les plantes médicinales



Figure 08 : *Olea europaea*

Nom scientifique : *Olea europaea*

Nom commun : olivier

Nom anglais : *olive tree*

I.2. Classification botanique d'*Olea europaea*

Règne: *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Oleaceae*

Chapitre III : Les plantes médicinales

Genre : *Olea*

Espèce: *europaea*

Sous-espèce: *europaea*

(Cronquist ,1981)

I.3. Distribution d'*Olea europaea*

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 26e et le 45e degré de latitude nord et sud ce qui explique son introduction avec succès en Chine, au Japon, aux Etats Unis (Californie), et au Mexique pour l'hémisphère nord, en Australie, en Afrique du Sud et dans divers pays de l'Amérique du Sud pour l'hémisphère Sud. Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996) .

I.4. Effets et usages médicaux d'*Olea europaea*

- ✚ améliorent la circulation sanguine.
- ✚ Légèrement diurétiques, elles peuvent être utilisées pour soigner les cystites.
- ✚ Capables de réduire le taux de glucose dans le sang, elles sont conseillées aux diabétiques.
- ✚ Très nourrissante, l'huile équilibre le taux de graisse dans le sang.
- ✚ On la prescrit souvent, additionnée de jus de citron, pour éliminer les calculs biliaires.
- ✚ Elle exerce une action protectrice sur l'appareil digestif et sur les peaux déshydratées.
- ✚ Recherches en cours des essais cliniques ont montré que les feuilles d'olivier abaissaient la tension artérielle.

Chapitre III : Les plantes médicinales

II. *Punica granatum*

II.1. Description de la plante *Punica granatum*

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subspontanée ou cultivée (GARNIER G *et al.*, 1961).



Figure 09 : *Punica granatum*

Chapitre III : Les plantes médicinales

Nom scientifique :	<i>Punica granatum</i>
Nom commun :	grenade
Nom anglais :	<i>pomegranate</i>

II.2. Classification botanique de *Punica granatum*

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Myrtales
Famille :	Punicaceae
Genre :	<i>Punica</i>
Espèce :	<i>Punica granatum</i>

II.3. Distribution de *Punica granatum*

Le grenadier une espèce originaire d'Asie occidentale (Turquie, Iran, Irak, Azerbaïdjan, Afghanistan, Pakistan, Arménie), et probablement la péninsule Arabique, ainsi que le nord de l'Afrique. Elle est cultivée dans tous les continents dans des zones tempérées chaudes : bassin méditerranéen, Proche-Orient, Chine, Sud-Est des États-Unis, Chili, Argentine. La ville de Grenade en Espagne doit son nom au grenadier. En Arménie, ce « fruit du paradis » (*nour*) est un symbole national.

II.4. Effets et usages médicaux de *Punica granatum*

- ✚ La peau du fruit et l'écorce du grenadier sont considérées comme un remède spécifique du ver solitaire, ou ténia.

Chapitre III : Les plantes médicinales

- ✚ les alcaloïdes contenus dans la peau et l'écorce contraignent ce parasite à se détacher de la paroi intestinale.
- ✚ si la décoction est prise avec un laxatif puissant, l'intrus est facilement expulsé.
- ✚ La peau et l'écorce sont également astringentes et permettent de traiter la diarrhée.
- ✚ jus de grenade pour améliorer la digestion ou lutter contre les flatulences.

III. *ficus carica*

III. 1. Description de *ficus carica*

Le figuier est un petit arbre, le plus souvent de trois à quatre mètres de haut, voire pour certaines variétés jusqu'à dix mètres de périmètre pour huit de haut en conditions favorables (zone peu gélive, sol frais et fertile), au tronc souvent tortueux, au port souvent buissonnant. Les feuilles sont caduques, rugueuses, finement velues, assez grandes (jusqu'à 25 cm de long). Elles sont munies d'un long pétiole et d'un limbe palmatilobé, profondément divisé en trois à sept lobes crénelés (le plus souvent cinq) de forme variable, séparés par des sinus arrondis. A maturité, les fruits, ou figes, sont selon les variétés de couleur verdâtre, jaune, marron-rouge ou violet plus ou moins foncé.

Toutes les parties de la plante (rameaux, feuilles, fruits) contiennent un latex blanc et irritant. Pour la production, seule les variétés femelles sont cultivées, elles peuvent être *bifères* ou *unifères*.

Les *bifères* donnent deux récoltes par an. Les figes mûres en juillet sur les rameaux de l'année précédente sont appelées "figes-fleurs", celles apparaissant en automne sur les rameaux de l'année en cours sont appelées "figes-fruits" ou figes d'automne. Les *unifères* fructifient une seule fois en fin d'été.

Chapitre III : Les plantes médicinales



Figure 10 : *ficus carica*

Nom scientifique : *ficus carica*

Nom(s) commun : *Figuier*

Nom anglais : *fig*

III.2. Classification botanique de *ficus carica*

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Hamamelidae

Chapitre III : Les plantes médicinales

Ordre : Urticales

Famille : Moraceae

Genre : Ficus

III.3. Distribution de *ficus carica*

Cette espèce semble originaire d'une vaste zone de climat tempéré chaud, englobant le pourtour du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale (Azerbaïdjan, Afghanistan, Iran, Pakistan). La culture de l'espèce s'est propagée dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde. Le figuier s'est plus ou moins naturalisé en Europe et en Amérique du Nord.

III .4. Effets et usages médicaux de *ficus carica*

- ✚ Les sucres contenus dans la figue (surtout sèche) ont une action laxative efficace .
- ✚ le sirop est employé contre la constipation.
- ✚ La pulpe émolliente du fruit soulage la douleur, soigne les inflammations et traite les aphtes et les abcès gingivaux.
- ✚ La figue est souvent grillée avant d'être employée en application.
- ✚ C'est également un expectorant léger, qui, associé à d'autres plantes comme l'aunée (*Inula helenium*).
- ✚ soigne les toux. Irritantes et les bronchites

Chapitre VI : Le stress
oxydant

Chapitre VI : Le stress oxydant

Le stress oxydant

4. Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (Durackova, 2008).

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (figure 06). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les peroxydant et les antioxydants en faveur des premiers » (Baskin *et al.*, 1994 ; Barouki, 2006 ; Jenkins *et al.*, 2007). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (Kehrer, 1993 ; Barouki, 2006). D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération des ROS (reactive oxygen species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage (Kehrer, 1993).

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (Durackova, 2008) et à des dégâts cellulaires irréversibles (Pincemil *et al.* 1999 ; Abuja *et al.*, 2001).

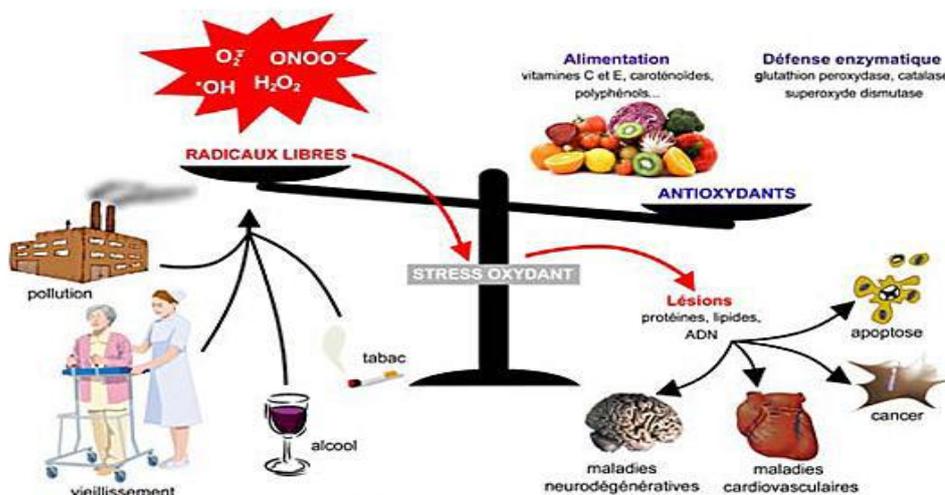


Figure 1 : Balance radicaux libres / antioxydants

Figure 11 : Stress oxydant (Durackova, 2008)

Chapitre VI : Le stress oxydant

2. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été caractérisé en 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ou le radical hydroxyle (HO[•]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (**Simonian and Coyle, 1996 ; Garrel et al., 2007**). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H₂O₂ qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{•-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[•]) ou surtout le radical hydroxyle (HO[•]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H₂O₂ peut se décomposer en HO[•] et HO[•] selon la réaction de Fenton. Le radical HO[•] a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 07) (**Favier, 1997**).

Chapitre VI : Le stress oxydant

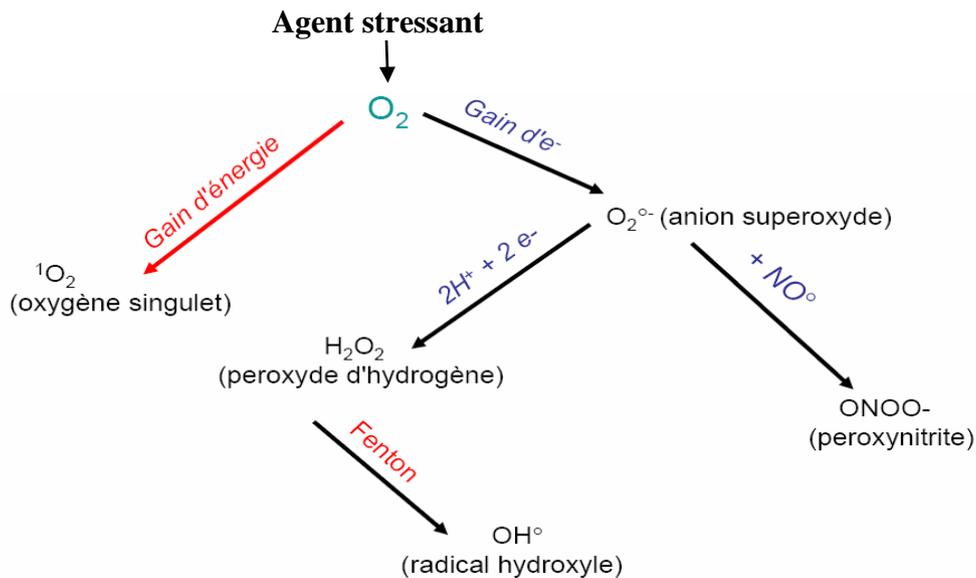


Figure 12 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet (1O_2) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Favier, 2003).

3. Les cibles biologiques du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Pincemail, 2003). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Sies, 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Gutteridge, 1992 ; Curtin *et al.*, 2002).

Chapitre VI : Le stress oxydant

3.1. Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), entraînant l'arrachement d'un hydrogène du l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde (LOO°). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (**Esterbauer *et al.*, 1992 ; Beaudoux *et al.*, 2003 ; Favier, 2003**) (figure 08). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (**Marnett, 1999**).

Chapitre VI : Le stress oxydant

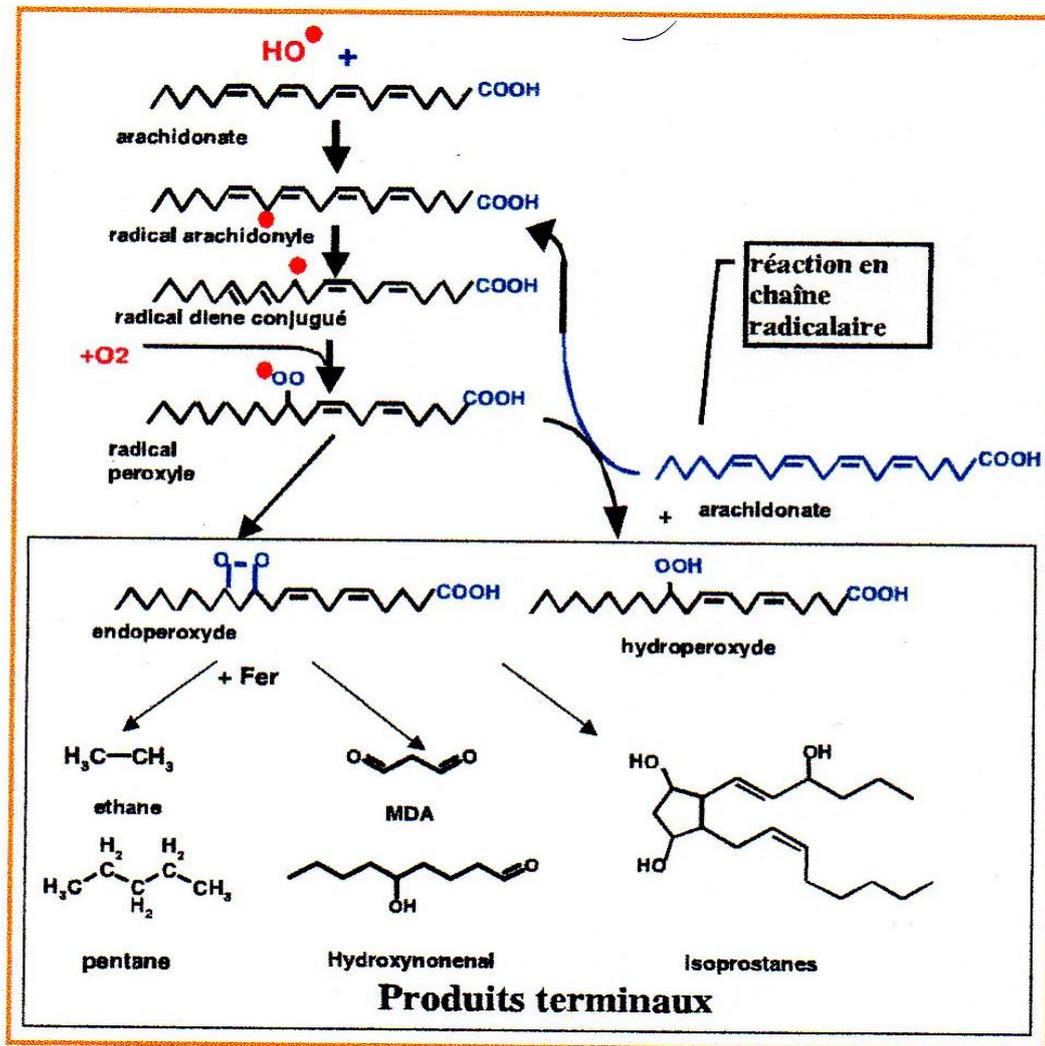


Figure13 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

3.2. Les protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces réactions d'oxydations, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} (Levine, 2002). Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation

Chapitre VI : Le stress oxydant

3.3. Les acide nucléiques

L'ADN nucléaire et ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS, du fait sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale (**Stevnsner, 2002**).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages de l'ADN, et on peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG (qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN), les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines (figure 10) (Hayakawa *et al.*, 1991). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}\text{OH}$ et le peroxy-nitrite), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défectueux, La 8- OH dG s'accumulera au sein de l'ADN (Cadet, 1999). Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (**Marnett, 1999 ; Nair *et al.*, 1999**).

Chapitre VI : Le stress oxydant

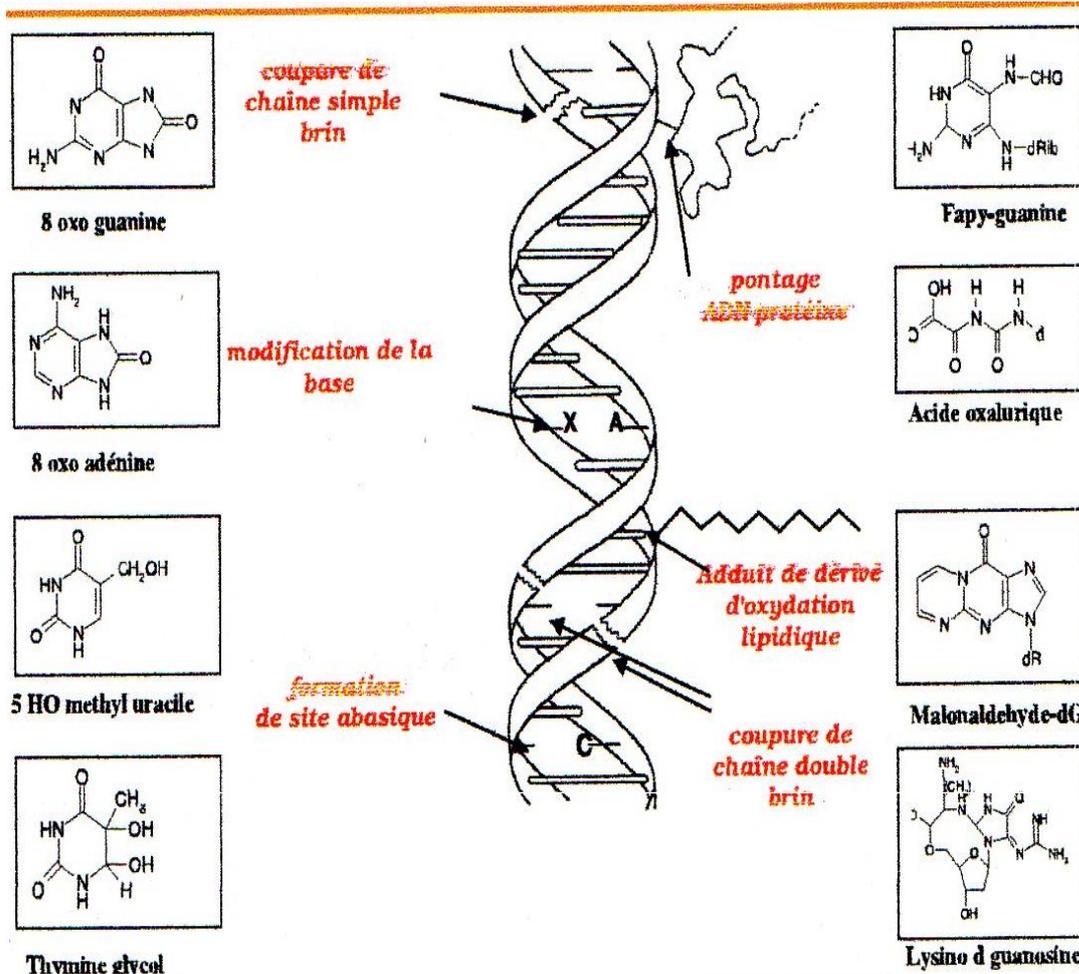


Figure 15 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

4. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnefon- Rousselot *et al.* 2001 ; Sohal *et al.*, 2002 ; Delattre *et al.*, 2005).

Chapitre VI : Le stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (**Montagnier *et al.*, 1998**).

Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (**Holzenberger *et al.*, 2003 ; Delattre *et al.*, 2005**) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ROS, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique (**Bonnefont-Rousslot, 2001**) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

5. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (figure 11). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Goudable et Favier, 1997**).

Chapitre VI : Le stress oxydant

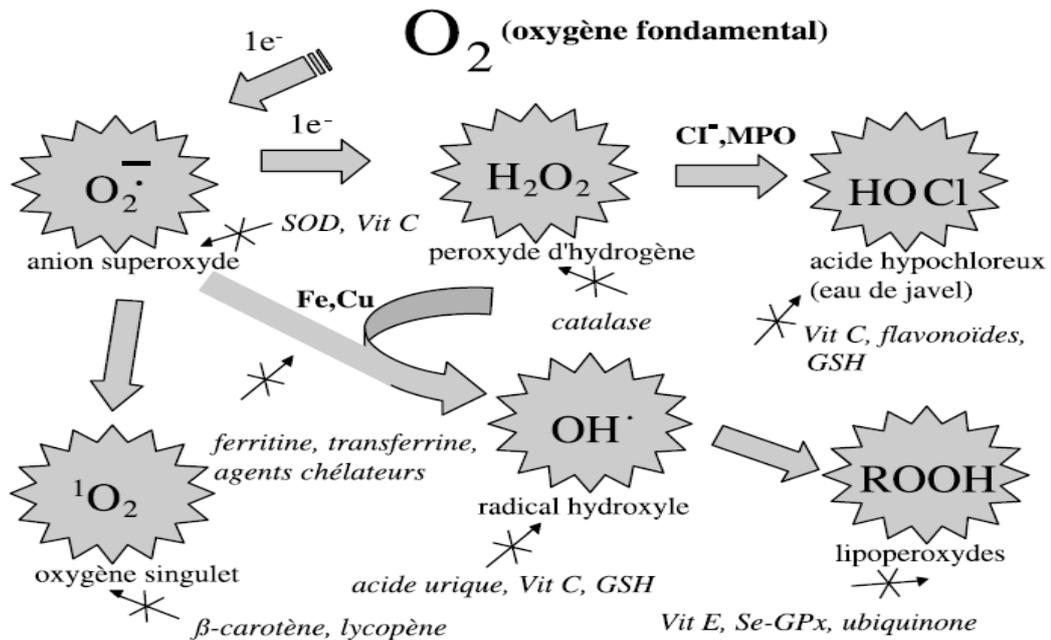


Figure 16 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer *et al.*, 2008).

5.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) le superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet -}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

d) La Superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

Chapitre VI : Le stress oxydant

e) La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

f) Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995;Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

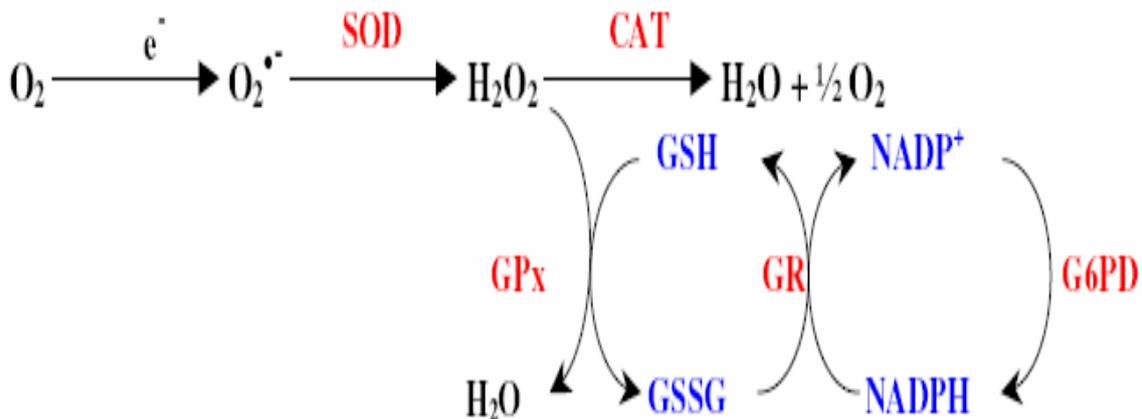


Figure 17 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).

5.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C (Favier, 2003).

Chapitre VI : Le stress oxydant

5.2.1. Le Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer *et al.*, 1997 ; Power and Lennon, 1999**). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Ji *et al.*, 1992**).

5.2.2. La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂ (**Singh *et al.*, 2005**).

5.2.3. La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Singh *et al.*, 2005**).

5.2.4. Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6000-7000 Da) (Kagi, 1993). Ils possèdent une composition spéciale d'acides aminés. En effet, elles ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques dont le tiers des résidus sont des cystéines servant comme ligand aux métaux. La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoïdes et la radiation ionisante (**Cherian, 1995**). Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des

Chapitre VI : Le stress oxydant

métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...), la régulation des métaux essentiels à l'état de trace, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante (**Diana, 1999**). A cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydriques, les MT peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles (**Lazo et pitt, 1995**).

5.2.5. Le Sélénium

Le sélénium est un antioxydant qui intervient dans l'activité du système enzymatique protecteur, le glutathion peroxydase qui accélère la transformation des radicaux libres et des peroxydes lipidiques en métabolites non- toxiques (**Galan et al., 1997**)

Partie Pratique

Matériels et méthodes

Section II : Matériels et méthodes

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques

I.1 Le matériel vivant

Le sang utilisé lors d'un travail effectué dans le laboratoire de la biochimie est issu du lapin gardés dans l'animalerie de chaabate al rsasse

Le sang humain collecté à partir de laboratoire d'analyse médicale polyclinique Dr hocine ben kadri

I.2 Le matériel végétal

Notre travail a été effectuée sur les racines de deux plantes qui sont *ficus carica* et *Punica granatum* et les feuilles de *Olea europaea*

I.2.1 Récolte des plantes

Les racines de *Punica granatum* et les feuilles de *Olea europaea* ont été récoltées dans le jardin d'une maison à chélghoum laïd wilaya de mila et les racines de *ficus carica* a été récoltées dans le jardin de rahmoun à télegma wilaya de mila durant le mois de février 2016

1.1. Les méthodes

1-2-1 La Préparation des plantes

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

Séchage : Les racines des plantes ont été séchées à température ambiante pendant 15 jours.



Photo 1 : Les racines et Les feuilles d'olivier sèches des plantes médicinales

Broyage : Les racines ont été coupées, puis ils sont broyées dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre. (photo2)

Section II : Matériels et méthodes



Photo 2 : Poudre des plantes

1-2-2 L'Extraction des lécitines

a. Le Principe

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

b. La Technique d'extraction

9g des poudre obtenues à partir des trois plantes ont été mises dans des flacons contenant chaque une 30 ml solution tampon PBS (0.1M pH 7.2) (annexe 1) pendant 24h, après la centrifugation de la suspension à 6000 tr/min pendant 30 min le surnageant est récupéré et conservé pour la réalisation des test souhaités (**Figure 18**)



Macération à Froid

(24h à °C)



Section II : Matériels et méthodes



Centrifugation 6000 tour/ mint

Pendant 30 minutes



L'extrait brut

Figure 18 : Le schéma d'extraction des lectines à partir des poudres racinaires des plantes.

1-2-3Le test d'hémagglutination

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

1-2-3-1 La Préparation des hématies à 3%

Le sang humain est collecté à partir de laboratoire d'analyse médicale polyclinique Dr hocine ben kadri, le sang du lapin est collecté à partir du lapin provenant au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine1. Les hématies du lapin sont collectées pour la mise en évidence la présence des lectines dans les extraits, et les hématies de groupe sanguins

Section II : Matériels et méthodes

humains ABO pour tester la spécificité des lectines des extraits au groupe sanguin ABO. Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

a) Lavage des hématies

Le tube contenant une quantité de sang (1.5 ml) a été centrifugé à 4000tr /min pendant 10 min .le surnageant résultant est versé et une solution d'eau physiologique est ajouté au culot ; après avoir bien mélangé le tube est soumis à nouveau à une centrifugation .l'opération est répété 3 fois jusque l'obtention d'un surnageant claire.

b) La dilution des hématies

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

1-2-3-2La technique d'hémagglutination

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

1-2-4 La limite d'hémagglutination

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brute (*ficus carica* , *Punica granatum* et *Olea europaea*) qui lui, est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

1-2-5 L'effet de la température sur l'hémagglutination

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

1-2-6 L'effet du pH sur l'hémagglutination

Section II : Matériels et méthodes

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

1-2-7Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides

Dans chaque puits d'une microplaque 50 µl de l'extrait a été déposé, tout en ajoutant 50 µl de solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de Na Cl 0,9%) (Glucose, Galactose, Mannose, Lactose). Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, cela permettre au lectine de reconnaitre le sucre, 50 µl des hématies du lapin à 3% ont été rajoutées. Après une heure la lecture a été faite à l'œil nu.

1-2-8Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides

Ce test a été effectué pour les sucres qui inhibent l'agglutination, il a été réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination est mesurée. Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés, puis 50 µl des inhibiteurs (0,1g/ml) (**Annexe 01**) sont rajoutées au premier puits seulement, ensuite une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants, l'incubation de ce mélange a été effectué pendant 1h à température ambiante. Finalement, 50 µl des hématies à 3% ont été ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination a été faite à l'œil nu après une heure de temps.

1-2-9Le Test des métaux (oligoéléments)

Premièrement, l'EDTA est ajouté à l'extrait de *ficus carica* et *Punica granatum* et les feuilles d'*Olea europaea* (1V-1V respectivement). Après 1h, 50 µl de notre composé ont été déposés dans un puits tout en ajoutant 50 µl de l'un des métaux (MgCl₃, CaCl₃, MnCl₃).enfin 50 µl de sang de lapin sont ajoutés au mélange, la lecture a été faite à l'œil nu après 1h d'incubation.

1-2-10 Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO

La spécificité de groupe sanguin de l'extrait a été établie à l'aide des érythrocytes des différents groupes du système ABO. L'étude a été effectuée sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO. 50 µl d'extraits de plantes ont été déposés dans un puits d'une microplaque suivis de 50 µl des hématies d'un groupe du sang humain préparés au part avant. Après 1h l'observation a été faite à l'œil nu.

Section II : Matériels et méthodes

1-2-11 La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions

Le surnageant de l'extrait brute a été récupéré puis réparti en trois fractions, la première est versé au niveau de la colonne contenant le Gel cellulose DEAE, l'élution a été faite par un tampon phosphate (0,1M, pH7, 2), les fractions de séparation ont été recueillies dans des tubes secs (5ml/tube). La mesure de l'absorbance des extraits issus d'échangeuse d'ions a été réalisé dans le spectrophotomètre à UV dont la longueur d'onde est 280 nm, lorsque l'absorbance atteindre le 0, la lecture est arrêté. Ensuite, une 2^{ème} élution a été effectués par l'Na Cl a une concentration croissante (0,1M ; 0,2M ; 0,3M). Les fractions ont été recueillies dans des tubes secs (5ml/tube). L'absorbance des extraits issus d'échangeuse d'ions a été mesurée dans le spectrophotomètre à UV dont la longueur d'onde est 280 nm. Finalement, on a tracé la courbe d'absorbance en fonction des tubes. Les fractions récupérées ont été testés sur les hématies du lapin, pour assurer que l'activité hémagglutinante est améliorée.

- **L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 et G25**

➤ La préparation de la colonne de Sephadex G75 et G25

4 g de Sephadex G75 et G25 ont été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2). Le mélange a été incubé pendant 48 h à température ambiante. Puis il a été coulé dans une colonne. Le surnageant de l'extrait brute de notre plantes a été versé lentement dans la colonne Sephadex G25 et G75, puis il a été recueilli par l'élution avec le tampon phosphate (0,1M ; Ph7, 2) dans des tubes secs (5ml/tube). Les fractions récupérées ont été testés sur les hématies du lapin, pour assurer que l'activité hémagglutinante est améliorée. L'absorbance des extraits récupéré à partir de la chromatographie sur colonne a été mesurée dans le spectrophotomètre à UV dont la longueur d'onde est de 280 nm. Puis on a tracé la courbe d'absorbance en fonction des tubes.

1-2-12 L'activité antioxydante des lectines in vitro

Toutes les fractions récupérées par la chromatographie sur colonne de sephadex G25, G75 et échangeuse d'ion sont lyophilisé ensuite conservé pour mesuré l'activité antioxydante des lectines in vitro.

1-2-12-1 Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le dosage du superoxyde dismutase (SOD) est réalisé selon la méthode d'Asada *et al* (1974) (**Annexe 02**).

Section II : Matériels et méthodes

1-2-12-2 Effet scavenger du radical DPPH *in vitro*

Selon le protocole décrit par Kirby *et al* (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrate ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sauchez, 2002) (Annexe 2).

1-2-12-3 Dosage de l'activité de fer ferrique

Le dosage de l'activité de fer ferrique est réalisé selon la méthode de (Yıldırım *et al*.,2000) (Annexe 2).

1-2-12-4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de (Bradford ,1976) (Annexe2).

Qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (- NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu (l'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

Résultats et discussion

Section III : Résultats et discussion

I. Les résultats d'étude biologique

I.1. Le test d'hémagglutination

Le tableau 06 présente l'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de *Punica granatum*, *Olea europaea* et *ficus carica*.

Tableau 6 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut de *Punica granatum*, *Olea europaea* et *ficus carica*

Plante	Tests d'agglutination
<i>Punica granatum</i>	+++
<i>Olea europaea</i>	+++
<i>ficus carica</i>	+++

+++ : très forte agglutination

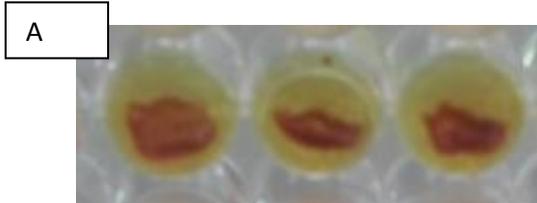


Photo 3 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C) A l'œil nu.

Section III : Résultats et discussion

L'extrait du *Punica granatum*, *Olea europaea* et *ficus carica* montrent une très forte agglutination vis-à-vis des hématies de lapin, cette agglutination a été observée à l'œil nu ce qui prouve que *Punica granatum*, *Olea europaea* et *ficus carica* 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'hémagglutination (Photo03).

La lectine au niveau des plantes s'attachent au récepteur sur la surface des hématies (Les glycanes), et parce qu'il est polyvalent, donc La formation d'une suspension gélatineuse homogène 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). Des études sur les lectines ont été effectuée sur des espèces de la famille de *punica granatum* dans les mêmes conditions qu'on a travaillé avec ont montrées que le teste d'hémagglutination du a donné un résultat positive (Elodie WALD .,2009) .

I.2. Le teste de limite d'hémagglutination

La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination. Le Tableau 07 montre les résultats obtenus lors du test de limite d'hémagglutination.

Tableau 7 : L'activité hémagglutinante des extraits, *Punica granatum*, *Olea europaea*, *ficus carica*

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
<i>Punica granatum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Olea europaea</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ficus carica</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++ Forte agglutination, + Faible agglutination, _ absence d'agglutination

Section III : Résultats et discussion

L'extrait de *Punica granatum* a montré une très forte agglutination vis-à-vis des globules rouges lors de sa dilution au niveau des 3 premiers puits, alors qu'elle diminue au niveau des 2 puits qui suivent, et disparaît complètement au niveau des puits suivants 1/64 et pour l'*Olea europaea* forte agglutination au niveau des trois premiers puits et après une diminution dans le puits précédent et disparaît complètement au niveau des puits suivants 1/32 mais *ficus carica* montre une forte agglutination au niveau des trois premiers puits et disparaît au niveau du 1/16. 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 puits est due à la dilution effectuée donc les fractions contenues sont des diluats de l'extrait brut. Dans une autre étude réalisée sur la lectine EHL isolé à partir d'*Euphorbia helioscopia*, l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml (Shaista et al., 2014).

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

Tableau 8 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut de *Punica granatum*, *Olea europaea*, *ficus carica*

groupe sanguin / extrait brute	A	B	O	AB
<i>Punica granatum</i>	+	+	+	+
<i>Olea europaea</i>	-	-	-	-
<i>ficus carica</i>	+	+	+	+

+ agglutination, _ absence d'agglutination

Section III : Résultats et discussion

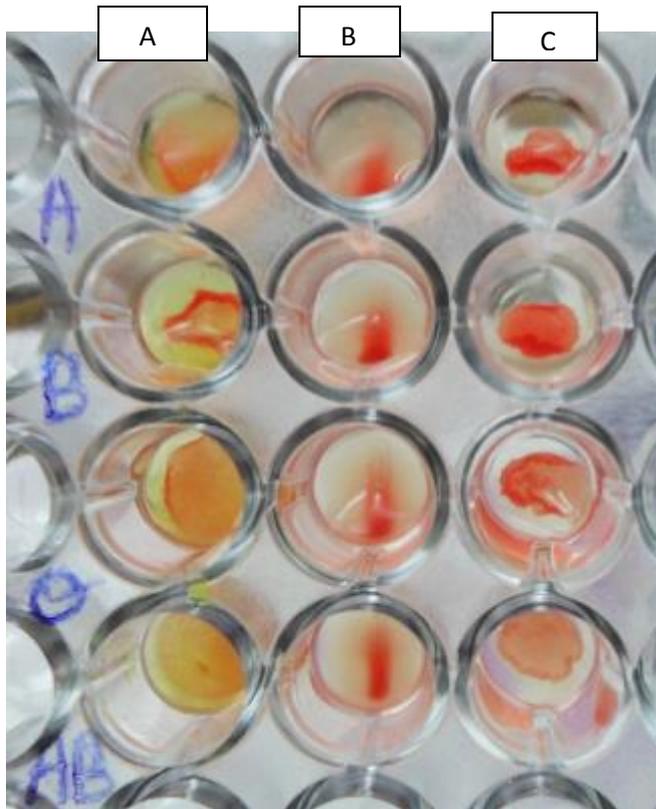


Photo 4 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut de *Punica granatum*(A),*Olea europaea*(B), *ficus carica* (C) A l'œil nu.

Dans le but d'étudier la spécificité de nos extraits à des hématies humaines et de trouver un extrait spécifique à un seul groupe et par conséquent, leur utilisation comme nouveau réactif, nous avons réalisé le test d'agglutination sur les hématies humaines (ABO). Les résultats du tableau 8 montrent que Les extraits des deux espèces : *Punica granatum* et *ficus carica* agglutinent assez fortement tous les types de groupe sanguins humains, Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Geotrupes stercorarius* et sur *Diplotaxis assurgens* et *Raphanus sativus* qui ont la même propriété (Devi et al., 2014 ; Deeksha et al., 2015). Alors nous pouvons classer les lectines de *Punica granatum* et *ficus carica* dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique. Au contraire l'extrait d'*Olea europaea* n'agglutine aucun type des groupes sanguins humains, donc ces lectines ne présentent aucune sélectivité pour les groupes du système ABO, des résultats similaires sont obtenus avec le EHL et la lectine de l'algue *Bryopsis plumosapre* (Shaista et al. 2014 ; Han et al., 2010). 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).

Section III : Résultats et discussion

I.4 Le test d'inhibition d'hémagglutination

Le test d'inhibition a été réalisé afin de terminer la spécificité des lectines présentes au niveau de *ficus carica*, *Punica granatum*, *Olea europaea* en utilisant un grand nombre de sucres simples et de glycoprotéines.

Tableau 9 : Le test d'inhibition des extraits bruts avec les saccharides

sucre \ extrait brut	Glucose	Galactose	Mannose	Lactose	xylitol	mélibiose	rhamnose
<i>Punica granatum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Olea europaea</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>ficus carica</i>	+	+	+	+	+	+	+

+ : agglutination (pas d'inhibition)

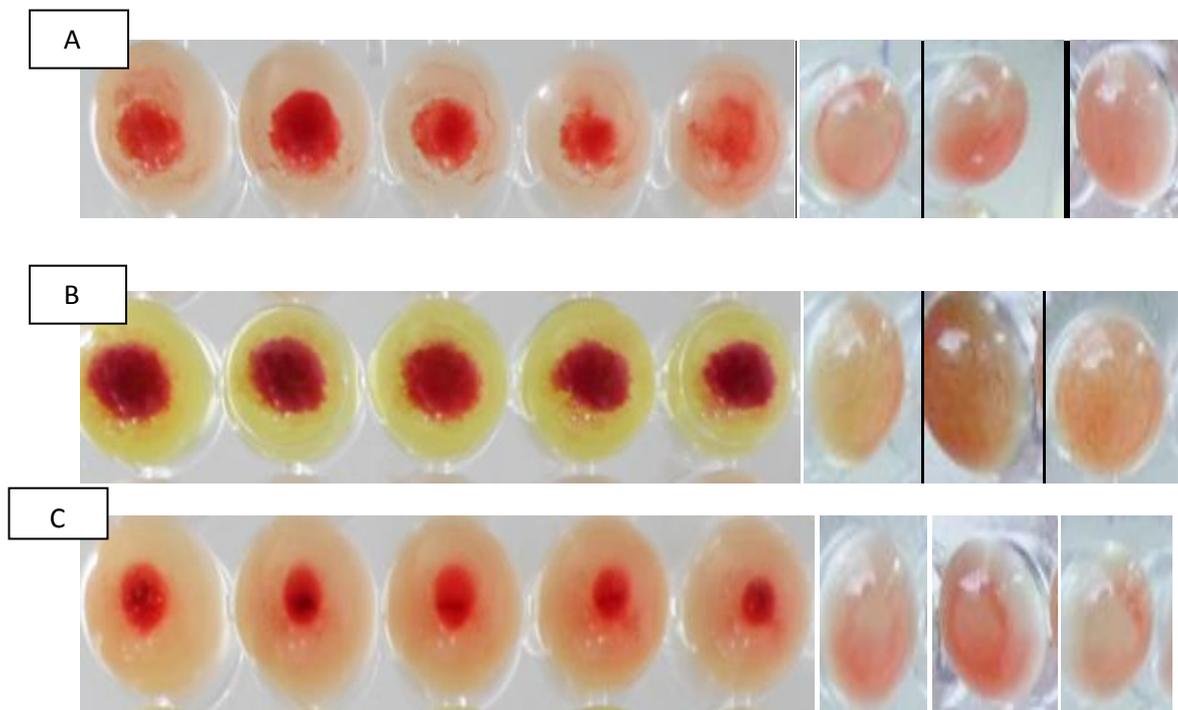


Photo 5 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Punica granatum*(A), *Olea europaea* (B), *ficus carica*(C) A l'œil nu en présence des saccharides.

Section III : Résultats et discussion

Tableau 10 : Le test d'inhibition des extraits bruts avec le caseine et fétuine
(Les glycoprotéines)

	Caseine	Fétuine
glycoproteines		
Extrait brut		
<i>Punica granatum</i>	+	+
<i>Olea europaea</i>	+	*
<i>ficus carica</i>	+	*

+ : agglutination (pas d'inhibition),* : pas testé

Pour déterminer la spécificité de nos extraits vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides tableau9 et Photo 5. Sur le plan qualitatif ce teste a permis d'évaluée la spécificité de ces lectines aux glucides et aussi pour identifier le saccharide qu'on peut utiliser pour son purifications.

Les extraits de *Punica granatum*, *Olea europaea*, *ficus carica* ne présentent aucune spécificité pour les saccharides testés, ce qui résulte par la suite leur agglutination aux hématies. C'est le cas des lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (Valadez et al. 2011). Par contre *Astragalus monghlicus* présentent une spécificité pour le D-galactose et le lactose (Lam et Ng, 2011). Cette inhibition due à l'occupation des sites de reconnaissances par un ou plus de ces trois monosaccharides. Et même propriété de *Bryopsis plumosapre* qui reconnaisse spécifiquement le D-mannose (Han et al., 2010). Ce teste aussi a été effectué sur muqueuse de cuir de l'espèce animale *Clarias gariepinus* (catfish), il a montré une spécificité pour le galactose (Odekanyin et Kuku, 2014). L'extrait d'*Urtica dioica L* est spécifiquement inhibé par le N-acétyle glucosamine, ce qui indique que la lectine d'*Urtica dioica L* présente un site de reconnaissance pour ce monosaccharide, des résultats identiques ont été trouvée avec le même espèce, elles représentent qu'UDA (*Urtica dioica* agglutinine) et *Nicotiana tabacum* ont une spécificité pour GlcNAc, avec une deuxième spécificité au mannose pour l'espèce *Nicotiana tabacum* (Stefanowicz et al., 2012).

Section III : Résultats et discussion

Les extraits de *Punica granatum*, *Olea europaea*, *figus carica* n'ont pas été spécifiquement inhibé par la Caseine et même chose pour la fetuine mais seulement pour L'extrait de *Punica granatum* .

Remarque : la fetuine n'a été pas testée avec les extraits que sur celle de *Punica granatum* à cause de leur déficit.

I.5 L'effet de pH et de la température sur l'hémagglutination

Tableau 11 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *figus carica*

pH extraits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Punica granatum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Olea europaea</i>	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
<i>figus carica</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

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

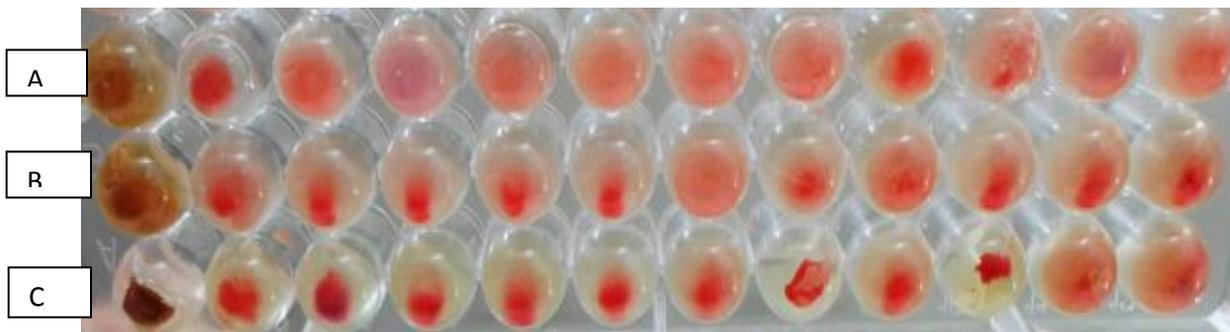


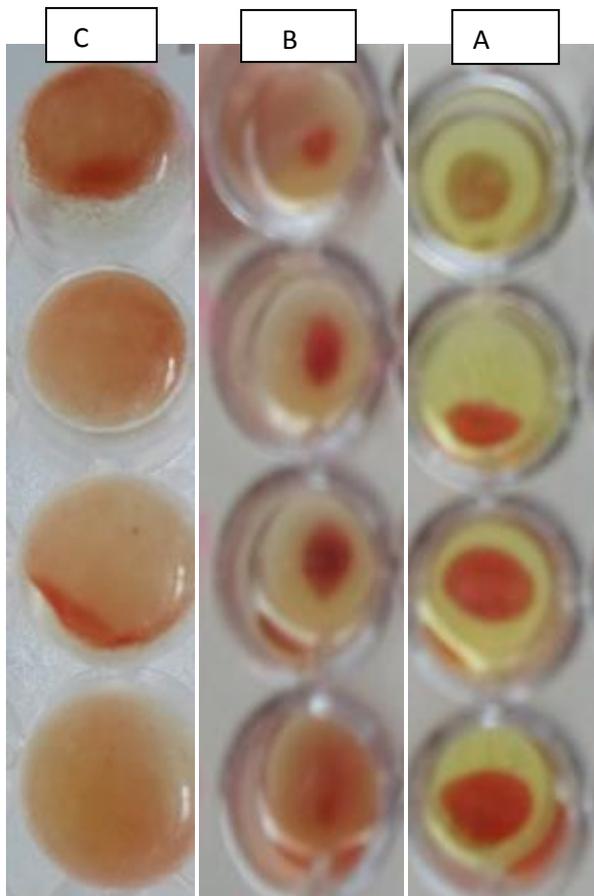
Photo 6 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum*(A), *Olea europaea*(B) et *figus carica*(C) A l'œil nu.

Section III : Résultats et discussion

Tableau 12 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum*, *Olea europaea* et *ficus carica*

Température (°C)	40°	60°	80°	90°
Extrait				
<i>Punica granatum</i>	+++	+++	+++	++
<i>Olea europaea</i>	+++	+++	+++	++
<i>ficus carica</i>	+++	+++	++	+

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



Section III : Résultats et discussion

Photo 7 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum*(A) *Olea europaea*(B) et *ficus carica*(C) A l'œil nu.

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

Nos résultats ont montrées que Les extrait brut de *ficus carica*, et *Punica granatum* a été stable tout le long de la gamme du pH de 1 à 12, tandis que l' extrait d'*Olea europaea* a présentées une stabilité dans la gamme du pH de 1 à 3 et de 6 à 10 avec une perte totale d'activité hémagglutinante à pH 3 à 6, et a PH de 10 à 12(tableau 11 et photo 6) ces résultats ont été comparés à ceux de Chaudhary et Sood (2008) qui ont montré que la lectine de *Ricinus communis* est stable au pH [3-7]. autres lectines comme celles du *Euphorbia helioscopia* pertes leur activité d'hémagglutination plus rapidement, elles restent actif dans un intervalle de pH de [6-8] (Shaista et al., 2014).par contre les lectines de *Ruta graveolens* montre une perte totale d'activité hémagglutinante à pH 1 à 3 (Necib et al., 2015).

Malgré que le traitement thermique de nos extraits d'*Olea europaea*, *ficus carica*, et *Punica granatum* de 40°C jusqu' à 90 °C pendant 1 h, elle n'a été pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante(tableau12 et photo 7). D'autres espèces ont dénaturées dans des températures plus faibles, comme les lectines de *Phaseolus vulgaris* et *Bryopsis plumose* qui restent natives à 60°C et 50°C, avec une perte totale d'activité à 80 °C et 60°C respectivement (Andrew et al., 2014 ; Han et al., 2010). Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistants à la température, comme est le cas des lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* qui pousse jusqu'à 100°C (Necib et al., 2015).

Section III : Résultats et discussion

I.6 test des métaux

Tableau 13 : Résultats du test des métaux avec les extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica*

Extrait brut \ Métaux	EDTA	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Mn ⁺⁺
<i>Punica granatum</i>	+	+	+	+
<i>Olea europaea</i>	+	-	-	-
<i>ficus carica</i>	+	-	-	+

+ : agglutination, - : inhibition



Photo 8 : L'effet d'EDTA sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica* A l'œil nu .

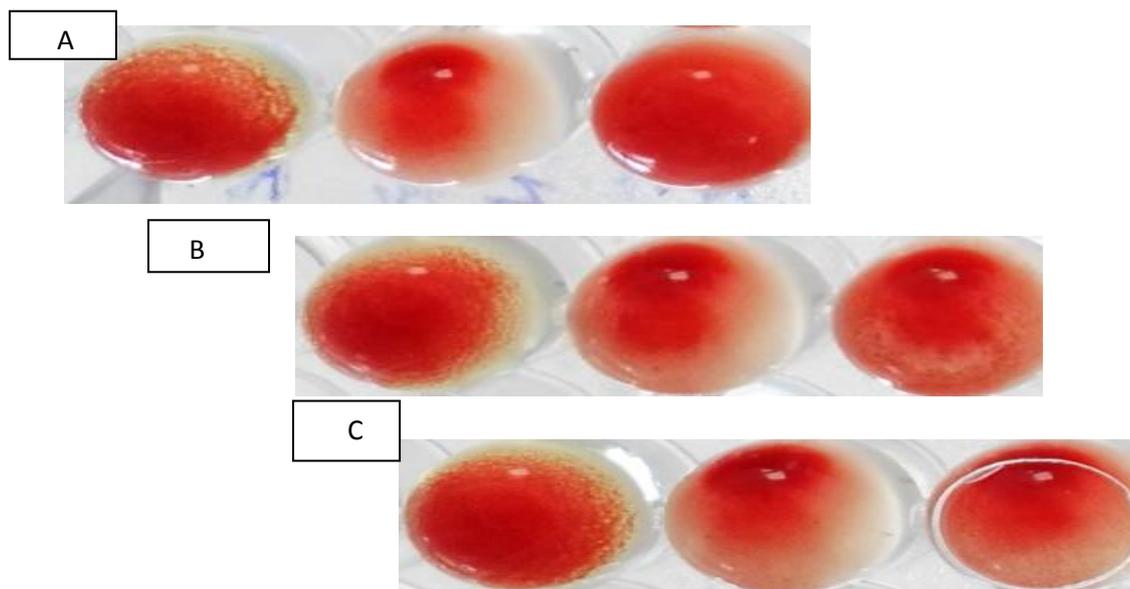


Photo 9: L'effet de Mn⁺⁺ (A) Ca⁺⁺(B) Mg⁺⁺(C) sur l'activité hémagglutinante des extraits de *Punica granatum* , *Olea europaea* et *ficus carica* A l'œil nu

Section III : Résultats et discussion

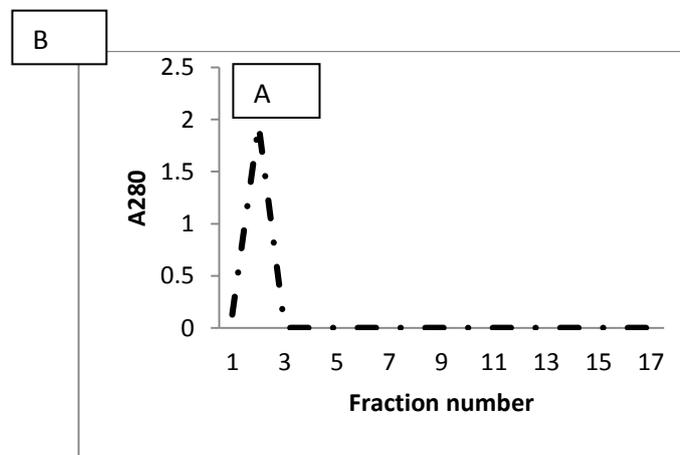
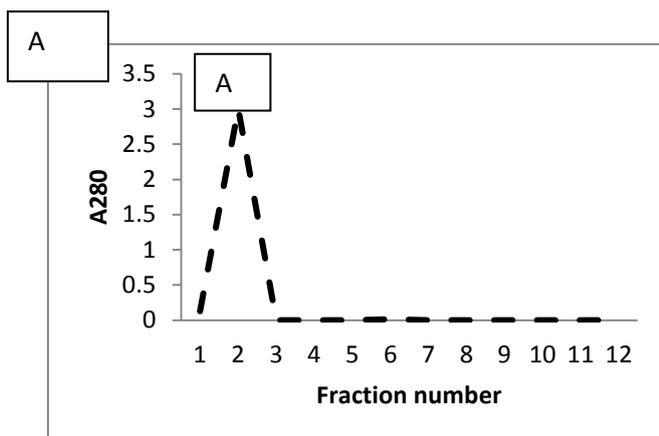
Avec l'EDTA on observe une agglutination avec tous les extrais de 3 plante

Punica granatum montre une agglutination avec tout les metaux Ce résultat montre que notre lectine est une non métalloprotéine et ressemble a red alga *Pterocladia* *Capillacea* (Necib el al, 2014).contrairement à l'extrait d'*Olea europaea* qui ne présente aucune activité avec les métaux testé e ce qui fait d'elle une lectine métalloprotéine Le *ficus carica* présente une inhibition vis à vis du calcium (Ca^{2+}) et au magnésium contrairement au manganèse qui eu a présenté une agglutination lors du contact avec l'extrait.

II. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne

II.1 L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G25 et G75

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



Section III : Résultats et discussion

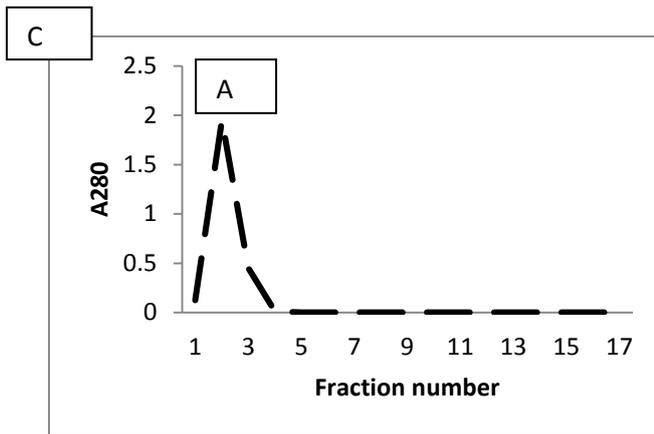
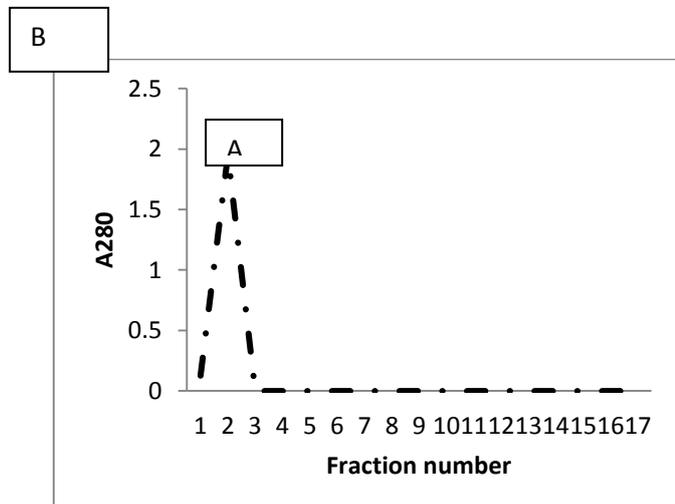
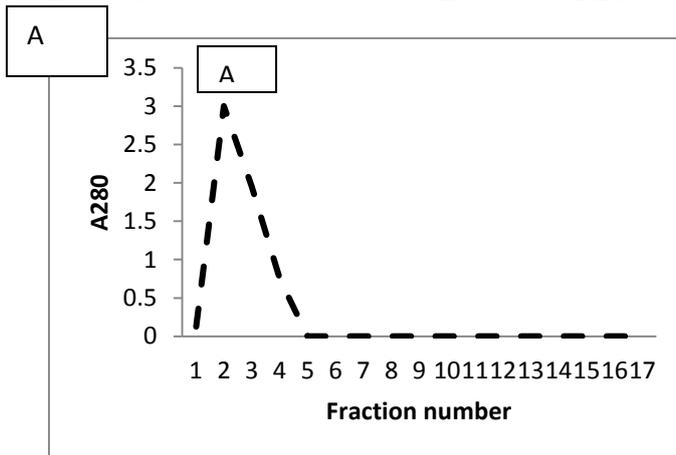


Figure 19 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G25 des extraits de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C)

II.2- L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G75

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



Section III : Résultats et discussion

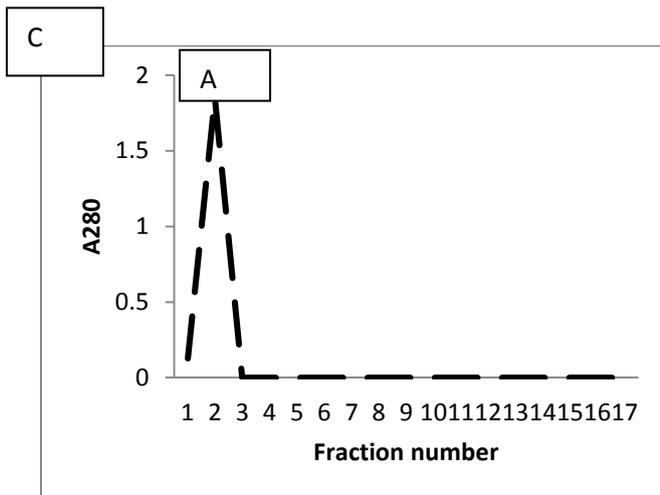
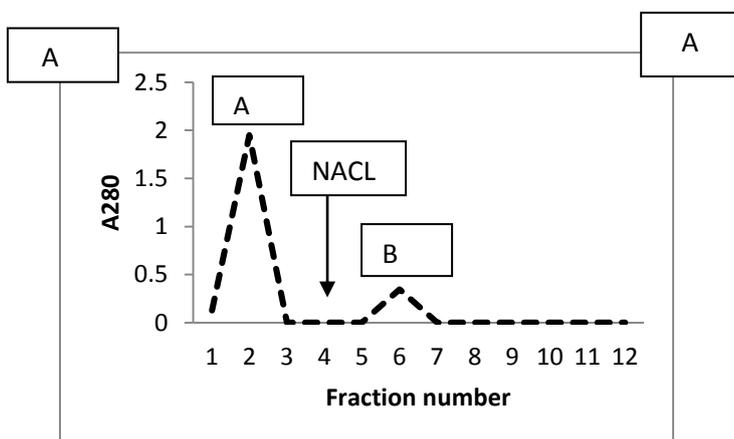


Figure 20 : La filtration par chromatographie sur colonne de séphadex G75 des extraits de *punica granatum* (A), *Olea europaea*(B), *ficus carica* (C)

II. 3- L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne échangeuse d'ion

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



Section III : Résultats et discussion

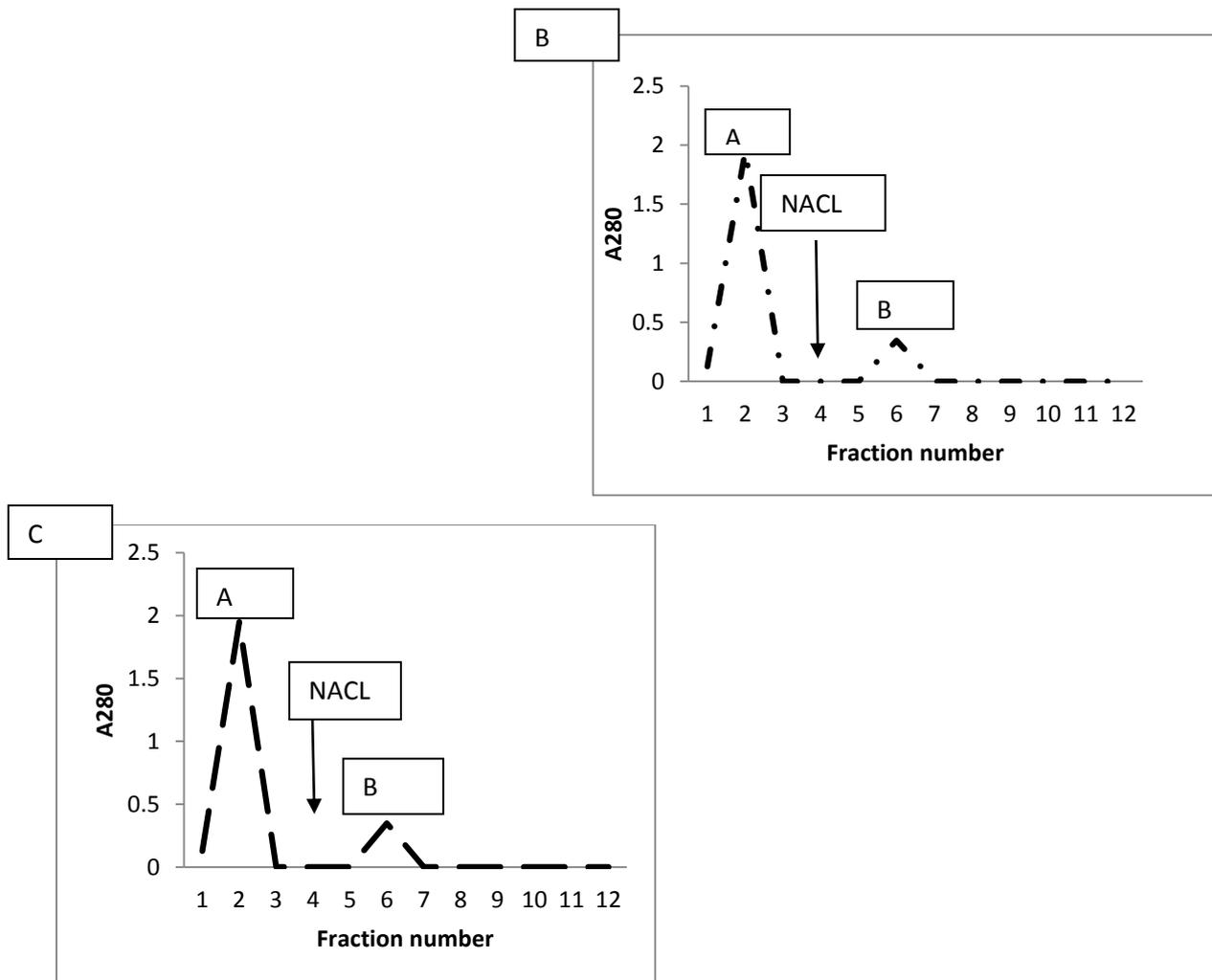


Figure 21: chromatographie sur colonne échangeuse d'ion des extraits de *Punica granatum* (A), *Olea europaea* (B), *Ficus carica* (C)

La filtration de l'extrait de *Punica granatum*, *Olea europaea*, *Ficus carica* sur colonne de séphadex G25 et G75 et la lecture à 280nm a montré un pic correspondre aux 2eme tube (Figure19 et 20). comme est le cas des lectine de *Pterocladia capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G75 (Necib et al., 2015), par contre pour l'échangeuse d'ion, elle a donnée deux pic dans le 2 éme et 6 éme tube (figure21) .des résultats similaires ont été obtenus avec les lectines de *Clarias gariepinus fractionées* sur le gèle séphadex G 150 avec un volume de rétention de 4 ml (Odekanyin et Kuku, 2014).A fin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces trois plante, 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. Les extraits obtenus à la chromatographie sur colonne ont une activité supérieure à celle des extraits initiaux. Ce résultat pourrait insinuer que l'extrait issu de la chromatographie sur colonne contient moins d'impureté sans être un extrait pur de lectine.

Section III : Résultats et discussion

1. DOSAGE DES PROTEINES

Tableau 14 : résultats du test de dosage des protéines des plantes *Punica granatum*, *Olea europaea*, *Ficus carica*

	plante	Concentration des protéines(mg/ml)
brute	<i>Punica granatum</i>	0.29±0.02
	<i>Olea europaea</i>	1.138±0.01
	<i>Ficus carica</i>	0.47±0.01
lécine purifié	<i>Punica granatum</i>	0.095±0.002
	<i>Olea europaea</i>	0.117±0.001
	<i>Ficus carica</i>	0.028±0.001

Le Tableau 14 montre la Concentration des protéines brut (mg/ml) extraire à partir des racines de *Punica granatum* et *Ficus carica* et les feuilles d'*Olea europaea* . et d'autre part la concentration des lécines purifiée .La plante qui donne la concentration des protéines la plus élevée c'est l'*Olea europaea* de 1.138(mg/ml) pour les protéines brut et 0.117 (mg/ml) pour les lécines purifié et pour le *Ficus carica* 0.47(mg/ml) pour les protéines brut et une concentration des lécines un petit peu faible de 0.028(mg/ml) par rapport au l'*Olea europaea* et *Punica granatum* mais la *Punica granatum* présente la concentration la plus bas des protéine brut de 0.29(mg/ml) et 0.095(mg/ml) pour les lécines supérieure au lécines du *Ficus carica* et moins que l'*Olea europaea* .

La plante qui donne la concentration des protéines la plus élevée c'est l'*Olea europaea* de 1.138(mg/ml) pour les protéines brut et 0.117 (mg/ml) pour les lécines purifié et

Section III : Résultats et discussion

pour le *Ficus carica* 0.47(mg/ml) pour les protéines brut et une concentration des lectines un petit peu faible de 0.028(mg/ml) par rapport au l'*Olea europaea* et *Punica granatum* mais la *Punica granatum* présente la concentration la plus bas des proteine brut de 0.29(mg/ml) et 0.095(mg/ml) pour les léctines supérieure au lectines du *Ficus carica* et mois que l'*Olea europaea*

III .Test de l'activité anti oxydante in vitro

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes suivante : la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle). Le test du SOD et le test du fer ferrique

Section III : Résultats et discussion

Tableau 15 : résultats des tests de l'activité anti oxydante

Plants	Le pourcentage de scavenger des radicaux libres (%)		
	DPPH	SOD	Fer ferrique
<i>Punica granatum</i>			
<i>A</i>	74.54±0.13	63.4±0.13	65.1±0.15
<i>B</i>	37.8±0.1	33.2±0.1	22.5±0.1
<i>C</i>	26.92±0.12	32.3±0.14	29.37±0.13
<i>D(lectines purifié)</i>	73.95±0.15	69.7±0.1	65.9±0.1
<i>Olea europaea</i>			
<i>A</i>	60.21±0.16	49.1±0.1	50.9±0.1
<i>B</i>	37.91±0.01	38.5±0.1	38.3±0.12
<i>C</i>	39.55±0.15	19.1±0.15	30.7±0.15
<i>D(lectines purifié)</i>	73.4±0.15	56.9±0.15	49.2±0.12
<i>Ficus carica</i>			
<i>A</i>	75.6±0.15	62.2±0.12	65.7±0.13
<i>B</i>	24.17±0.1	29.3±0.1	23.2±0.1
<i>C</i>	60.68±0.1	57.4±0.1	33.3±0.1
<i>D(lectines purifié)</i>	75.64±0.12	61.9±0.12	45.4±0.13
Standard (ascorbique)	79.19±0.12	76.17±0.17	71.47±0.13

Les résultats du tableau 15 montre que Les Fractions de la plante *Punica granatum* A et D montre des pourcentage plus élevés de 74.54 % et 73.95% dans le test de DPPH et 63.4% et 69.7% pour la SOD et un pourcentage de 65.1 et 65.9 pour le fer ferrique par rapport aux fractions B et C qui montre respectivement un pourcentage faible de 37.8 et 26.92 pour le DPPH et 33.2% et 32.3% pour la SOD et 22.5% et 29.37% pour le fer ferrique.

Section III : Résultats et discussion

Les Fractions de la plante *Olea europaea* A et D montre des pourcentages plus élevés de 60.21% et 73.4% dans le test de DPPH et 49.1% et 56.9% pour la SOD et un pourcentage de 50.9%et 49.2% pour le fer ferrique par rapport aux fractions B et C qui montre un pourcentage de 37.91%et 39.55%pour le DPPH et 38.5% et 19.1% pour la SOD et 38.3% et 30.7% pour le fer ferrique.

Les Fractions de la plante de *Ficus carica* A et D montre des pourcentages plus élevés de 75.6% et 75.64% dans le test de DPPH et 62.2% et 61.9% pour la SOD et un pourcentage de 65.7 et 45.4pour la thiocyanate de fer par rapport aux fractions B et C qui montre un pourcentage de 24.17et 60.68 pour le DPPH et 29.3% et 57.4% pour la SOD et 23.2% et 33.3% pour le fer ferrique.

Pour les tests du SOD et du fer ferrique on remarque que *Punica granatum* montre le pourcentage d'activité le plus élevé et la fraction D (lectines purifiée) toujours possède une activité presque proche au standard (l'acide ascorbique) qui a un pourcentage d'activité de 76.17% pour le test du SOD et 71.47% pour le test du fer ferrique puis la plante *Ficus carica* qui a une activité élevé du fraction A 62.2%(SOD) fraction D est proche au fraction A(61.9) et 65.7% pour le fer ferrique et finalement *Olea europaea* qui montre une activité de 56.9% pour la fraction D(test SOD) et 50.9%pour la fraction A dans le test du fer ferrique.

Et pour le DPPH la plante *Ficus carica* montre l'activité la plus élevé 75.64% (fraction D) puis *Punica granatum* 74.54% (fraction A) et enfin *Olea europaea* 73.4% (fraction D) d'après les résultants qui semble que les plantes *Punica granatum*, *Olea europaea* et *Ficus carica* ont une activité antioxydante Nous avons remarqué que l'effet antioxydant entre les trois plantes est proche ainsi que l'activité antioxydant est considérable et important par rapport à L'acide ascorbique.

2. test de DPPH

Le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH-. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β - picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure- activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, DPPH• reste dans sa forme monomère

Section III : Résultats et discussion

relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515 - 518 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires.

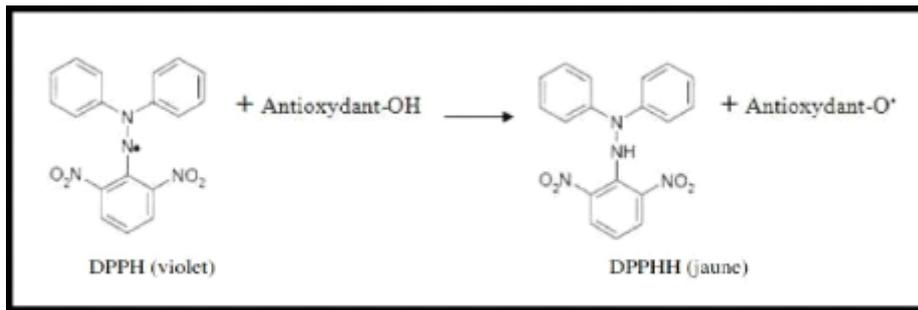


Figure22 : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).

L'évaluation de l'effet de l'extrait de *Punica granatum*, *Olea europaea* et *Ficus carica* contre le stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier in vitro. Pour cela le test de l'effet scavenger de DPPH est réalisé. Il remarque que l'extrait de *Ficus carica* possède une activité antioxydante très importante d'un pourcentage de 75.64 par rapport aux autres extraits, ainsi que l'extrait d'*Olea europaea* est faible que celui de l'extrait de *Punica granatum*. Notre résultats est en accord avec les travaux réalisées sur *Morus nigra* et *Ruta graveolens* qui montre une activité anti oxydante trop élevée de 115.34 µg/ml and 208.95 µg/ml respectivement (necib et al., 2016).

3. test du fer ferrique (FTC)

La méthode du fer ferrique (FTC) est employée pour étudier les propriétés anti oxydantes des échantillons de *Punica granatum* et *Olea europaea* et *ficus carica*. Il s'agit de vérifier si les composés protéiques (les lécitines) empêchent la peroxydation provoquée par une incubation de ces derniers en présence Du potassium ferreucyanide ainsi que du chlorure ferreux et du TCA sont ajoutés aux mélanges tampon et surnagent. Les peroxydes entrent en réaction avec les ions ferreux Fe²⁺ et les transforment en ions ferriques Fe³⁺ qui réagissent avec le thiocyanate de potassium pour former le thiocyanate de fer qui a une coloration rouge dosable à 700 nm. La concentration de peroxydes dans le milieu réactionnel est proportionnelle à celle des ions Fe³⁺ et par conséquent la coloration sera encore plus rouge et l'absorbance encore plus élevée. Donc la plante qui possède la grande transformation

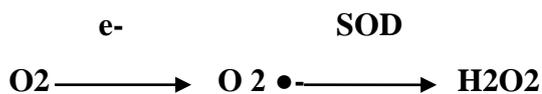
Section III : Résultats et discussion

des ions Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} c'est *Punica granatum* puis *Ficus carica* et enfin *Olea europaea* notre résultats est en accord avec des lectines extrait de *Morus nigra*, *Ruta graveolens*, *Cyperus rotundus* et *Pistacia lentiscus* qui ont la capacité de réducteur Fe^{3+} en Fe^{2+} avec une activité anti oxydante de 281.25 μ g/ml, 116.2 μ g/ml, 334.52 μ g/ml et 300 μ g/ml respectivement (Necib et al . ,2016) .

3. le test du superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase (SOD) (I) est une enzyme convertissant le superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase (II) soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion, catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px) (III).

on note une augmentation significative de cette activité en comparant les extraits *Punica granatum* , *Olea europaea* et *Ficus carica* De plus, on note que l'extrait de *Punica granatum* nous a donné l'activité antioxydante la plus élevée donc beaucoup de formation du peroxyde d'hydrogène puis *Ficus carica* et enfin *Olea europaea* avec une diminution significative dans l'activité Par rapport les deux autre extrait, mais d'une façon générale on note une augmentation hautement significative dans cette activité ces résultats est similaire au travaux de (Necib et al . ,2016) qui on montre que les lectines extrait a partir de 4 plantes *Morus nigra*, *Ruta graveolens*, *Cyperus rotundus* et *Pistacia lentiscus* présentent un activité antioxydante maximal de 211.11%g/ml, 158.75 μ g/ml, 357.14 μ g/ml and 335.7 μ g/ml respectivement et comparé au standard (acide ascorbique) .



Le sujet de lectines est très large et mérite une discussion plus approfondie. Il y a même des lectines qui sont bénéfiques pour le corps ; tels que ceux trouvés dans certaines espèces d'escargots, qui peuvent être capables de prévenir les métastases des cellules cancéreuses. L'implication des lectines dans notre santé et leur relation à la maladie dégénérative est encore une science émergente Les études réalisées sur les animaux continueront à être le modèle à l'avenir pour l'étude des lectines. La glycosylation de l'intestin humain est fondamentalement semblable à celle des animaux élevés et il peut être prédit avec assurance que les effets des lectines alimentaires auront des similitudes entre les humains et les animaux. En bref, les lectines diététiques, par leur réactivité chimique avec les récepteurs de surface cellulaire sur l'épithélium intestinal, sont des signaux métaboliques pour le tube digestif et qui sont capables de moduler les fonctions immunitaires et hormonales.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Nous avons extrait des substances à partir des racines de deux plantes médicinales et pour la troisième c'est à partir des feuilles *ficus carica*, *Punicagranatum* et *Olea europaea* ces molécules ont une activité agglutinante sur les hématies, et que nous appelons lectine. Nos investigations ont présentés que les lectines de *Olea europaea* ne montrent aucune spécificité pour les hématies des groupes sanguins du système ABO, tandis que les lectines de *ficus carica*, *Punicagranatum* agglutinent tous les types de groupe sanguin. Les lectines de *ficus carica*, *Punicagranatum* et *Olea europaea* présente une activité agglutinante en présence de saccharides testé qui montre aucune spécificité pour ces saccharides et aussi on montre aucune spécificité pour les glycoprotéines testé grâce à l'activité agglutinante présentée par les trois plantes. Les *ficus carica*, *Punicagranatum* et *Olea europaea* sont thermorésistants, et ils sont différemment stables dans des pH neutre, alcalin et acide.

Punicagranatum montre une agglutination avec tous les métaux. Ce résultat montre que notre lectine est une non métalloprotéine contrairement à l'extrait d'*Olea europaea* qui ne présente aucune activité avec les métaux testé ce qui fait d'elle une lectine métalloprotéine.

Les extraits ont présentés une activité antioxydante importante vis-à-vis de l'Acide ascorbique. Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Ce travail peut être la première étape d'une naissance des nouvelles lectines. Enfin ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires profondes à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces plantes d'autres techniques.

La performance antioxydante mise en évidence mérite d'être étudiée avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application de cette essence comme bioconservation.

Références
bibliographiques

Abourashed EA, El-Alfy AT, Khan IA et Walker L.(2003).Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res.* Vol. 17. PP 703-712 .

Abuja PM, Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins.*Clinica Chimica Acta.* 306, 1-17.

Ait Youssef M. (2006).Plantes Médicinales de Kabylie.IBIS.Paris.

Albert L. (1998). La santé par les fruits. Ed. Veechi. Paris. 44-74 p.

Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol.*(57) , 919-922.

Al-Qarawi AA, Abd Allah EF et Hashem A. (2012). Effect of *Ephedra alata* on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus* . *Pak. J. Bot.*Vol. 44.N°1. pp. 425-428 .

AL-Qarawi AA, Abd Allah EF et Abeer H. (2011). *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5. N°16. pp. 2297-2303 .

Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014) .Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol.*172, 672–686.

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

Arba M. (2009). Le cactus opuntia, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc Rabat. Maroc. Pp14-16.

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

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

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

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

Barbera G, Carimi F, Inglese P, (1992) . Past and role of the Indian-fig prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, Cactaceae) in the agriculture of Sicily. Economic Botany. Pp 10-20.

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. Medecine/sciences n°3.22, 266-72.

Baskin SI, Salem H. (1994). Oxidant, Antioxydant and Free Radicals. Academic press Inc. 363, pp 25-62.

Beaudeau JL, Delattre J, Peynet J. (2003). Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-Sciences Flammarion.Paris. pp 91-107.

Ben Salem H, Nefzaoui A, Ben Salem L. (2002). Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia* L.). Effects on intake, digestion and sheep growth. J. Agric. Sci. Camb. pp85-92.

Benchelah AC et Maka M. (2008). Les Dattes, intérêt et nutrition. Phytothérapie (ethnobotanique). 6,117 -121.

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

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

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. (2001). Vieillissement et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? . Ann Biol Clin. 59(4), 453-459.

Bothan MB, Weil K R. (2011). Biochimie de harper. 4ème édition. DE BOECK ,510.

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

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

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

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

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

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

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sanvaigo. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. Mutat. 424, 9-21.

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

Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012). caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langérine. Chimie et sciences du vivant. Université de grenoble. 2012. pp 63-64.

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.

Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J. (1978). Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health.* 33, 109–14.

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

Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST, (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* pp 2454–2458.

Coskuner Y, Tekin A, (2003) . Seed composition of prickly pear fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* pp 846-849.

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

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

Curtin J F, Donovan M, Cotter TG. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J of Imm Methods.* 265, 49-72.

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

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

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

Deeksha M, Sangha K, Khurana D S, Kaur G, Bala M, Singh B. (2015) . Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch.* 3(1) , 20-24.

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.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris – new york. pp 620.

Derbel S, Touzard B, Triki MA et Chaieb M. (2010) .Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora.* Vol. 205, pp 471–474 .

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

Diana XD. (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic response in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water . *Toxicol Environ Health.* 24(3), 357-72.

Djerbi M. (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome. P191 .

Djouab A. (2007). Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. *Memoire de Magister.option génie alimentaire. Université de Boumerdès .*pp 24 .

Dole A et Lindeberg S. (2005).Agrarian diet and diseases of affluence-do evolutionary novel dierylectins cause leptin resistance.*Bio, mad central lid.doi .10.1186 ,1472-6823-5-10 .*

Drickamer K. (1993) . Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400.

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine.* Gvozdzakova A (ed) pp 19-43.

E**delman GM, Cunningham BA, Reeke GN, Becker JW, Waxdal MJ and Wang**

JL. (1972) . The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69, 2580-2584.

Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB and Wood SP. (1994) .Structure of pentameric human serum amyloid P component. Nature. 367, 338-345.

Ennouri M, Evelyne B, Laurence M, Hammadi A. (2005) . Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. Food Chemistry. pp 431-437.

Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc. Lavoisier. Paris. pp 147-155.

Essig DA and Nosek TM. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. Can J Appl Physiol. 22, 409-428.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Rad Biol Med. 13, 341 - 349.

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

Evans WC. (2009) .Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).

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

Favier A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Ann Biol Clin. 55 (1), 9 - 16.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'act Chim. 108 - 115.

Fernandez ML, Trejo A, McNamara DJ. (1990) . Pectin isolated from Prickly pear (*Opuntia* sp) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. J. Nutr. pp 1283-1290.

Gabius HJ, Springer WR and Barondes SH. (1985). Receptor for the cell binding site of discoidin I. Cell. (42), 449-456. Galan P, Preziosi P, Triol I. (1997). Antioxydant et prevention cahiers de nutrition et de diététique. 359-370.

Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H. (2007). Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. Free Rad Res. 41, 251-9.

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

Ghourri M, Zidane L, Douira A. (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). Journal of Animal & Plant Sciences. Vol.17, pp 2388-2411.

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

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

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

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

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

Angel GR, Vimala B, Nambisan B, Phytopharm. (2013). 4(1), 96-105.

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

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

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

Guillot J, Guerry M, Konska 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.

Gutteridge J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Free Rad Res Comm. 19, 598-620.

Han H J, Jung M G, Kim M J, Yoon S K, Lee P K, Kim G H.(2010). Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosapre*. Phycological Research. 58,143–150.

Hardman KD and Ainsworth CF. (1972). Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. Biochemistry. 11, 4910-4919.

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

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nat. 421(6919), 182-187.

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

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

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

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

Jaccot B et Campillo B. (2003). Nutrition humaine. Ed. Masson. Paris. pp 311 .

Jaffe WG. (1980).hemagglutinins (Lectins) . In toxic constituents of plant foodstuffs. New – York. Academic Press. pp 502.

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

Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective. Holtzman J.L (ed) pp123-160.

Jeyaprakash A A, Katiyar S, Swaminathan C P, Sekar K, Surolia A.(2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. J Mol Biol.332,217-228. **Ji LL, Fu R, Mitchell EW. (1992) .** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. J Appl Physiol. 73, 1854-1859.

Kagi JHR. (1993).Evolution ,structure and chemical activity of class 1 metallothioneins: an overview. in: Suzuki. KT. Imura. N. Kimura.M. (Eds), Metallothionein III: Biological roles and medical implications. Birkhauser verlag. Berlin.29-56.

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

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

Kehrer JP. (1993). Free radcals as mediators of tissue injury and disease. Crit Review in Toxicol. 23 (1), 21-48.

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

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

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

Lazo JS, Pitt BR. (1995). Metallothionein and cell, death by anticancer drug. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 655-677.

Leffler H , Carlsson S, Hedlund M, Qian Y and Poirier F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433-440.

Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse méd.* 30, 1076-1081.

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

Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 790-796.

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

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

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

Lucienne D. (2007). Les Plantes Médicinales de l'Algérie. Berti.

Marnett L J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res.* 424, 83-95.

Martínez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Bioch.* 77, 147-161.

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

Milbury P E et Richer A C. (2008). Understanding the Antioxidant Controversy. Ed: PRAEGER. pp 81-100.

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. Free Radic Biol Med. 22, 359-378.

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

Murdock LL, Shade RE .(2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. 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.

Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. Mutat. 424, 59-69.

Nawwar M A M, El-Sissi H I , Barakat H H.(1984).Flavonoid constituents of Ephedra alata. Phytochemistry. Vol. 23. N°. 12, pp 2937-2939 .

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

Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H 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.(2015).comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: Cyperus rotundus, Pistacia lentiscus and Ruta graveolens. World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1), 1720-1733.

Necib Y, Bahi A , Merouane F , Bouadi H , Boulahrouf K.(2015).immunomodulatory activity of lectin extracted from the red marine alga pterocladia capillacea. World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1), 1693-1706.

Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H , Boulahrouf K.(2016).Antioxydant ,Anti-inflammatory and antimicrobial properties of new lectins purified from roots of Algerian plants: *Morus Nigra*, *Ruta Graveolens*, *Cyperus Rotundus* and *Pistacia Lentiscus*. World Journal of Pharmaceutical Research.5(2), 39-53 .**Necib Y , Bahi A, Derri N, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K.(2015).** Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1) , 1707-1719.

Neffar S .(2012). Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk- ahras et Tébessa. Thèse de doctorat. Université de badji mokhtar. Annaba .

Nerd A, Mizrahi Y. (1994). Effect of nitrogen fertilization and organ removal on rebudding in *Opuntia ficus indica* (L.). *Scientia Horticulturae*.pp 115-122.

Odekanyin O O, Kuku A. (2014).caracterization of galactosespecific lectin from the skin mucus of african catfish *clarias gariepinus* burchell. 1822. *Academic journals*.9(20), 869-879.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 .

Ould El Hadj MD, Hadj-Mahammed M et Zabeirou H. (2003),place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, pp 47-51 .

Ozenda P. (1991).Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique. Paris (3éme Ed.),pp 662.

Packer T, Ritschler HJ, Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 22, 359-378.

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

PeumansWJ , Vandamme JM. (1995).lectine as plant defense proteins. Plant Physiol.109,347-352.

Pimienta-Barrios E.(1993). Vegetable cactus (Opuntia). In Underutilized Crops: Pulses and Vegetables. Ed J. Williams. London.UK. pp 177-191.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaiss Coeur Poumons. 4(5), 359-370.

Piquet M A et Hébuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive . Ed : DOIN .pp 16-20.

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

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

Powers SK , Lennon SL. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc. 58, 1025-1033.

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

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

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

Reyes-Aguero JA, Aguirre JR, Valiente-Banuet A. (2006). Reproductive biology of Opuntia: A review. Journal of Arid Environments. pp549-585.

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

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

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

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

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

Rydz N, Swytun L L, Notley C , Paterson A D, Riches J J, Sponagle K , Booyawat B , Montgomery R R , James P D, Lillicrap D. (2013).The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. Blood. 121, 5228–5237.

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

Sen CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. Med Sci Sports Exer. 33 (3), 368-370.

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

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

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

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

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

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

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

Sies H. (1993). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer J of Med.* 91, 31S-38S.

Simonian N A, Coyle JT. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann review of Pharmacol and Toxicol.* 36, 83-106.

Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005). Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 33 (5), 575-586.

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

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Ren a Biol.* 327, 649-662.

Stevnsner T, Tharslund T, De souza-pinto NC, Bohr VA. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol.* 37, 1189-1196.

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

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

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

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

Sadananda T S, Govindappa M and Ramachandra Y L. In vitro Antioxidant Activity of Lectin from Different Endophytic Fungi of *Viscum album* L. British Journal of Pharmaceutical Research. 2014 .4(5), 626-643 .

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

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

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

Valadez V C, Guzman P A, Javier Soto C F , Álvarez M G , Morales G J, Madrigal S E , Jose Roberto Villagomez I J R , Zuniga P C, Jose Gutierrez S J , Becerril F M.(2011). Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). Molecules, 2011. 16, 2561-2582.

Valtiner U et al .(2003). The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. Anticancer Res.23 (2B), 1197-1206 .

Vandamme E J, Peumans W J , Barre A, Rougé P.(1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Critical Reviews in Plant Sciences.17(6) , 575-692.

Velasquez (Ernesto). (1998).El Nopal y su historia, Clio, Mexico (1998).

Vican P.(2001).Encyclopédie des plantes médicinales.2.Ed. Larousse. Paris.

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

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

Weis W I , Brunger A T, Skehel J J and Wiley D C. (1990). Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. J Mol Biol.212, 737-761. **Welch WJ. (1992).** Mammalian stress response: cell physiology, structure,function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev. 72, 1063-1081.

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

Structure.4,1339-1352. **X**u S , Wang L , Wang X W , Zhao Y R B I W J , Zhao X

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

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

Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilalolu V.(2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. Journal of Agriculture and Food Chemistry.48, 5030-5034.

Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Rad Biol & Med. 33. 337-349.

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

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

ANNEXE

Annexe 01 : Préparation du Tampon, Monosaccharides, Métaux et NaCl.

- Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH7, 2)

Pour 5 litres

Produit chimique	Quantité
Disodium phosphate (Na₂HPO₄)	0,435 g
Monosodium phosphate (NaH₂PO₄)	5 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	45 g
Eau distillée	5 L

- Préparation des monosaccharides

Sucre	Na Cl
0,1 g	1 ml

- Préparation des métaux

Métaux	Quantité	NaCl
MgCl₃	0,048 g	100 ml
CaCl₃	0,032 g	4 ml
MnCl₃	0,15 g	4 ml

- Préparation du NaCl(0,1M ;0,2M ;0,3M)

	NaCl	Eau distillée
0,1M	1,91g	0,33L
0,2M	5,8g	0,5L
0,3M	8,7g	0,5L

Annexe 02 : Méthodes de dosage de l'activité antioxydante in vitro (DPPH,SOD ,Fer ferrique).

1. Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

La procédure expérimentale du dosage du superoxyde dismutase est la suivante :

- ✚ Prélever 0.1 ml de mélange (méthionine (13mM) et Na₂EDTA (0.1mM)).
- ✚ Ajouter 0.8922ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8).
- ✚ Ajouter 0.05ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 0.95ml de tampon phosphate.
- ✚ Ajouter 0.0852ml de NBT (2.64mM).
- ✚ Ajouter 0.0226ml de riboflavine (0.26mM).
- ✚ La réduction du NBT est estimée après 20min à unelongeur d'onde 580nm contre le blanc.

Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capabled'inhiber 50% de NBT) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Y = \left[\frac{DO_{\text{étalon}} - DO_{\text{échant}}}{DO_{\text{étalon}}} \times 100 \right] \times \frac{20}{C}$$

20 : Facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

C : la concentration des protéines dans l'échantillon (mg/ml).

2. Effet scavenger du radical DPPH in vitro

La procédure expérimentale est basé sur les étapes suivantes :

- Prélever 50µl de plasma
- Ajouter 1.95ml de DPPH
- Laisser le mélange a l'obscurité pendant 30min, la décoloration par rapport au contrôlenégatif contenant uniquement la solution de DPPH.
- Lire l'absorbance à unelongeur d'onde : 517nm.

L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation suivante

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échat}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

3. Dosage de fer ferrique

La procédure expérimentale est basée sur les étapes suivantes :

- ✚ 1ml lectin mélangé avec 2.5 ml tampon phosphate
- ✚ 2.5ml potassium ferricyanide 1%
- ✚ Mélangé bien puis incubé pendant 20min.
- ✚ Ajouter 2.5 ml TCA (10%)
- ✚ Ajouter 0.5 ml ferrique chlorure (0.1%)
- ✚ Lire l'absorbance a 700 nm après 10 min contre le blanc qui contient le méthanol a la place d'échantillon

L'activité de fer ferrique est estimée selon l'équation suivante

$$\text{Ferferrique (\%)} = (A - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) \times 100.$$

4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

✚ Mode opératoire

- Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- Ajouter 5ml du réactif coloré (BBC).
- Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595 nm contre le blanc contenant l'eau distillée

à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 → 1mg/ml de sérum albumine de bovin).

✚ Réactif de Bradford

- Bleu de coomassie.....0.1g
- Ethanol(95%).....50ml

Agitation pendant deux heures (agitation magnétique) puis ajouter

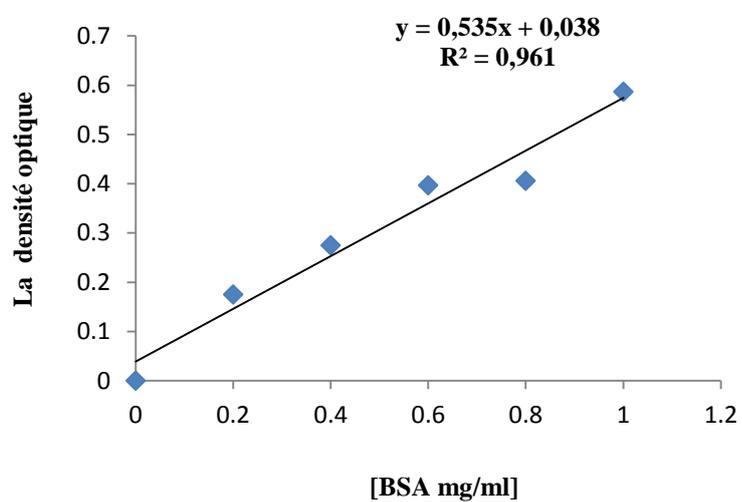
- Acide orthophosphorique (85%)
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

- BSA.....1g
- Eau distillée.....qsq1000ml

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BC (ml)	5	5	5	5	5	5



Etude de l'activité antioxydants in vitro extraites à partir des plantes :*Punica granatum , Olea europaea , ficus carica***Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et santé****Résumé**

Ce travail porte sur la recherche des la présence des lectines et la propriété biologique qui est l'activité antioxydante de *Punica granatum* , *ficus carica* et les feuilles d'*Olea europaea* la présence des lectines dans les extraits de ces plantes à été effectué par le test d'hémagglutination et leur étude biologique .L'extraction à été faite par broyage et macération dans une solution tampon .l'activité hémagglutinante d'extrais de *Punica granatum* , *ficus carica* et l'*Olea europaea*(les feuilles) à été de 1 :32 ,1 :8 et 1 :16 respectivement .le traitement thermique des lectines de *Punica granatum* , *ficus carica* et l'*Olea europaea* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour inhibel'agglutination .l'activité hémagglutinante de *Punica granatum* et , *ficus carica* est stable à Ph [1à12] ,celle de l'*Olea europaea* stable à pH [1à 2]et [7à 9] . un test à été effectué par la suite avec différents saccharides (glucose, galactose, mannose, xylitol, melibiose, rhamnose,lactose) et avec des glycoprotéines (casine et fétuine) qui à montré aucune spécificité pour les saccharides testés et les glycoprotéines testé .pour le test d'ABO les lectines de *Punica granatum* et *ficus carica* désignées comme non spécifique , Au contraire l'extrait d'*Olea europaea* ne présente aucune sélectivité pour les groupes du système ABO. Les lectines de *Punica granatum* et *ficus carica* montre une agglutination avec tout les métaux testé Ce résultat montre que notre lectine est une non métalloprotéine contrairement à l'extrait d'*Olea europaea* ne présente aucune activité avec les métaux testé ce qui fait d'elle une lectine métalloprotéine. L'extraction de nos lectines par chromatographie sur colonne de séphadex G25 et G75 à donner un seul pics pour toutes les plantes par contre L'extraction de nos lectines par chromatographie sur colonne échangeuse d'ion à donner deux pics pour toutes les plantes .L'activité antioxydant des plantes médicinales est évaluée soit par le dosage des produits formés (en particulier des hydroperoxydes) par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres les méthodes appliquée pour mesurer l'activité antioxydant *in vitro* sont: le dosage des proteines et le test du SOD (superoxyde dismutase) et le fer ferrique ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH(diphényl-picrylhydrazyle) L'évaluation de l'activité antioxydante par ces tests, a révélé un grand pouvoir antioxydant surtout pour l'extrait *Punica granatum* puis, *ficus carica* et *Olea europae*

Mots clés : plantes médicinales,lectines, hémagglutinante, système ABO, inhibition, activité antioxydant, piégeage des radicaux libres, SOD, DPPH, fer ferrique

Laboratoire de recherche : BIOCHIMIE, ENZYMOLOGIE

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB Y.

(Pr - UFM Constantine),

Rapporteur : BAH I A. (MCB - UFM Constantine),

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

Date de soutenance : 05/06/2016