



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

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 et les propriétés
immunitaires des lectines extraites des plantes d'origine Algérien**

Présenté et soutenu par : **BARKATE Abderaouf**

Le : **01-06-2016**

DERDOURI Romaiassa

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB Y

(Pr-UFM Constantine)

Rapporteur : BAHI A

(MC-UFM Constantine)

Examineur : DJEMAI ZOUGHLACHE S

(MAA-UFM Constantine)

Année universitaire

2015 – 2016

****Remerciements****

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Dr BAH I Ahlem Maitre de conférence au département de Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine, qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ces encouragements, sa gentillesse nous sommes très honoré de travailler avec elle

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

A notre président du jury Monsieur Necib.Y professeur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à L' Université des Frères Mentouri Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.

A l'examinatrice Dr DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia Maitre assistante à l'université des frère Mentouri, nous somme fière que vous avez acceptez d'examiner et de juger notre travail

Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs connaissances et leurs conseils.

Merci



Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant ,qui m'a tracé le chemin de ma vie , j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux ,l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude ,pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance ,courage et sécurité.

A mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études ,pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

A mes tantes, mon oncle

A toute ma famille barkate , Benhamla

A ma très chères sœurs :Amel et son mari Abdelghani.

A mon très cher frère :Mohamed amine et sa femme meriem

A mes très chères Neveux Hassen , Badreddine,Amira,Mohamed rida

A mes très chère amis « Larbi et Azedine »

A toute ma famille ,proche ou éloignée.

A toute mes cousine :Djalila, Afef, Amina, Rima, Choubeila, Radia

A tout mes cousins :Khaled,Abdelkarim , Djamel

A tout mes amis :Khaoula, Abir, Romaiassa, Abdessamie, Besma, Asma, Manel, Khadidja, Yacer, Ayoub , mohamed ,Abdeldjabar , Zaki , Naoufel, Hachem

A mon binome « Romaiassa » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

Sans oublier mes braves amies de la promotion de Biochimie moléculaire et santé.

ABDERAOUF

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant ,qui m'a tracé le chemin de ma vie , j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux ,l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude ,pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance ,courage et sécurité.

A mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études ,pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

A mes grand-mère Mesaouda et Elzohra.

A mes tantes ,mes oncles.

A toute ma famille Derdouri , Naili.

A mes très chères sœurs :Khouloud , Aya.

A mon très cher frère :Rabeh oussama.

A mon très cher ami « Walid ».

A toute ma famille ,proche ou éloignée.

A toute mes cousine :Chahra, Imene, Hiba, Samiha,Kounouz,Nawel, Amel,Faten.

A tout mes cousins :Hichem, Mounder,Nasro,Amar,Mohamed, Hamza.

A tout mes amis :Khaoula, Abir, Abderaouf, Abdessamie, Besma, Asma, Manel,Khadidja, Amal ,Boutheina,Radia, Yacer,Haitem,Wafa,Hanane, Chahra, Rokaya.

A mon binome « Abderaouf » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et son famille.

Sans oublier mes braves amies de la promotion de Biochimie moléculaire et santé.

ROMASSA

Résumé

Les lectines sont des substances protéiques extraites des plantes ou d'animaux. Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les extraits d'*Opuntia ficus indica*(racine,raquette),*Phoenix dactylifera*,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* 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'extrait d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette),*Phoenix dactylifera* , *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* a été de 1 :11 (2048) , 1 :3 (8) , 1 :7(128) 1 :4 (16) et 1 :13(8192) respectivement .le traitement thermique des lectines d'*Opuntia ficus indica*(raquette), *Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour leur inactivation,par contre les lectines d' *Opuntia ficus indica* (racine) et *Artemisia absinthium* possèdent une résistance jusqu'à 60°C . L'activité hémagglutinante d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette) est stable à pH [7-12] et [2-7] respectivement ,celle de *Phoenix dactylifera* est stable à pH [2-12], *Artemisia absinthium* à pH [3-5] et [7-12] et celle d' *Ephedra alata* à pH [1-12]. Un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et glycoprotéines et qui a montré que les lectines d'*Opuntia ficus indica*(raquette) ont été spécifiquement inhibés par le galactose, mannose, glucose et celles d'*Artemisia absinthium* par le glucose et galactose. les lectines de nôtres plantes sont tous des métalloprotéines sauf *Ephedra alata*. Pour le test d'ABO, les lectines extraites de nos plantes ne possèdent aucune sélectivité vis-à-vis des groupes sanguins humains. La purification par chromatographie échangeuse d'ions de nos extraits à donner deux pics pour toutes les plantes sauf *Phoenix dactylifera* qui à donner trois pics.la filtration des extraits sur colonne séphadex G25 ont montrés un seul pic ; alors que les resultats de séparation sur colonne de sephadex G75 ont montrés un seul pic pour *Opuntia ficus indica*(raquette) , deux pics pour *Artemisia absinthium* et *Phoenix dactylifera* et trois pics pour *Opuntia ficus indica*(racine).

L'activité antioxydante (DPPH et Fer ferrique) in vitro des lectines extraites de la plantes *Ephedra alata* est plus élevée par rapport aux autres .

Un autre test a montré que plus la dose employée augmente plus le système immunitaire est stimulé, ce qu'il prouve l'effet qu'exercent les lectines d'*Ephedra alata* sur le système immunitaire.

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

Abstract

The lectines are proteinic substances extracted from plants or animals. The goal of this work is to seek the presence of the lectines in the extracts of *Opuntia ficus indica* (root, ratchet), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* and *Ephedra alata* by the test of hemagglutination and their biological study. The extraction was made by crushing and maceration in a buffer solution. The hemagglutinante activity of extract of *Opuntia ficus indica* (root and ratchet), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* and *Ephedra alata* was of 1: 11 (2048), 1: 3 (8), 1: 7(128) 1: 4 (16) and 1: 13(8192) respectively. The heat treatment of the lectines of *Opuntia ficus indica* (ratchet), *Phoenix dactylifera* and *Ephedra alata* from 40°C until 90°C was not sufficient for their inactivation, on the other hand the lectines of *Opuntia ficus indica* (root) and *Artemisia absinthium* have a resistance until 60°C. The activity hémagglutinante of *Opuntia ficus indica* (root and ratchet) is stable at pH [7-12] and [2-7] respectively, that of *Phoenix dactylifera* is stable at pH [2-12], *Artemisia absinthium* with pH [3-5] and [7-12] and that of *Ephedra alata* at pH [1-12]. A test of inhibition was carried after with various monosaccharides and glycoproteines which showed that the lectines of *Opuntia ficus indica* (ratchet) were specifically inhibited by galactose, mannose, glucose and those of *Artemisia absinthium* by glucose and galactose. The lectines of our plants are all metalloproteines except *Ephedra alata*. For the test of ABO, the lectines extracted from our plants do not have any selectivity with human blood groups. The purification by exchanging chromatography of ions of our extracts gave only one peak for all the plants. The filtration of the extracts on column sephadex G25 showed only one peak; whereas the results of separation on column of sephadex G75 showed only one peak for *Opuntia ficus indica* (ratchet), two peaks for *Artemisia absinthium* and *Phoenix dactylifera* and three peaks for *Opuntia ficus indica* (root). The antioxidant activity (DPPH and Ferric-iron) in vitro of the lectines extracted from the *Ephedra alata* plants is higher compared to the others. Another test showed that over the dose employed increases more the immune system, which it proves the effect that the lectines of *Ephedra alata* exert on the immune system.

Keywords :Lectines, Extraction, Hemagglutination, ABO system, Inhibition, Sugars.

ملخص

الليكتينات هي مواد بروتينية تستخلص من النباتات او الحيوانات. الهدف من هذه الدراسة البحث عن وجود الليكتينات في مستخلص جذور و ورقة *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium*, *Opuntia ficus indica* و *Ephedra alata* بواسطة اختبار التراص و دراستهم البيولوجية.

الاستخلاص تم بواسطة الطحن و النقع في محلول ملحي. نشاط التراص للمستخلصات لجذور و ورقة *Opuntia ficus indica*, *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* و *Ephedra alata* من 1 الى 11 (2048), 1 الى 3 (8), 1 الى 7 (128), 1 الى 4 (16) و 1 الى 13 (8192) بالترتيب. اخضاع لكتينات ورقة *Opuntia ficus indica*, *Phoenix dactylifera* و *Ephedra alata* لدرجة حرارة من 40 الى 90 درجة غير كافي لتثبيطها على عكس لكتينات جذور *Opuntia ficus indica*, *Artemisia absinthium* التي تقاوم حتى 60 درجة. نشاط تراص جذور و ورقة *Opuntia ficus indica* تبقى ثابتة عند درجة حموضة من (7 الى 12) و (2 الى 7) بالترتيب, اما *Phoenix dactylifera* فهي ثابتة عند درجة حموضة من (2 الى 12), *Artemisia absinthium* عند درجة حموضة من (3 الى 5) و من (7 الى 12) اما *Ephedra alata* فهي ثابتة عند درجة حموضة من (1 الى 12). بعده تم تطبيق اختبار التثبيط مع مختلف السكريات الاحادية و الغليكوبروتينات و الذي بين ان ليكتينات ورقة *Opuntia ficus indica* تثبتت من طرف جالاكتور, مانوز, جلوكوز اما *Artemisia absinthium* فقد تثبتت من طرف الجلوكوز و الجالاكتور.

ليكتينات النباتات المدروسة كلهم بروتينات معدنية ما عدا *Ephedra alata*. اما بالنسبة لاختبار ABO, الليكتينات المستخلصة من هذه النباتات لا تملك أي انتقائية اتجاه خلايا دم الانسان.

التنقية بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني للمستخلصات اعطت ذروة واحدة بالنسبة لجميع النباتات. تنقية المستخلصات بواسطة هلام سيفادكس G25 اعطت ذروة واحدة, اما نتائج التفرقة بواسطة هلام سيفادكس G75 اعطت ذروة واحدة بالنسبة ورقة *Opuntia ficus indica*, ذروتين بالنسبة *Artemisia absinthium* و *Phoenix dactylifera*, ثلاث ذروات بالنسبة لجذور *Opuntia ficus indica*.

يعتبر النشاط المضاد للاكسدة في المختبر (DPPH, Fer ferrique) لليكتينات المستخلصة من طرف *Ephedra alata* عالي مقارنة مع النباتات الاخرى.

اختبار اخر قام باظهار تأثير ليكتينات *Ephedra alata* على الجهاز المناعي حيث انه كلما ازداد تركيز الجرعة المحقونة كلما حفز الجهاز المناعي اكثر.

الكلمات المفتاحية: الليكتينات, الاستخلاص, التراص, نظام ABO, تثبيط, السكريات.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre I :Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines.....	Page 1
2. Historique.....	Page 2
3. La structure des lectines.....	Page 4
4. Les sites de liaisons des lectines.....	Page 6
5. La spécificité et l'affinité des lectines.....	Page 7
6. La classification des lectines.....	Page 9
7. Distribution des lectines dans le monde vivant.....	Page 10
8. Fonction biologique des lectines.....	Page 14
9. Propriétés des lectines.....	Page 14
10 . L'intérêt des lectines.....	Page 17
11. Le rôle des lectines dans l'immunité.....	Page 18

Chapitre II :Le systeme sanguin

1. Historique.....	Page 20
2. Le système ABO.....	Page 20

3. Facteur rhésus.....Page 21

4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO.....Page 21

5. Détermination du groupe sanguin.....Page 22

Chapitre III : Généralités sur les plantes

1. Opuntia ficus indica.....Page 23

2. Phoenix dactylifera.....Page 25

3. Artemisia absinthium.....Page 27

4. Ephedra alata.....Page 29

Chapitre VI :Le stress oxydatif

1. Définition.....Page 31

2. Les espèces réactives de l'oxygène.....Page 32

3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....Page 33

4. Le stress oxydant et les pathologies..... Page 37

5. Systèmes de défenses antioxydants.....Page 38

Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques.....Page 43

1.2.2.Le test d'héماغglutination.....Page 46

1.2.3.La limite d'héماغglutination.....Page 47

1.2.4. L'effet de la température sur l'héماغglutination.....Page 47

1.2.5.L'effet du pH sur l'héماغglutination.....Page 47

1.2.6.Le test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines.....Page 47

1.2.7.Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides.....	Page 48
1.2.8.Le test des métaux.....	Page 48
1.2.9.Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.....	Page 48
1.2.10.La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions.....	Page 48
1.2.11L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 et G25.....	Page 49
1.2.11.L'activité antioxydante des lectines in vitro.....	Page 49
2. Matériels et méthodes des tests biologiques.....	Page 50

Résultats et discussion

1. Le test d'hémagglutination.....	Page 53
2. La limite d'hémagglutination.....	Page 54
3. L'effet de la température sur l'hémagglutination.....	Page 56
4. L'effet du pH sur l'hémagglutination.....	Page 58
5. Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.....	Page 60
6. Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides.....	Page 61
7. Le test des métaux.....	Page 63
8. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.....	Page 63

9. La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions.....	Page 65
10. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 et G25.....	Page 67
11. Etude de l'activité antioxydante in vitro des lectines extraites des plantes Opuntia ficus indica (racine et raquette) ,Phoenix dactylifera ,Artemisia absinthium et Ephedra alata	Page 74
12. L'effet d'extrait d'Ephedra alata sur l'activité phagocytaire	Page 78
Conclusion et perspective	Page 81
Références bibliographiques	Page 83
Annexes.....	Page101

LISTE DES ABRÉVEATIONS

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxy ribonucléique

Con A : Concavaline A lectine

ConBr : Lectine de Canavalia brasiliensis

E.alata : Ephedra alata

ERO : espèce réactif de l'oxygène

Man: Mannose

MTs : métallothionéine

O₂ : Dioxygène

PBS : Phosphate Buffer Saline

R : rhésus

RL : Radicaux libres

SOD : Super oxyde dismutase

VIH : human immunodeficiency virus

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau 01 : les lectines et leurs applications.....	Page 1
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines.....	Page 3
Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines.....	Page 8
Tableau 04 : La classification structurale des lectines des plants.....	page 10
Tableau 05 : Les Lectines spécifiques des groupes sanguins.....	Page 22
Tableau 06 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment...	Page 50
Tableau 07 : L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait d'Opuntia ficus-indica(racine et raquette), Phoenix dactylifera L, Artemisia absinthium , Ephedra alata.....	Page 53
Tableau 08 : Activité de la limite d'hémagglutination d'Opuntia ficus-indica(racine et raquette), Phoenix dactylifera L, Artemisia absinthium , Ephedra alata.....	Page 55
Tableau 09 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'Opuntia ficus-indica(racine et raquette), Phoenix dactylifera L, Artemisia absinthium , Ephedra alata.....	Page 57
Tableau 10 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'Opuntia ficus-indica(racine et raquette), Phoenix dactylifera L, Artemisia absinthium , Ephedra alata.....	Page 59
Tableau 11 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des sucres simples.. ..	Page 60
Tableau 12 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par les glycoprotéines.....	Page 61
Tableau 13 : Les concentrations minimales en glucose, galactose provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait d'Artemisia absinthium.....	Page 61
Tableau 14 : Les concentrations minimales en glucose, galactose , mannose provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait d'Opuntia ficus-indica(Raquette).....	Page 62

Tableau 15 : Résultats du test des métaux avec *Opuntia ficus-indica*(racine et raquette), *Phoenix dactylifera* L, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.....Page 63

Tableau 16 : L'agglutination des hématies humaines (A,B,O,AB) par l'extrait brute d' *Opuntia ficus-indica*(racine et raquette), *Phoenix dactylifera* L, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.....Page 64

Tableau 17 : La Concentration des proteines dans l'extrait des lectines brut et purifiés d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette) ,*Phoenix dactylifera* ,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*Page 74

Tableau 18 : L'activité antioxydante des lectines d'*Opuntia ficus indica*(racine et raquette) ,*Phoenix dactylifera* ,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*.....Page 75

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

- Figure 01** : Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de canavaliensiformis en complexe avec le trimannosoïde.....Page 5
- Figure 02** : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique.....Page 6
- Figure 03** : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli.....Page 6
- Figure 04** : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.....Page 7
- Figure 05** : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T).....Page 11
- Figure 06** : Tétramère de la protéine ConM de Canavalia maritima complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6).....Page 12
- Figure 07** : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO.....Page 22
- Figure 08** : la plante d'Opuntia ficus-indica.....Page 23
- Figure 09** : Phoenix dactylifera L.....Page 25
- Figure 10** : Artemisia absinthium.....Page 27
- Figure 11** : Ephedra alata.....Page 29
- Figure 12** : Stress oxydant.....Page 31
- Figure 13** : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....Page 33
- Figure 14** : Réactions de la peroxydation lipidique.....Page 34
- Figure 15** : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire.....Page 36
- Figure 16** : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.....Page 37

Figure 17 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	Page 39
Figure 18 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique.....	Page 40
Figure 19 : représente la technique d'extraction de l'extrait brut.....	Page 45
Figure 20 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental de dosage de l'activité phagocytaire et l'index phagocytaire corrigé α	Page 51
Figure 21 : Filtration de l'extrait d' <i>Opuntia ficus indica</i> (racine)(A), <i>Phoenix dactylefira</i> (B), <i>Opuntia ficus indica</i> (raquette)(C), <i>Artemisia absinthium</i> (D), <i>Ephedra alata</i> (E) sur colonne échangeuse d'ions.....	Page 67
Figure 22 : Filtration de l'extrait d' <i>Opuntia ficus indica</i> (racine)(A), <i>Phoenix dactylefira</i> (B), <i>Opuntia ficus indica</i> (raquette)(C), <i>Artemisia absinthium</i> (D), <i>Ephedra alata</i> (E) sur colonne de sephadexe G25.....	Page 70
Figure 23 : Filtration de l'extrait d' <i>Opuntia ficus indica</i> (racine)(A), <i>Phoenix dactylefira</i> (B), <i>Opuntia ficus indica</i> (raquette)(C), <i>Artemisia absinthium</i> (D), <i>Ephedra alata</i> (E) sur colonne de sephadexe G75.....	Page 73
Figure 24 :Effet des lectines extraites d' <i>Ephedra alata</i> sur l'activité phagocytaire.....	Page 78
Figure 25 : : Effet des lectines extraites d' <i>Ephedra alata</i> sur la demi vie $t_{1/2}$ dans le sang	Page 79
Figure 26 : Effet des lectines extraites d' <i>Ephedra alata</i> sur l'index phagocytaire corrigé.....	Page 79

LISTE DES PHOTOS

Liste des photos

Photo 01 : représente les matériels végétales *Opuntia ficus-indica* les racines (A) et la raquette(B), *Phoenix dactylifera*(C), *Artemisia absinthium* (D) et *Ephedra alata* (E).....**page 44**

Photo 02 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d'*Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , d'*Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absinthium* (D) ; *Ephedra alata* (E)**page53**

Photo 03 : test de la limite d'hémagglutination d'*Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , d'*Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absinthium* (D) ; *Ephedra alata* (E)**page56**

Photo 04 : l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits d'*Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , d'*Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absinthium* (D) ; *Ephedra alata* (E)**page 57**

INTRODUCTION

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 plantes : *Opuntia ficus-indica*, *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*. 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 hémagglutination avec le sang des lapins.
- Etude l'effet de la température, pH et métaux sur l'activité de ces lectines.

Introduction

- 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.
- Etude l'effet de ces lectines sur l'activité immunitaire.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :
Généralités sur les
lectines

Chapitre I : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon, 1998**). 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» (**Liener et 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 très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (**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 (**Meite et al., 2006**). Bien qu'il existe des lectines thermorésistantes (**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	ConcanavallineA, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E.coli et toxine

	du choléra
Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectines animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

2. Historique

En 1888, P. H Stillmarka découvre la première lectine qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dopratt (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. Ehrlich 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 pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaleine 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 concanavaleine A par des saccharoses (**Sumner et Howell, 1936**).

En 1954, Boyd et Shapleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd et Shapleigh, 1954**). 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.

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

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel /Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de Ricinus communis toxicité de la graine de Croton triglium
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d'Abrus Precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd &Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a Hémagglutinines

1949	Liener	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectines
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
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' <i>Escherichia coli</i>

3. La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

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

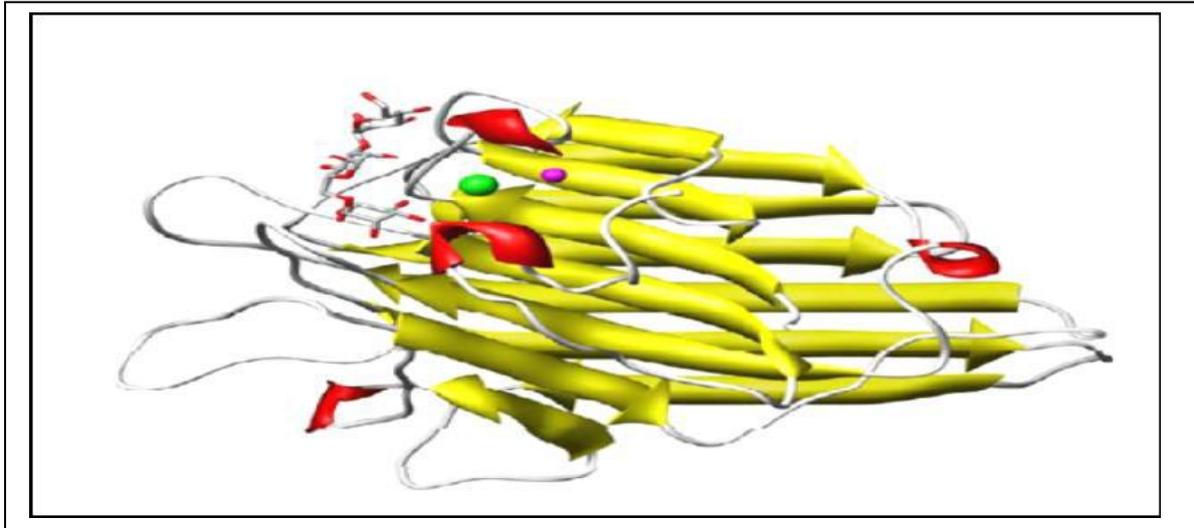


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le tri mannoside (**Lenka , 2006**).

La protéine est représenté 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**)

3.2. les lectines en mosaïques

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

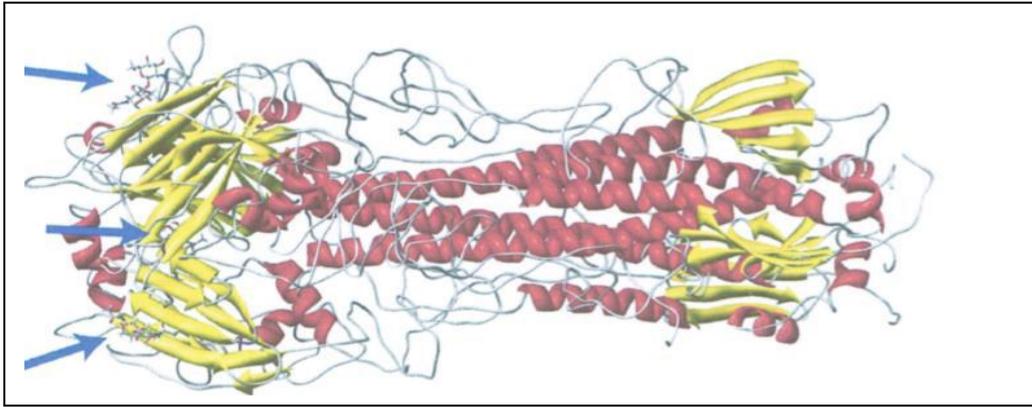


Figure 02: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

3.3. Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, 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).

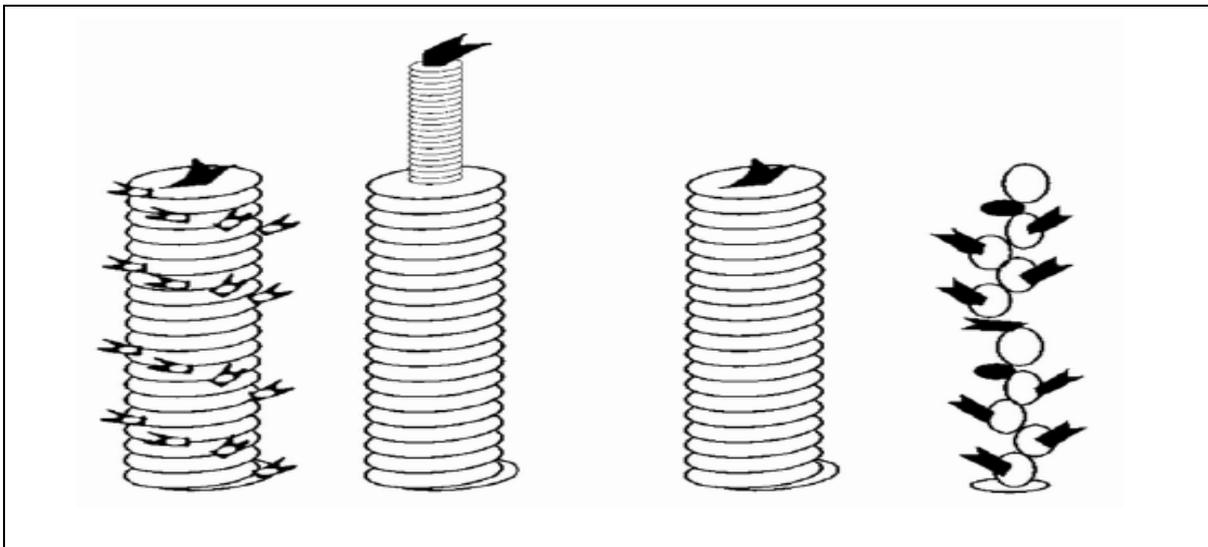


Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli*.

4. 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**).

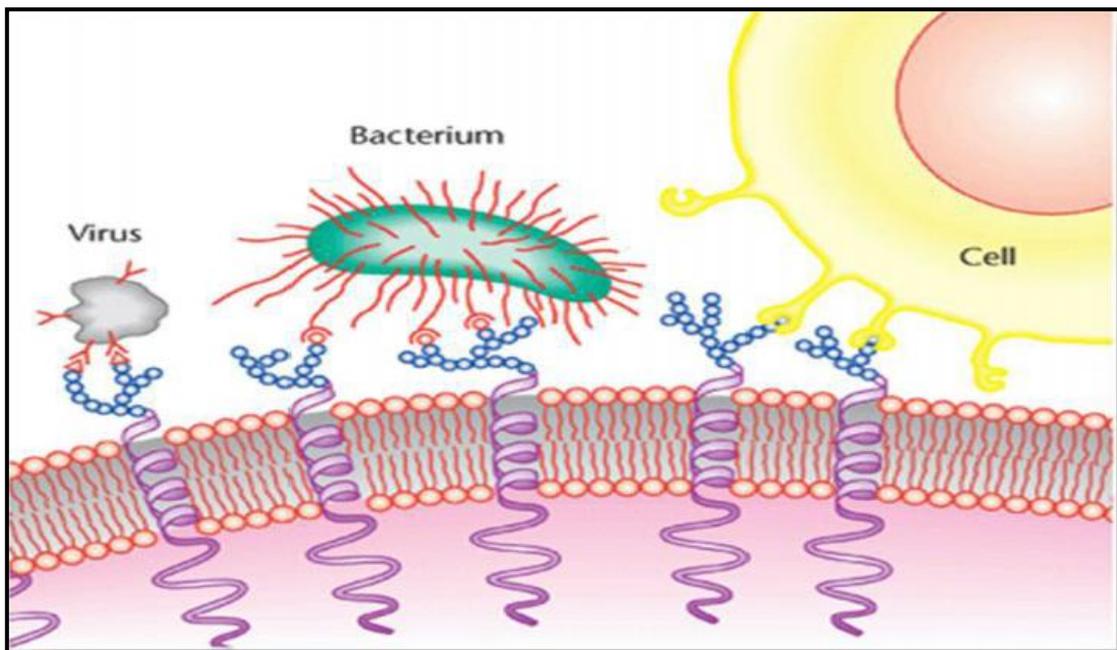


Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharon et Lis, 1993**)

5. 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 exclusivement des oligosaccharides (**Sharon, 2003**). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq

groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose (Gal)/N acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc) (**Lis and Sharon, 1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. 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 à lectines (**Renato et coll., 1991**)

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

6. La Classification des lectines

6.1. Chez les animaux

a) 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**).

b) Les lectines intracellulaires

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

6.2. 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'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans *et 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. Elles présentent la majorité des lectines de plantes (exemple: ConBr la lectine de *Canavalia brasiliensis*) (**Van Damme *et al.*, 1998**).

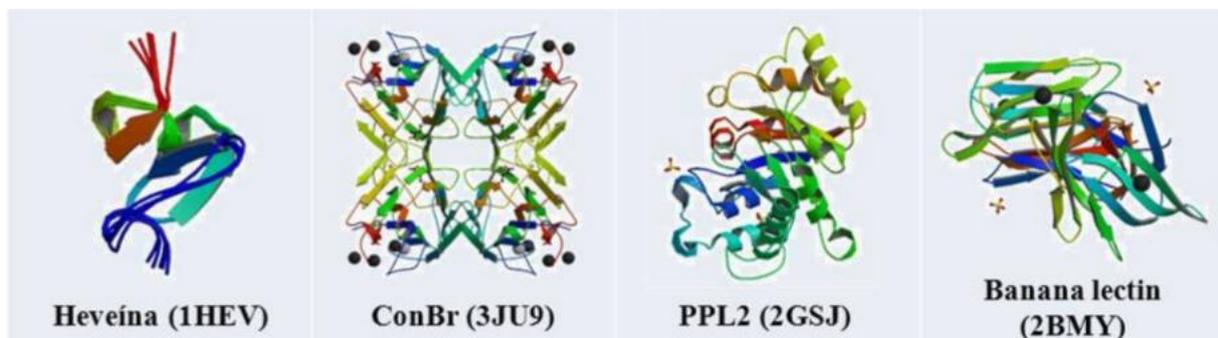
c) Les chimérolectines

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

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).



7. 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 *Entamoeba*

histolytica et *Entamoeba dispar*, on en rencontre même chez les animaux supérieurs, notamment chez l'homme où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (**Bouchara et Trouchin, 2003**).

7.1. 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 *sigles*.

- 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 Nacetyllactosamine (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 Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers et al., 2000**) (**Figure 05**).

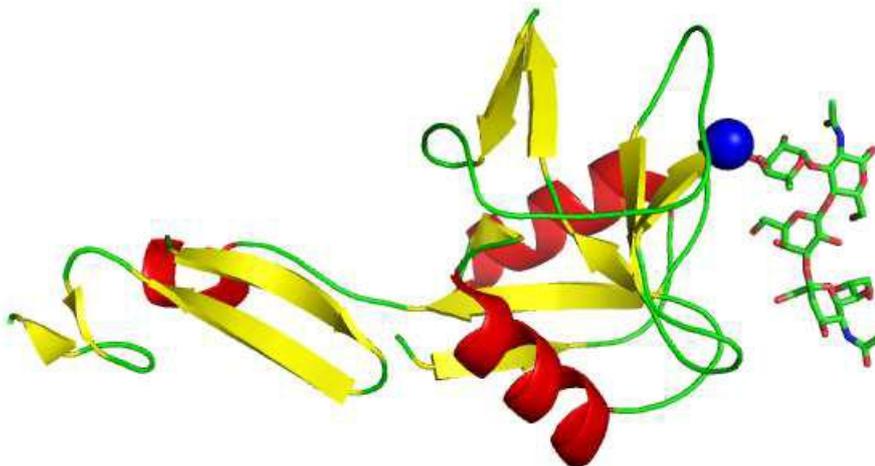


Figure 05 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers et al., 2000**). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- Les *Sigles*, 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 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**)

7.2. 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**)

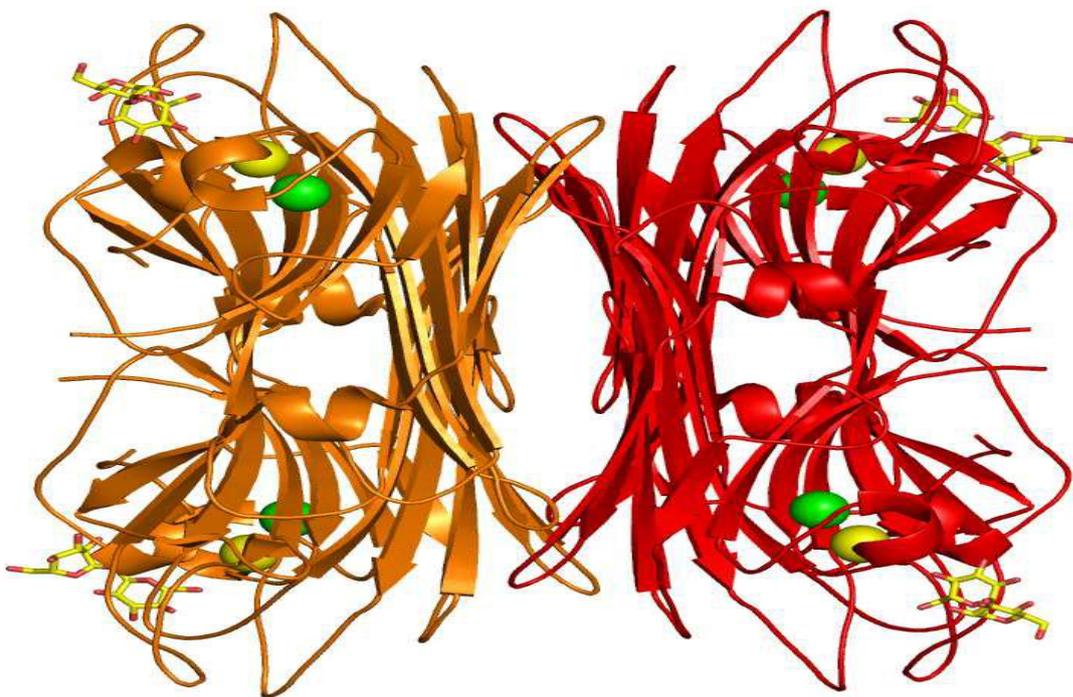


Figure 06 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (**Delatorre, *et al.*, 2006**). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets

La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthus nivalis* 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 *Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée avec le Gal α 1-3GalNAc (**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 and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius, 2001**).

7.3. 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 par 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 hôtes. 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-acétylneuraminique (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 histolytica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes via un mécanisme dépendant du contact. Cette action implique la protéine de surface amibienne dénommée le Gal / Gal Nac lectine se lie au galactose et au N-acétylgalactosamine permettant l'adhérence des amibes aux cellules hôtes (**Boettner et al., 2002**). Les lectines des champignons ont

principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (She *et al.*, 1998 ; Sze *et al.*, 2004).

8.Fonction biologique des lectines

8.1.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 (mitogenicité) 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 a sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (Etzler, 1986).

8.2.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 (Rydz *et 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).

9.Propriétés des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

9.1.L'interaction lectine–glucide

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

9.2.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**).

9.3.L'activités mitogène

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

9.4.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**).

9.5. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

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**).

9.6. La propriété antivirales

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 tortifolious* (**Lopez, 2003**).

9.7. 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 de type C résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al., 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al., 2012 ; Huang et al., 2014 ; Xu et al., 2014**)

9.8. 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**).

10. L'intérêt des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements 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.

10.1 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 une enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...). Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (**DOLE.A.et LINDEBERG . S. ,2005**)

10.2. Dans le domaine biomédical

a) *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.

b) *Immunologie*

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être 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 immunothérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

c) 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**).

d) Cancérologie

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

10.3. Dans le domaine agronomique

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

11. Le rôle des lectines dans l'immunité

Les lectines sont utilisées en immunologie par Paul Ehrlich au début des années 1890, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulés par les lectines *in vitro* ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent *in vivo* (**Sharon, 1983**). Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la 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 initiée par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet de l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**). La lectine liant le mannose (mannose bindinglectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (**Roos *et al.*, 2007**). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (**Kawsar *et al.*, 2010**). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytes. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytes grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les 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 : Système sanguin

Chapitre II : Le système sanguin

Les groupes sanguins

1. 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 découvrit 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).

2. 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).

3. 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**).

4. 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 oligosacchridique 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 07**)

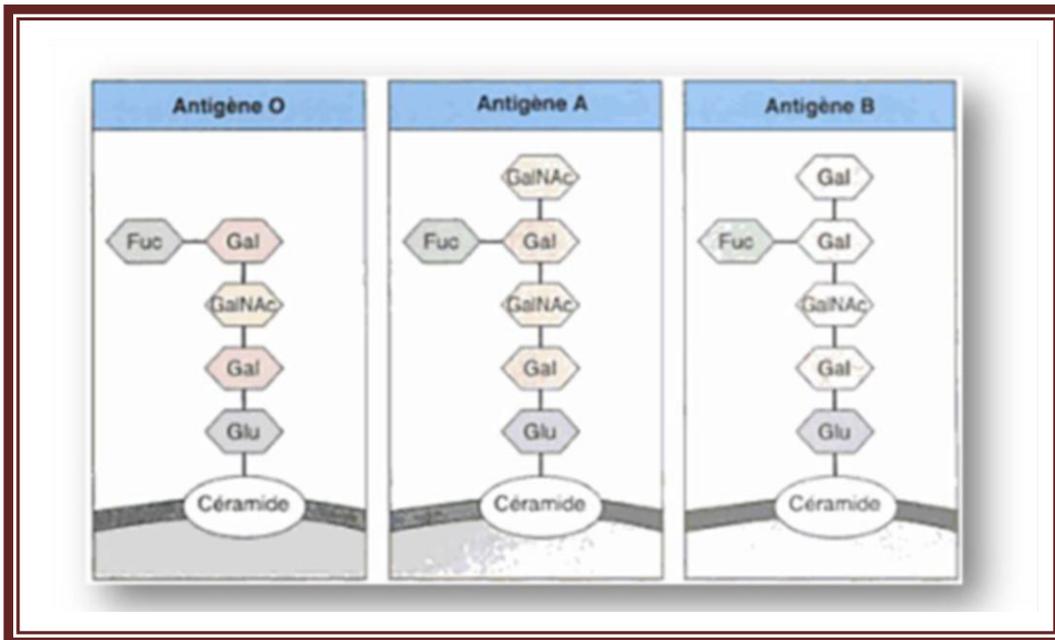


Figure 07 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (Parham,2000).

5. 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	Goker <i>et al</i> , 2008

Chapitre III :
généralités sur les
plantes

Chapitre III : Généralités sur les plantes

1. Figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*)1.1. La description botanique d'*Opuntia ficus-indica*

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique (Orwa *et al.*,2009). Sa distribution géographique est très large: Mexique, Sicile, Chili, Brésil, Turquie, Corée, Argentine et Afrique du Nord (Barbera *et al.*,1992 ; Nerd et Mizrahi, 1994). Il est par essence développé sur la partie Ouest de la Méditerranée : Sud de l'Espagne, le Portugal, et l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie et Maroc) (Bensalem *et al.*, 2002 ; Arba, 2009). Le figuier de Barbarie est une plante arborescente robuste de 3 à 5 m de haut, possède un tronc épais et ligneux et une organisation en articles aplatis, de forme elliptique ou ovoïdale de couleur vert-mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm, une largeur de 15 à 30 cm et une épaisseur de 1.5 à 3 cm appelés cladodes ou raquettes (Figure 08) (Reyes-Aguero *et al.*, 2006 ; Neffar S, 2012).



Figure 08 : la plante d'*Opuntia ficus-indica*

1.2. La Classification scientifique de '*Opuntia ficus-indica*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre	<i>Caryophyllales</i>
Famille	<i>Cactaceae</i>
Sous famille	<i>opuntioideae</i>
Tribu	<i>opuntieae</i>
Genre	<i>Opuntia</i>
Espèce	<i>ficus-indica(L)</i>

1.3. Les propriétés médicinales d'*Opuntia ficus indica*

Le figuier de barbarie appartient depuis toujours aux plantes médicinales les plus utilisées. La recherche médicale moderne redécouvre avec un intérêt grandissant la plante et ses propriétés. Elle étudie les molécules actives qui la composent et lui permettent de lutter efficacement contre quelques-unes des affections les plus graves de notre temps.

- ✚ Velasquez signale son utilisation par les Indiens dans le traitement de la tuberculose pulmonaire (**Velasquez ,1998**)
- ✚ réduire le taux de sucre et de cholestérol dans le sang (**Fernandez et al., 1990**)
- ✚ utilisée comme régulant diurétique et comme remède au dysfonctionnement de la prostate (**Pimienta Barrios et al., 1993**)
- ✚ Cette plante a aussi un effet comme remède aux douleurs gastro-intestinales, l'angoisse, l'artériosclérose, la spasmophilie, le stress, aux brûlures et coups de soleil.
- ✚ L'huile essentielle des graines des fruits du cactus sont riches en acides gras polyinsaturés, en stérols et en vitamines, elle est utilisée comme antiride naturel et pour la fabrication des crèmes dermiques antirides (**Coskuner et Tekin, 2003 ;Ennouri et al., 2005**).

2. LES DATTES (*Phoenix dactylifera L.*)

2.1. La description botanique de *Phoenix dactylifera L.*

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. Phoenix dérivé de Phoenix, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin dactylus, dérivant du grec dactylos, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin fero, porté, en référence aux fruits (**Djerbi, 1994**). Le fruit du Palmier Dattier est une baie appelée « Datte, Tmar en arabe », contenant une seule graine « noyau ». Elle est de forme généralement allongée, oblongue ou arrondie, ovoïde, parfois sphérique. Cas de la variété TANTEBOUCHET, elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair (**Djouab, 2007**) .La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée de trois enveloppes (péricarpe, mésocarpe et endocarpe) (**Espirad, 2002**) . Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi, 1994**).



Figure 09 : *Phoenix dactylifera L.*

2.2. La Classification scientifique de *Phoenix dactylifera L.*

La classification botanique du palmier dattier donnée par **Djerbi, (1994)** est la suivante:

Groupe	<i>Spadiciflores</i>
Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Monocotylédones</i>
Ordre	<i>Palmale</i>
Famille	<i>Palmacées</i>
Sous famille	<i>Coryphoidées</i>
Tribu	<i>Phoenicées</i>
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce.	<i>Dactyliféra L.</i>

2.3. Les propriétés médicinales de *Phoenix dactylifera L.*

- ✚ Riches en fibres, les dattes facilitent le transit intestinal et exercent un rôle préventif des cancers colorectaux, des appendicites, de la diverticulose, des varices et des hémorroïdes (**Albert, 1998 ; Jaccot et Campillo, 2003**).
- ✚ Ils ont également un effet hypocholestérolémiant (**Albert, 1998 ; Jaccot et Campillo, 2003**).
- ✚ Energétique et riche en minéraux, le fruit permet de lutter contre l'anémie et les déminéralisations, il est donc recommandé aux femmes qui allaitent (**Benchelah et Maka, 2008**).
- ✚ Les dattes pilées dans de l'eau soignent les hémorroïdes, les constipations et aussi l'ictère (jaunisse) (**Benchelah et Maka, 2008**).
- ✚ Quant aux diarrhées, elles sont traitées par les dattes vertes tonifiantes.
- ✚ Calmantes sous forme de sirop très concentré, le rob, cette préparation apaise et endort les enfants (**Benchelah et Maka, 2008**).
- ✚ Elle est aussi utilisée pour les maladies nerveuses et dans les affections broncho-pulmonaires (**Benchelah et Maka, 2008**).
- ✚ En décoction ou en infusion, les dattes traitent les rhumes. En gargarisme, elles soignent les maux de gorge (**Benchelah et Maka, 2008**).

3. La grande absinthe (*Artemisia absinthium* L.)

3.1. La description botanique d'*Artemisia absinthium*

L'espèce *A.absinthium* communément appelée absinthe appartient au genre *Artemisia* et à la famille des Composés ou Astéracée. C'est une plante vivace ou bisannuelle. Elle est d'une hauteur de 40 à 70 cm, elle peut atteindre 1m en certain endroit. Elle est très aromatique, sa saveur est fortement amère, les tiges sont rameuses, herbacées, cylindriques, et de couleur blanchâtre. Les feuilles sont ponctuées et plus ou moins pubescentes, elles sont de couleur grise verdâtre à la face supérieure et blanchâtre à la face inférieure. Les fleurs sont homogènes,tubuleuses,jaunes ou blanches et possèdent une corolle glabre ou velue. Les fruits sont des akènes très petits, non glanduleux (Ait Youssef,2006 ;Lucienne,2007).



Figure 10 : *Artemisia absinthium*

3.2. La Classification scientifique d'*Artemisia absinthium*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheonbionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèces	<i>Artemisia absinthium</i>

3.3. Les propriétés médicinales d'*Artemisia absinthium*

- ✚ La plante appelée communément « chiba » est employée en Algérie, en usage interne, comme remède digestif (**Vican, 2001 ; Basta et al., 2006**).
- ✚ la tige feuillée est utilisée au Maroc en usage interne sous forme d'infusion, comme remède antispasmodique et comme remède cholagogue (**Vican, 2001 ; Basta et al., 2006**).
- ✚ Cette plante possède d'autres propriétés thérapeutiques, parmi ces dernières on peut citer: Des propriétés antitussives, antigrippales, anti-diarrhéiques, antihelminthique, et emménagogue (**Vican, 2001 ; Basta et al., 2006**).
- ✚ Les racines de cette plante sont utilisées en décoction pour traiter l'ulcère gastrique (**Ait Youssef, 2006 ; Lucienne, 2007**).
- ✚ Le décocté de la plante entière est recommandé pour combattre la syphilis, l'hypertension et le cancer.
- ✚ Des études menées au Pakistan ont conclu, que l'absinthe possède une activité hépato protectrice élevée grâce à son action inhibitrice sur les enzymes responsables des métabolites dans le foie (**Vican, 2001**).

4. La plante Alenda (*Ephedra alata*)

4.1. La Description botanique d' *Ephedra alata*

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephedra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009) . L'espèce *Ephedra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Egypte et l'Arabie (Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991). Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes, est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre. Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Derbel *et al.*, 2010).



Figure 11: *Ephedra alata*

4.2. La Classification scientifique d' *Ephedra alata*

Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Gymnospermes</i>
Classe	<i>Gnetopsida</i>
Ordre	<i>Ephedrales</i>
Famille	<i>Ephedraceae</i>
Genre	<i>Ephedra</i>
Espèce	<i>Ephedra alata</i>
Sous espèce	<i>Ephedra alata alenda</i>

4.3. Les Propriétés médicinales d' *Ephedra alata*

- ✚ En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**).
- ✚ En Arabie Saoudite, *Ephedra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2012**).
- ✚ Au Maroc, l'*Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**).
- ✚ En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2003**).
- ✚ Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (**Abou rashed et al., 2003**).

***Chapitre IV : Le stress
oxydant***

Le stress oxydant

1. 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 et al., 2008**).

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (**figure 12**). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des premiers » (**Baskin et salem, 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 et al., 2008**) et à des dégâts cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999 ; Abuja et Albertini, 2001**)».

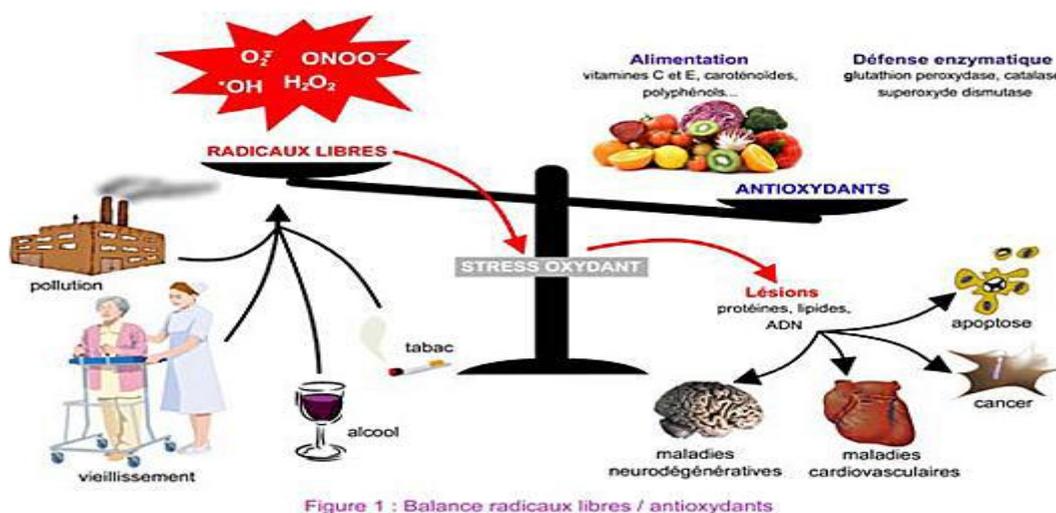


Figure 12 : Stress oxydant (**Durackova, 2008**)

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 13**) (**Favier, 1997**).

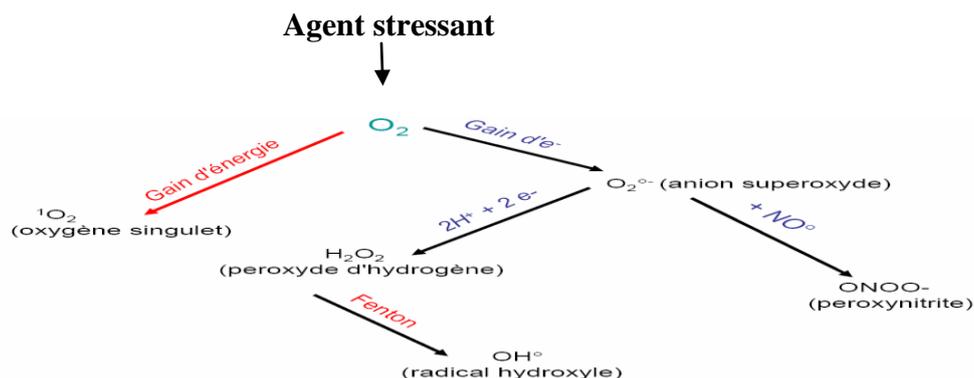


Figure 13 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

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).

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 14). 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).

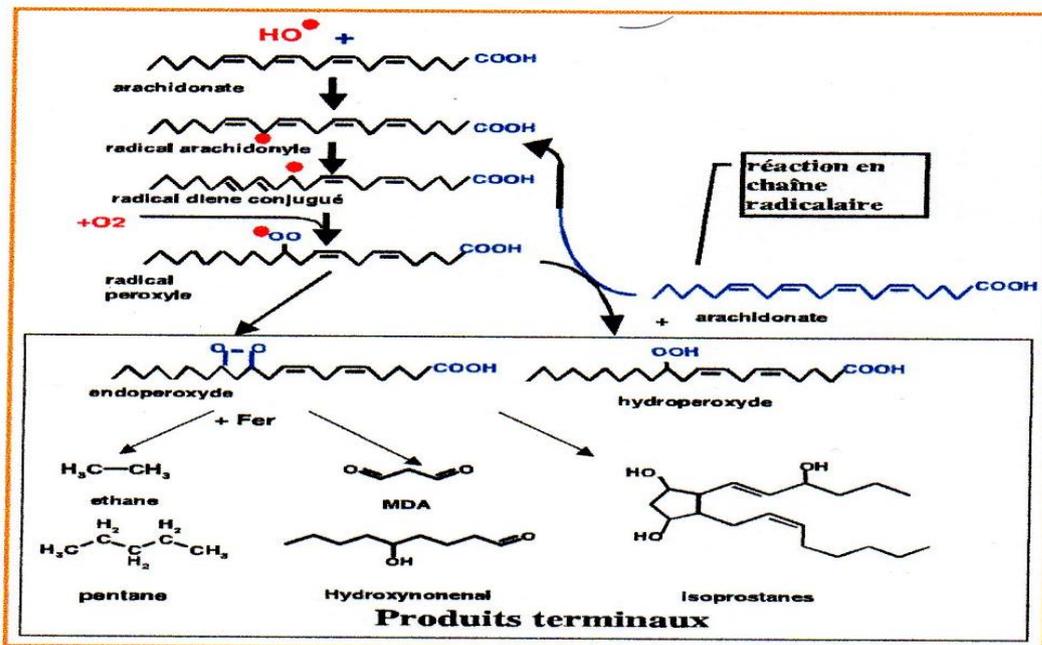


Figure14: Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

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 lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (**Levine, 2002**) (**figure 15**). Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (**Sen, 2001**). Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (**Welch, 1992**). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (**Essig and Nosek, 1997**).

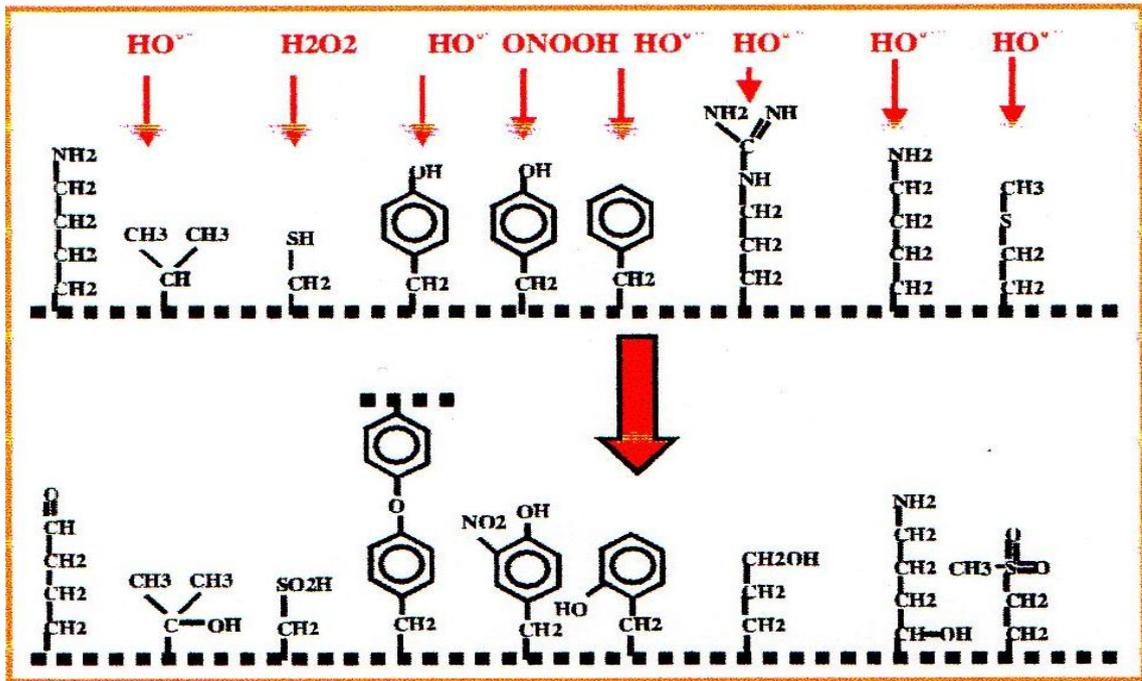


Figure 15 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

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 *et al.*, 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 16) (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 *et al.*, 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).

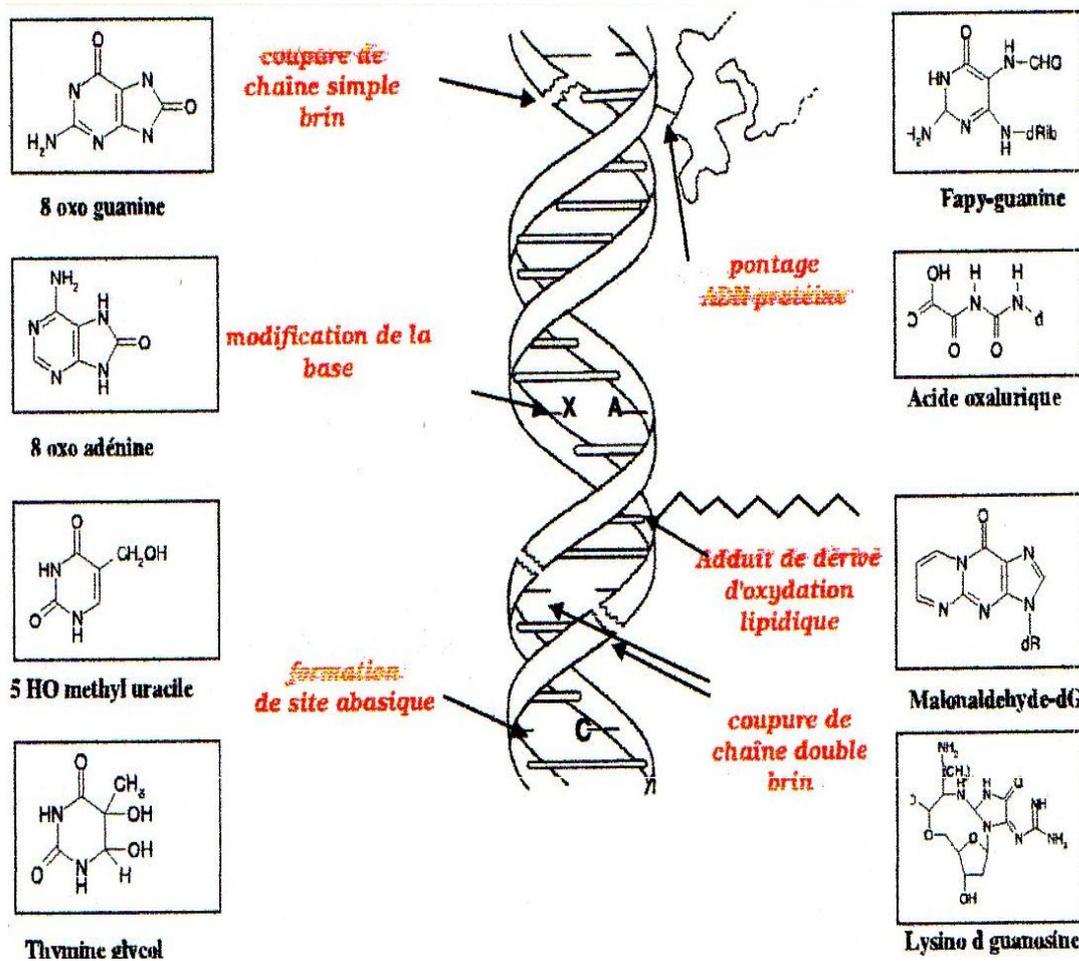


Figure 16 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

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'hyper oxygénation, 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 (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2001 ; Sohal *et al.*, 2002 ; Delattre, 2005).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neuro dégénératives 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 , 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 *et al.*, 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 17**). 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**).

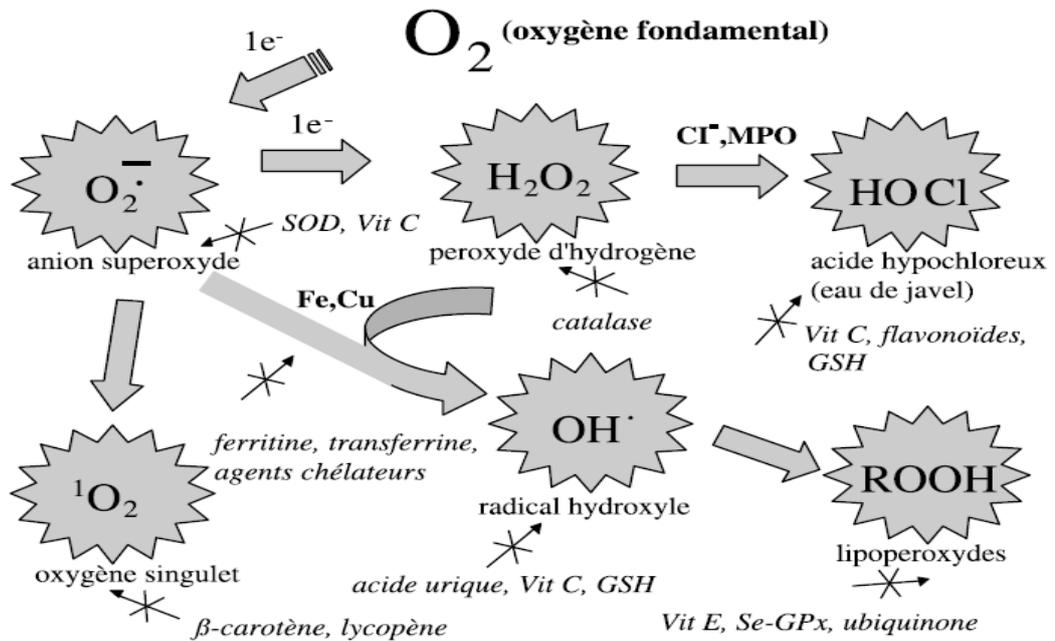


Figure 17 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (Milbury et Richer, 2008).

5.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) la 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).

a) 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).

b) 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).

c) 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 :

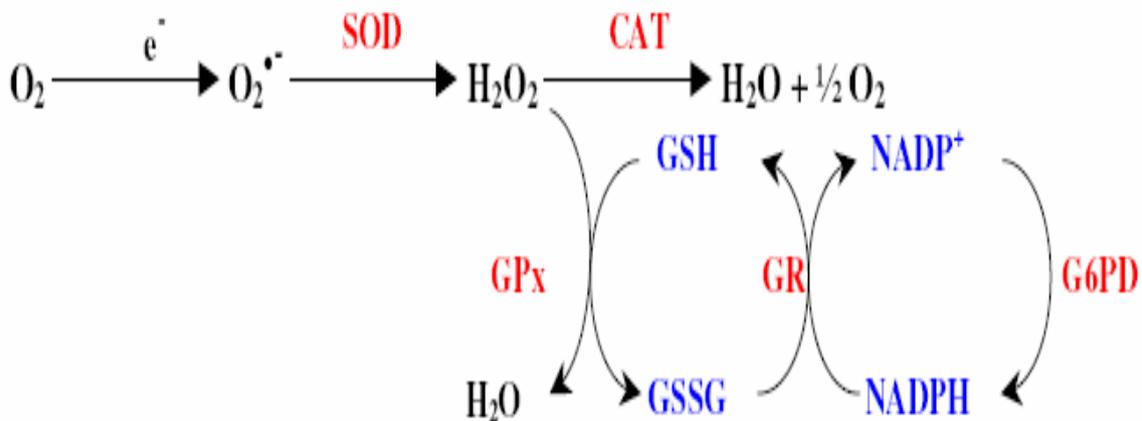


Figure 18 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (Piquet et herbuterne, 2007).

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).

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' H_2O_2 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 RO_2 (**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 déhydro ascorbique, 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 gluco corticoïdes et les radiations ionisantes (**Cherian, 1995**). Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des 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**).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels et méthodes des tests phytochimiques

1.1. Matériel végétale

Notre étude a été réalisée sur quatre plantes médicinales :

- *Opuntia ficus-indica* : les racines et les raquettes
- *Phoenix dactylifera* : les noyaux
- *Artemisia absinthium*
- *Ephedra alata*





Photo 01 : représente les matériels végétales *Opuntia ficus-indica* les racines (A) et la raquette(B), *Phoenix dactylifera*(C), *Artemisia absinthium* (D) et *Ephedra alata* (E).

Les racines et les raquettes d'*Opuntia ficus-indica* ont été collecté a partir de la région de el- djedour constantine au mois de février 2016, Pour *Phoenix dactylifera* elle est récolté à partir de la région de Biskra, Alors que *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* elles ont été collecté à partir de la région de oued souf.

1.2. Les méthodes

1.2.1.La Préparation des plantes

Pour *Opuntia ficus-indica* les racines et la raquette ont été rincés à l'eau et séchées à l'air pendant 7 jours ; ensuite elles ont été coupées minutieusement et broyées dans un mortier afin d'obtenir une poudre qui a été conservé dans une boite fermé. Ainssi que pour *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*, les plantes Ont été séchées puis broyés dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre qui a été ensuite conservé dans un flacon fermé. Alors que pour *Phoenix dactylifera* les noyaux ont été broyés dans un mortier afin d'obtenir des petits morceaux qui ont été par la suite broyés une deuxième fois dans un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Enfin cette dernière a été conservée dans une boite fermée.

- **L'Extraction des plantes**

- **Le Principe**

Matériels et méthodes

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

➤ La Technique d'extraction

9g des poudre obtenues à partir des quatre plantes ont été mises dans des flacons contenant chaqu' 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 tests souhaités (**Figure 19**).

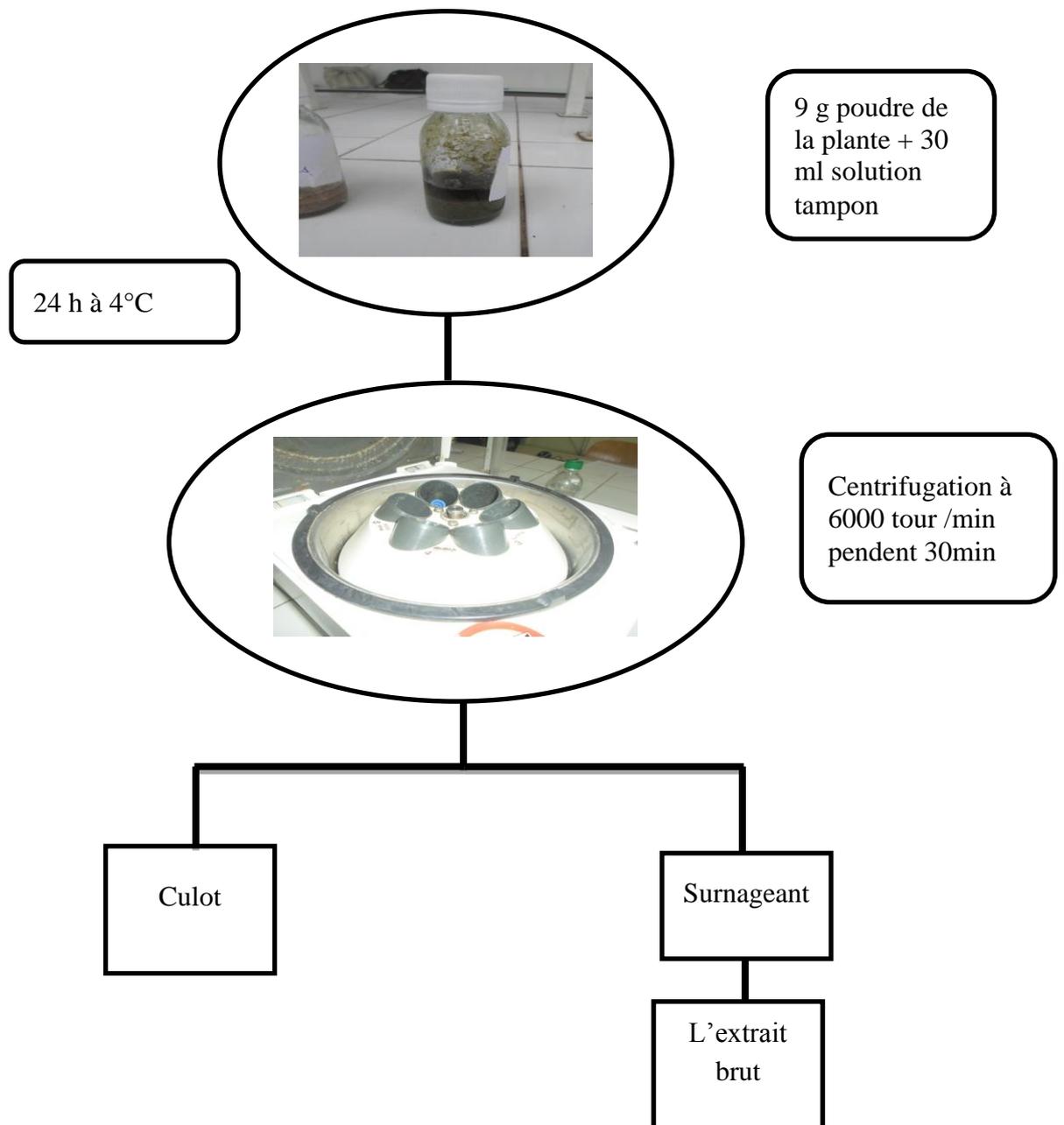


Figure 19 : représente la technique d'extraction de l'extrait brut.

1.2.2. Le 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

- **La Préparation des hématies à 3%**

Le sang humain est collecté à partir de laboratoire d'analyse médicale polyclinique Dr hocine benkadri et laboratoire d'E.H.S chirurgie cardiaque Djeghri Mokhtar Constantine, le sang du lapin est collecté à partir des lapins 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 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.

- **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.

- **La dilution des hématies**

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

- **La 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'oeil nu.

1.2.3. La limite d'hémagglutination

Matériels et méthodes

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brute (*d'Opuntia ficus-indica*, *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*) 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).

1.2.4. 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.

1.2.5. L'effet du pH sur l'hémagglutination

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.

1.2.6. Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

Dans chaque puits d'une microplaque 50 µl de l'extrait a été déposé , tout en ajoutant 50 µl de solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de NaCl 0,9%) (Xylitol, Fucose , Melibiose , Rhamnose , Glucose , Galactose , Mannose , Lactose , manitol , saccharose , rhamnose, raffinose , sorbose , fétuine, caséine) . 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.

1.2.7. Le 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.

1.2.8. Le Test des métaux (oligoéléments)

Premièrement, l'EDTA est ajouté à l'extrait d'*Opuntia ficus-indica* , *phoenix dactylifera* L , *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata* (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) (**Annexe 01**).enfin 50 µl de sang de lapin sont ajoutés au mélange, la lecture a été faite à l'œil nu après 1h d'incubation .

1.2.9. 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.

1.2.10. La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions

Le surnageant de l'extrait brute a été récupéré puis réparti en trois fraction, 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 arrêtée. Ensuite, une 2^{ème} élution a été effectués par l'NaCl a une concentration croissante (0,1M ; 0,2M ; 0,3M) (**Annexe 01**). 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 récupérés ont été testés sur les hématies du lapin, pour assurer que l'activité hémagglutinante est améliorée.

1.2.11. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75 et G25

➤ La préparation de la colonne de Sephadex G75 et G25

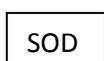
4 g de Sephadex G75 et G25 ont été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2). Le mélange a été incubé pendant 48 h à température ambiante. Puis il a été coulé dans une colonne. Le surnageant de l'extrait brute de notre plantes a été versé lentement dans la colonne Sephadex G25 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.

✚ Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

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



✚ Effet scavenger du radical DPPH in vitro

Selon le protocole décrit par Kirby *et al* (2005). Dans ce test les antioxydant réduisent le diphényl picryl-hydrayl 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 (Sanchez, 2002) (Annexe 02).

✚ Dosage de l'activité de fer ferrique

Matériels et méthodes

Le dosage de l'activité de fer ferrique est réalisé selon la méthode de Yildirim *et al* (2000) (Annexe 02).

Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) (Annexe 02).

2. Matériels et méthodes des tests biologiques

L'objectif de cette partie a été focalisé sur l'étude de l'effet immunomodulateur de lectine extraite par la plante *Ephedra alata*.

2.1. Matériel biologique et conditions d'élevage

L'étude de l'activité phagocytaire a été effectuée sur des souris ayant un poids entre 29 et 35 g , L'élevage des animaux a été réalisé dans des cages au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine, dans des bonnes conditions d'hygiène à une température ambiante de 25°C . Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau

Tableau 06 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al.*, 1989).

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

2.2. Le Traitement des souris

Matériels et méthodes

La figure 20 illustre les différentes étapes du protocole expérimental :

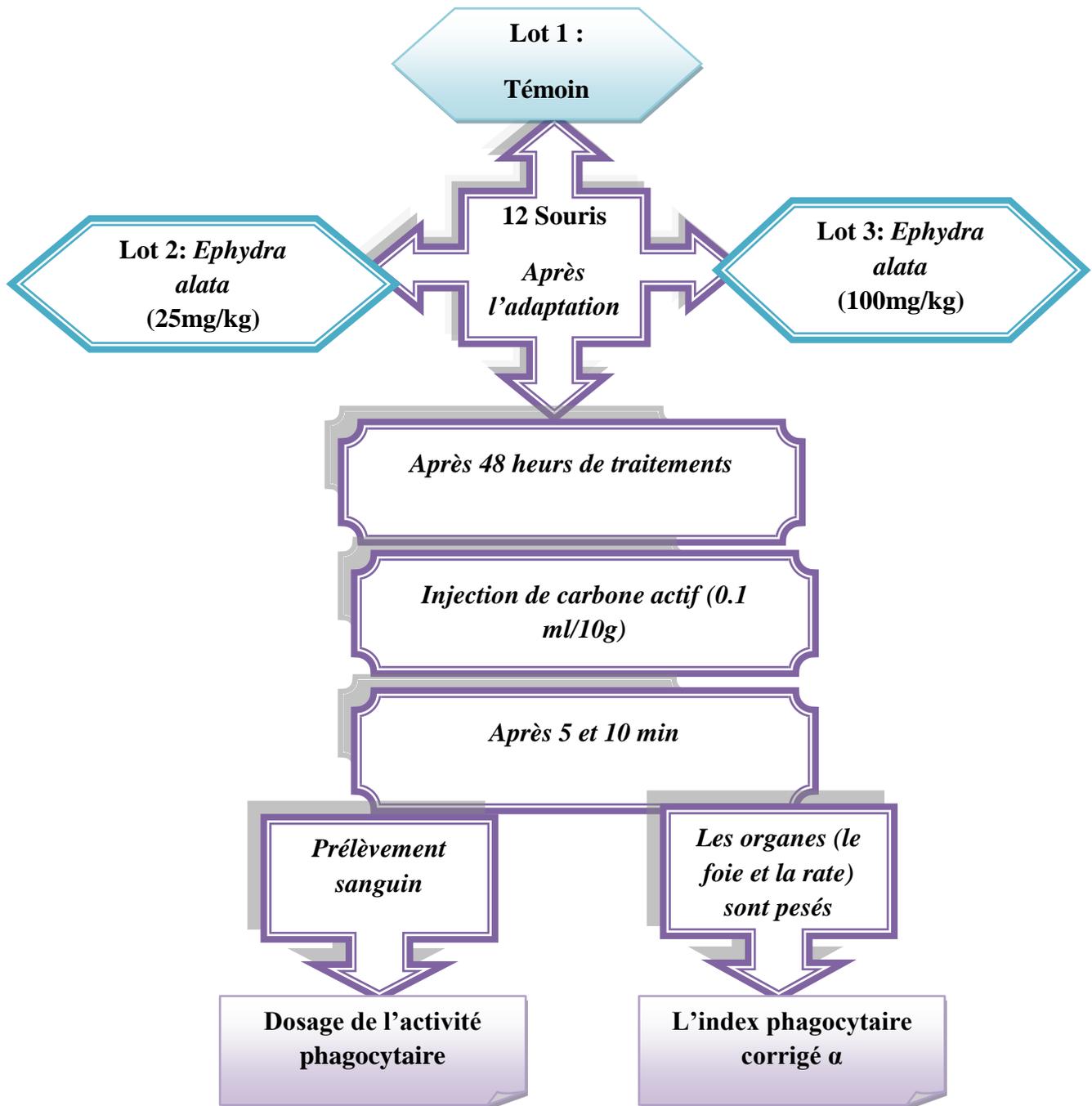


Figure 20: Schéma récapitulatif du protocole expérimental de dosage de l'activité phagocytaire et l'index phagocytaire corrigé α .

Matériels et méthodes

L'activité phagocytaire a été exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure toutes les fonctions de l'ensemble des cellules de système réticulo-endothélial au contact du sang circulant et par l'index phagocytaire corrigé α qui exprime cette activité par unité de poids des organes actifs : le foie et la rate. Le taux de clairance a été exprimé par la période de demi-vie du carbone dans le sang ($t_{1/2}$, min), permet de calculer la vitesse de disparition du carbone du sang. Les activités sont calculées d'après les formules de (Biozzi *et al.*, 1953).

$$K = \frac{\ln OD_1 - \ln OD_2}{t_2 - t_1}, \quad t_{1/2} = \frac{0.963}{k} \quad \alpha = \sqrt[3]{K} \frac{\text{les poids du corps}}{\text{le poids (le foie + la rate)}}$$

Où DO1 et DO2 sont les densités optiques à des moments t1 et t2 respectivement.

3. Analyse statistique

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

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

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

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

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

1. Le test d'héماغglutination

le tableau 07 présente l'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de notre plantes

Tableau 07: L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait d'*Opuntia ficus-indica*, *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium*, *Ephedra alata*.

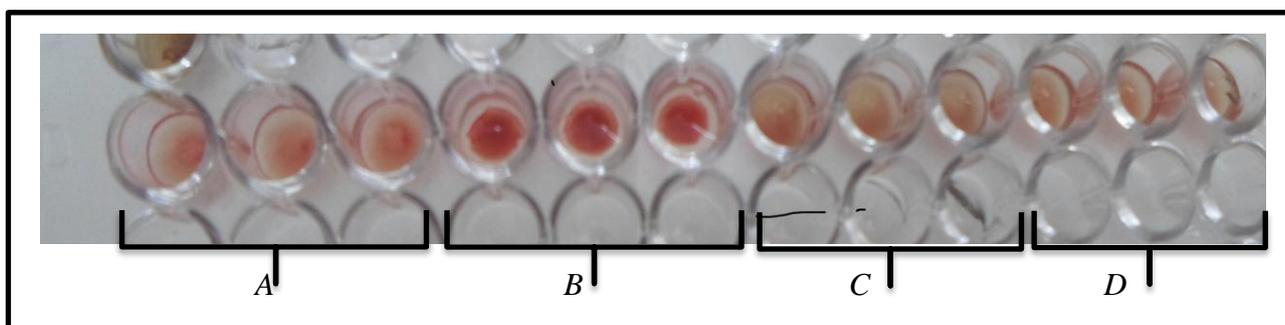
Plante	Test d'agglutination
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	+++
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	++
<i>Phoenix dactylifera L</i>	+++
<i>Artemisia absinthium</i>	+++
<i>Ephedra alata</i>	+++

+ : faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : très forte agglutination.

L'extrait d'*Opuntia ficus indica*(racine), *phoenix dactylifera L*; *Artemisia absinthium*; *Ephedra alata* montre une très forte agglutination vis-à-vis les hématies du lapin par contre l'extrait d'*Opuntia ficus indica* (Raquette) montre une forte agglutination. Cette agglutination a été observée à l'œil nu ce qui prouve que notre plantes contient des lectines, en général l'interaction entre les lectines et les hématies se manifeste lors du dépôt des lectines au niveau du puits contenant les globules rouges, ces derniers vont sédimenter au niveau du puits dès lors dépôt et former un amas homogène sous forme d'une phase gélatineuse; c'est le phénomène d'héماغglutination (**photo 02**).



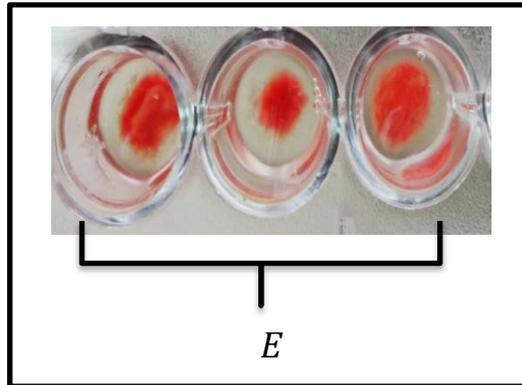


Photo 02 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait d'*Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , d'*Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absintium* (D) ; *Ephedra alata* (E) .

Le potentiel d'hémagglutination des lectines a été étudié en utilisant des érythrocytes natifs de lapin ce qui a montré une bonne hémagglutination. Ces 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). par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que *Sinapis alba* et *Brassica fruticulosa* (Deeksha *et al.*, 2015) .

2. La limite d'hémagglutination

La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination

Résultats et discussion

Tableau 08: Activité de la limite d'hémagglutination d'*Opuntia ficus-indica*, *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium*, *Ephedra alata*.

dillution extrait	dillution											
	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>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phoenix dactylifera L</i>	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
<i>Artemisia absinthium</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ephedra alata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

dillution extrait	dillution	
	1/8192	1/16384
<i>Ephedra alata</i>	+	-

+++ : Très forte agglutination

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination

_ : Absence d'agglutination

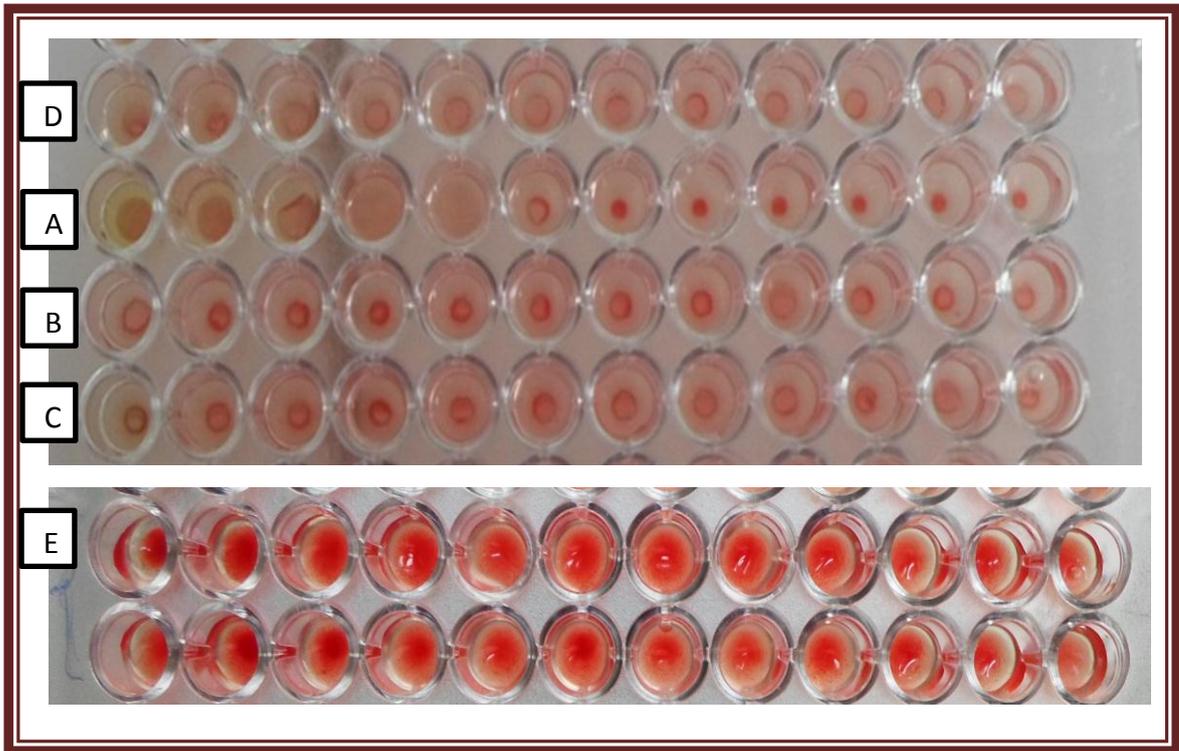


Photo 03 : test de la limite d'hémagglutination d'*Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , d'*Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absinthium* (D) ; *Ephedra alata* (E) .

Nos résultats ont montré que l'activité hémagglutinante des extraits d'*Opuntia ficus-indica* (racine et raquette) , *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata* a été de 1 : 11 (2048 UH. ml⁻¹) , 1 :3 (8 UH. ml⁻¹) , 1 :4 (16 UH. ml⁻¹) , 1 :13 (8192 UH. ml⁻¹) respectivement ; tandis que l'extrait de *Phoenix dactylifera* a une activité hémagglutinante de 1 :7 (128 UH. ml⁻¹) ce résultat est similaire à *Terfezia bouderei* dont la concentration a été (128 UH. ml⁻¹) (Zitouni *et al.*, 2014) .

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

Résultats et discussion

Tableau 09: L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'*Opuntia ficus-indica*(racine et raquette), *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.

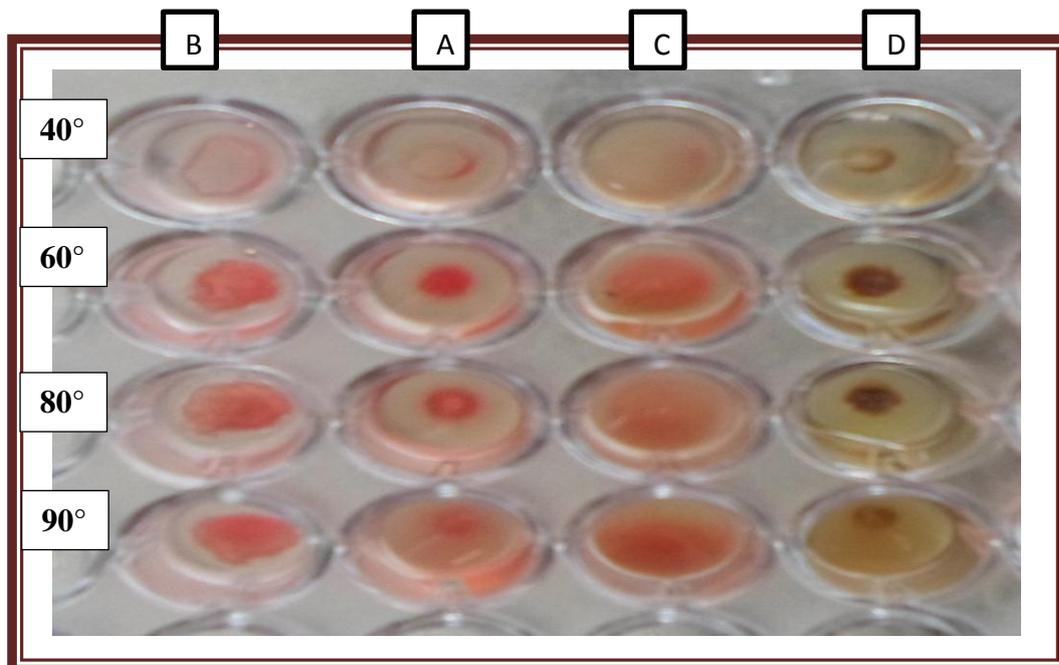
Température \ Extrait	40°C	60°C	80°C	90°C
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	++	+	-	-
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	+++	+++	+++	+++
<i>Phoenix dactylifera L</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Artemisia absinthium</i>	++	+	-	-
<i>Ephedra alata</i>	+++	+++	+++	+++

+++ :très forte agglutination.

++ :Forte agglutination.

+ :Faible agglutination .

- :Absence d'agglutination.



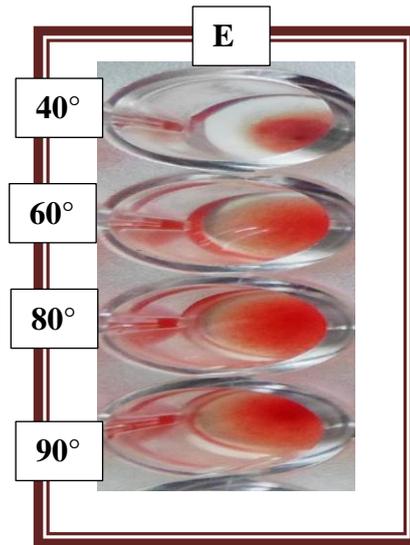


Photo 04 : l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits *d'Opuntia ficus-indica* (racine :A) , *Phoenix dactylifera* (B) , *d'Opuntia ficus-indica* (raquette : C) , *Artemisia absintium* (D) ; *Ephedra alata* (E) .

En incubant nos extraits à différente température 40,60,80,90°C ,celle *d'Opuntia ficus indica*(Raquette), *Phoenix dactylifera* ,*Ephedra alata* présentent une résistance allant jusqu'à 90°C , 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) ; cependant les lectines *d'opuntia ficus –indica* (racine) et *Artemisia absintium* sont dénaturées dans des température plus faible ,c'est le cas de lectine de *Phaseolus vulgaris* qui reste native à 60°C , avec une perte totale d'activité à 80°C (Andrew *et al.*, 2014).

4. L'effet du pH sur l'hémagglutination

Résultats et discussion

Tableau 10 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *d'Opuntia ficus-indica*, *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.

PH \ Extrait	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
<i>Phoenix dactylifera L</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Artemisia absinthium</i>	-	-	+++	+++	+++	-	+++	+	+	+++	+++	+++
<i>Ephedra alata</i>	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ :Très forte agglutination .

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.

L'activité d'hémagglutination des lectines *d'opuntia ficus indica*(racine) est stables dans un intervalle allant de [7 à 11] alors qu'elle est nulle de [1 à 6] ,ainsi à pH 12 , par contre les lectines de *Ruta graveolems* perdent l'activité à pH de 1 à 3 (Necib *et al.*, 2015) ; pour *Opuntia ficus indica* (raquette) l'activité hémagglutinante est stable dans une gamme de pH de [2 à 7] .

L'extrait de *Phoenix dactylifera* reste stable dans une large gamme du pH de [2 à 12] , avec une perte totale d'activité à pH 1 ce qui est en accord avec celle trouvé avec la lectine de *Pteroclatiella capillacea* et *Cyperus rotundus* (Necib *et al.*, 2015) ; tandis que les lectines *d'Artemisia absinthium* sont stables à pH de [3 à 5] et [7 à 12] , ce résultat a été comparé avec celle de *Pistacia Lentiscus* dont la stabilité est de [5 à 12] . cependant l'extrait *d'Ephedra alata* reste stable dans une gamme du pH de 1 à 12 contrairement aux autre lectines comme celle du *Euphorbia helioscopia* perdent leur activité d'hémagglutination plus rapidement , elle reste actif dans un intervalle de pH de 6 à 8 (Shaista *et al.*, 2014) .

5. Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et glycoprotéines

Le test d'inhibition a été effectué avec certain sucre simple et de glycoprotéines pour déterminer la spécificité des extraits en sucre

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

Extrait Monosaccharide	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	<i>Phoenix dactylifera L</i>	<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Ephedra alata</i>
Xylitol	-	-	+++	-	+++
Fucose	-	-	+++	-	+++
Melibiose	-	+	+	-	+++
Rhamnose	-	-	+	+	+++
Glucose	-	-	+	-	+++
Galactose	-	-	+	-	+++
Mannose	-	-	+	+	+++
Lactose	-	-	+	+	+++
Manitol	*	*	*	*	+++
Saccharose	*	*	*	*	+++
Rafinose	*	*	*	*	+++
Sorbose	*	*	*	*	+++

+++ : Très forte agglutination

+ : Faible agglutination

- : Absence d'agglutination

* : Non testé

L'extrait *d'opuntia ficus indica* (racine et raquette) ont montré une inhibition avec tous les sucres testés sauf le melibiose qui a donné une agglutination avec l'extrait *d'opuntia ficus indica* (raquette) ; alors que l'extrait *d'artemisia absinthium* a montré une inhibition avec

Résultats et discussion

certain sucres ; par contre l'extrait de *Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* 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).

Tableau12 : Inhibition de l'activité d'hémagglutination par les glycoprotéines

Extrait Glycoprotéines	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	<i>Phoenix dactylifera</i> L	<i>Artemisia absinthium</i>
Fetuiine	+	-	+	-
Caseine	-	-	+	+

+ agglutination .

- : Absence d'agglutination .

L'extrait d'*Opuntia ficus indica* (raquette) a montré une inhibition avec les glycoprotéine fetuine et caséine , le même résultats a été obtenu avec les lectines extraite à partir de *Morus nigra* (Necib *et al.*,2015) ; contrairement au *Phoenix dactylifera* qui ne montre aucune inhibition , ce resultat est en accord avec *Pistacia Lentiscus* (Necib *et al.*,2015) ; tandis que l'extrait d' *Opuntia ficus indica* (racine) et *Artemisia absinthium* ont montré une inhibition avec caséine ,fetuine respectivement .

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

Tableau 13 : Les concentrations minimales en glucose, galactose provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait d'*Artemisia absinthium*

Dillution Saccharide	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultats et discussion

- : Absence d'agglutination.

Tableau 14 : Les concentrations minimales en glucose, galactose, mannose provoquant l'inhibition d'hémagglutination d'extrait d'*Opuntia ficus-indica*(Raquette)

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

+ : Faible agglutination .

- : Absence d'agglutination .

L'extrait d'*Artemisia absinthium* a démontré une inhibition avec certains sucres (glu,gal,...) ce qui prouve la différenciation de ses récepteurs. la concentration minimale a été calculée avec le glucose et galactose et a été démontré qu'elle été $< 0,000024$ g/ml au niveau du dernier puits , en utilisant une concentration initiale de 0,1g/ml , ce qui indique que le glucose est un très fort inhibiteur par contre dans le cas de la lectine Con A extraite à partir de *Canavalia ensiformis* , le glucose a été un faible inhibiteur (**Kulkarni et Tayade, 2013**).

L'extrait d'*Opuntia ficus indica* (raquette) a montré une inhibition spécifique avec les sucres (glucose, galactose, mannose), cette inhibition due à l'occupation du site/des sites de reconnaissance par un ou plus de ces trois monosaccharides ; la concentration minimale a été calculée avec le glucose et mannose et a été démontré qu'elle été de l'ordre de 0,00039 g/ml au niveau du 9eme puits en utilisant une concentration initial de 0,1 g/ml ; alors que le galactose prouve une concentration de 0,000048 g/ml au niveau du 11 ème puits ce qui prouve que le Galactose a la plus grande affinité . Notre extrait a la même propriété de *Bryopsis plumosapre* qui reconnaisse spécifiquement le D-mannose (**Han et al., 2010**). Ce teste aussi a été effectué sur muqueuse de cuir de l'espèce animale *Clarias gariepinus* (catfish), il a montré une spécificité pour le galactose (**Odekanyin et Kuku, 2014**).

Par conséquent, il est possible d'utiliser le glucose ou galactose ou le mannose comme

Résultats et discussion

ligand dans la matrice d'affinité pour la purification de/des lectines *d'opuntia ficus indica* (raquette).

7. Le Test des métaux (oligoéléments)

Tableau 15 : Résultats du test des métaux avec *Opuntia ficus-indica*(racine et raquette), *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.

Oligoéléments Extrait	EDTA	MgCl ₃	CaCl ₃	MnCl ₃
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	+	-	-	-
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	+	-	-	+
<i>Phoenix dactylifera L</i>	+	-	-	+
<i>Artemisia absinthium</i>	+	-	-	-
<i>Ephedra alata</i>	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination .

+ : Faible agglutination .

- : Absence d'agglutination.

Opuntia ficus indica (racine),*Artemisia absinthium* présentent une inhibition vis-à-vis du magnésium (Mg²⁺) , calcium (Ca²⁺) , manganèse (Mn²⁺) ;tandis que *Opuntia ficus indica* (raquette) et *Phoenix dactylifera* sont inhibés par le magnésium et le calcium .ce résultats montre que les lectines de nos extraits sont des métalloprotéines .Pour *Ephedra alata* il n y a aucune inhibition avec les trois métaux ce qui fait d'elle une lectine non metalloprotéine ,ce qui est en accord avec les résultats obtenus à partir de L'algue rouge *Pterocladia capillacea* (Necib et al., 2014).

8. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO

Résultats et discussion

Tableau 16 : L'agglutination des hématies humaines (A,B,O,AB) par l'extrait brute d' *Opuntia ficus-indica*(racine et raquette), *Phoenix dactylifera L*, *Artemisia absinthium* , *Ephedra alata*.

Groupe sanguin \ Extrait	A	B	O	AB
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Racine)	+++	++	+	+
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Raquette)	-	-	-	-
<i>Phoenix dactylifera L</i>	+	+++	+	+
<i>Artemisia absinthium</i>	-	-	-	-
<i>Ephedra alata</i>	+	++	+	++

+++ :Très forte agglutination .

++ : Forte agglutination.

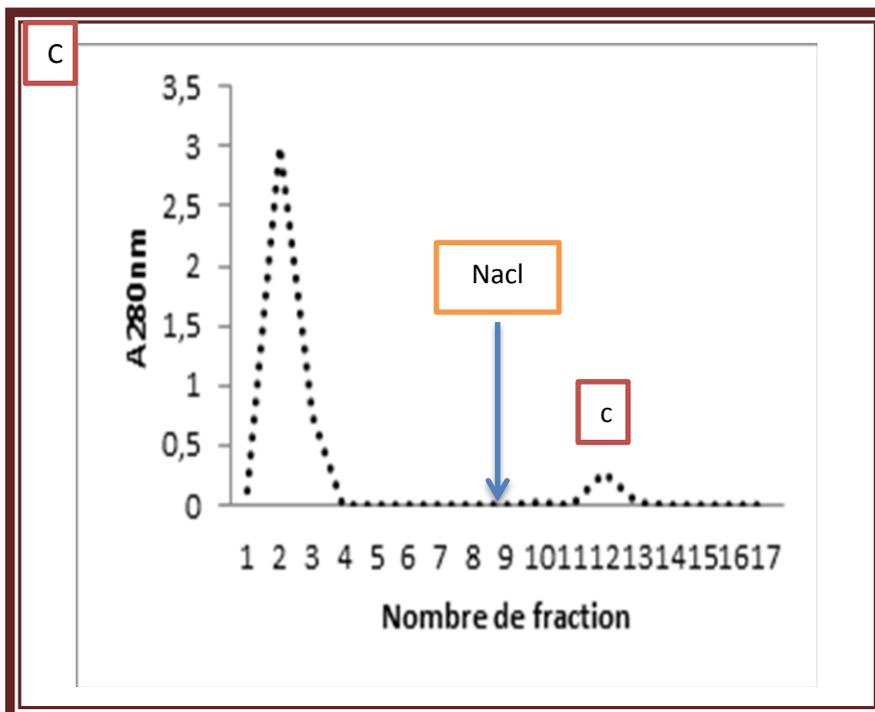
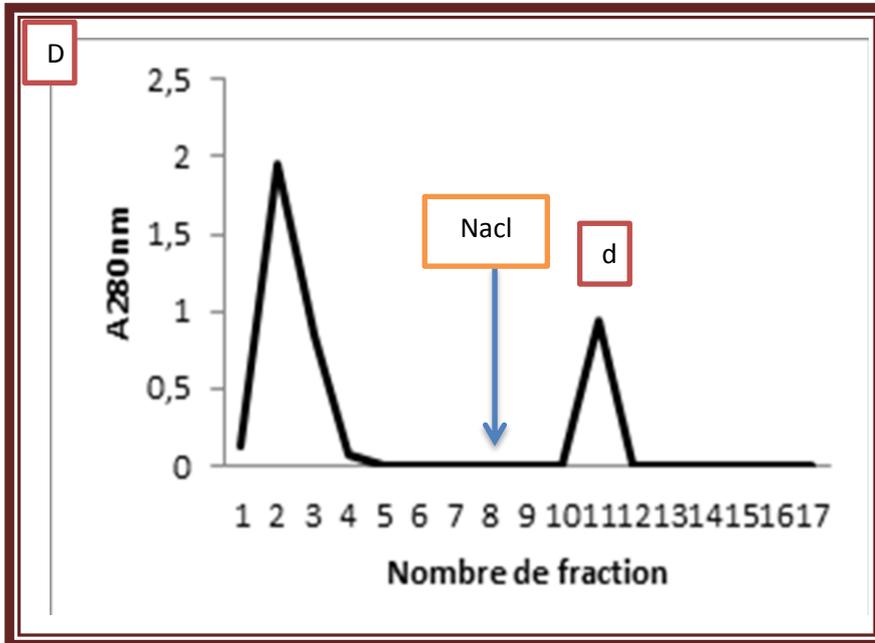
+ :Faible agglutination .

- : Absence d'agglutination

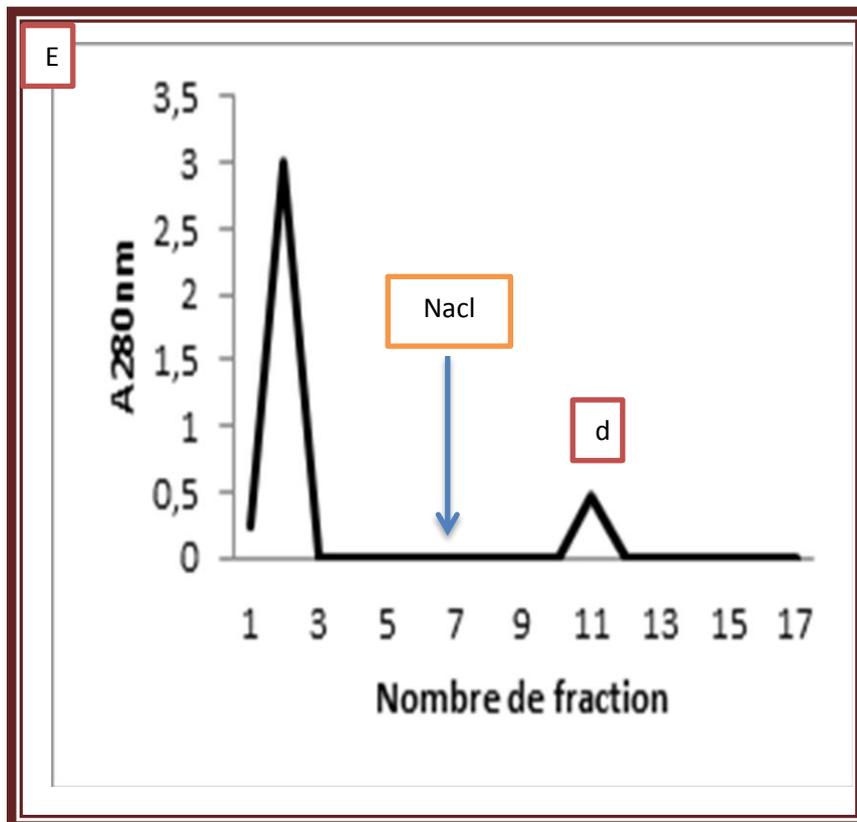
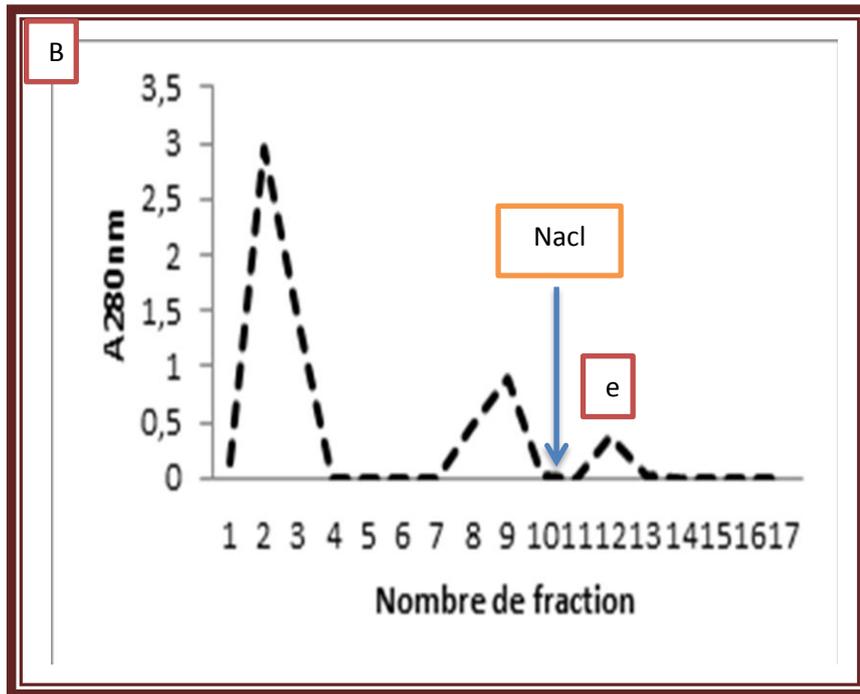
Les extraits des trois espèces *Opuntia ficus-indica* (Racine), *Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* agglutinent assez fortement tous les types de groupe sanguins humains Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Geotrupes stercorarius* (Devi et al., 2014), et sur *Diplotaxis assurgens* et *Raphanus sativus* qui ont la même propriété (Deeksha et al., 2015). Alors nous pouvons classer les lectines d'*Opuntia ficus-indica* (Racine), *Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique.

Cependant l'extrait d'*Opuntia ficus-indica* (raquette) et d'*Artemisia absinthium* n'agglutine aucun type des groupes sanguins humains, donc ces lectines ne présentent aucune sélectivité pour les groupes du système ABO. Ces résultats sont identiques aux celles trouvées sur l' espèce *Brassica napus L* et une espèce voisin *Brassica rappa* (Deeksha et al., 2015) .

9. La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions



Résultats et discussion



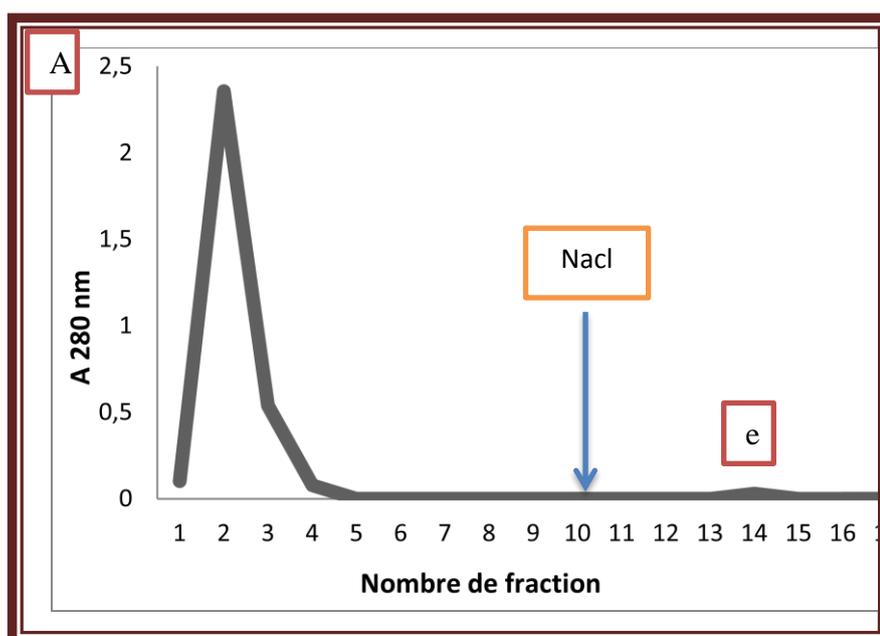


Figure 21 : Filtration de l'extrait *d'opuntia ficus indica* (racine (A)), *Phoenix dactylifera* (B), *Opuntia ficus indica* (raquette (C)), *Artemisia absinthium* (D), *Ephedra alata* (E) sur colonne échangeuse d'ions.

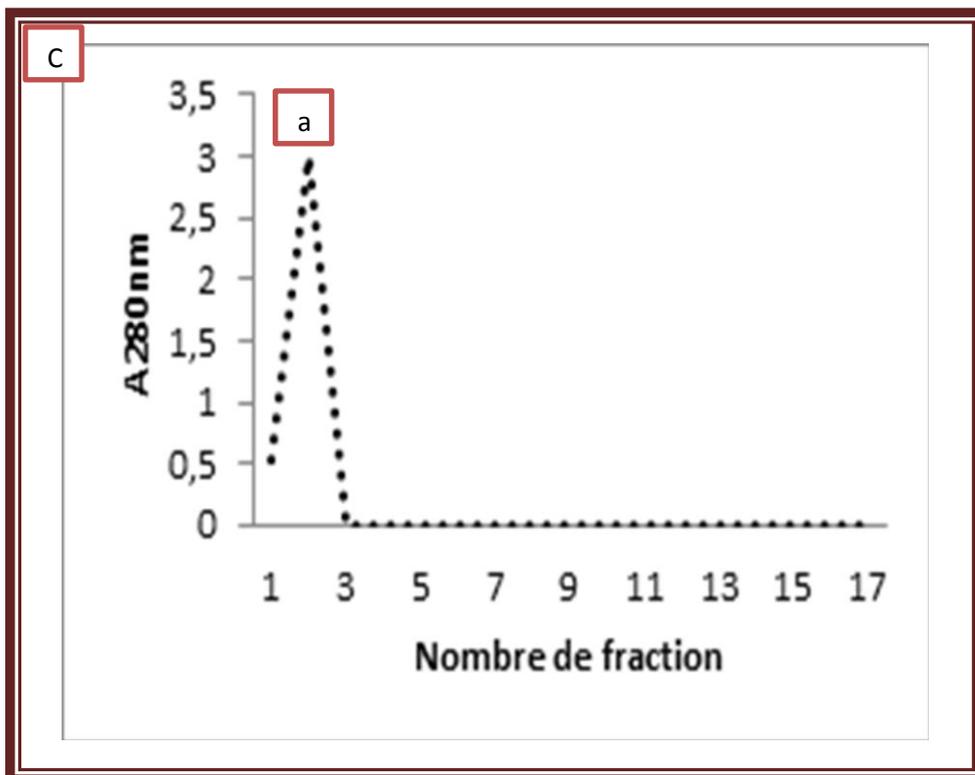
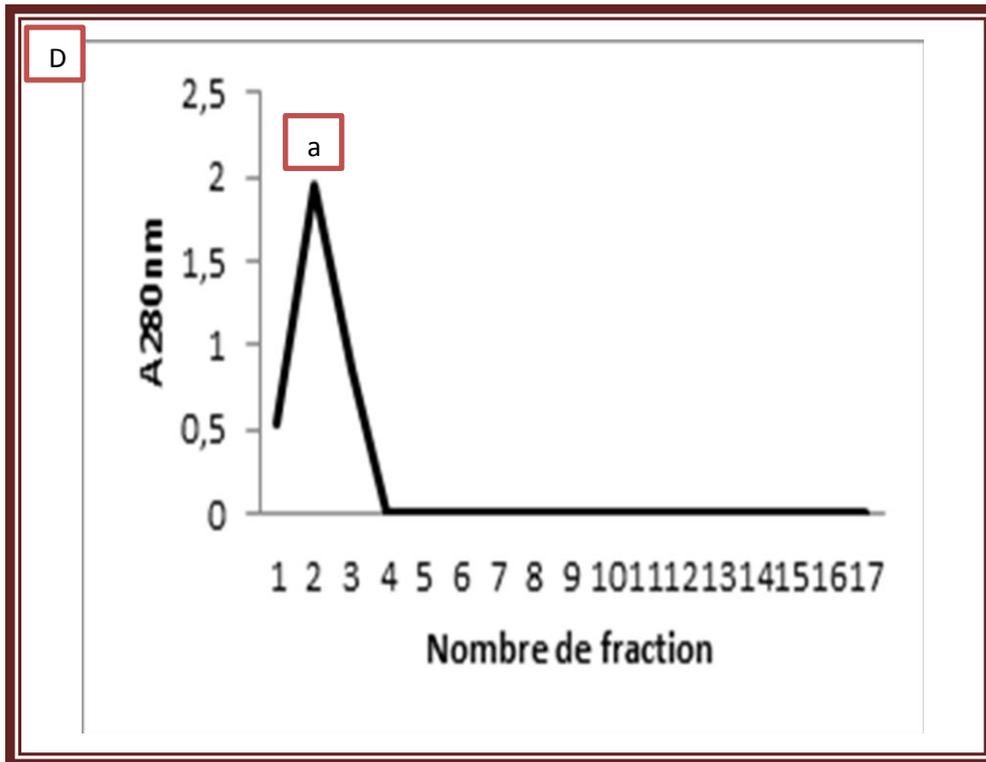
Eluant : NaCl et PBS(0,1M)

Absorbance à 280 nm .

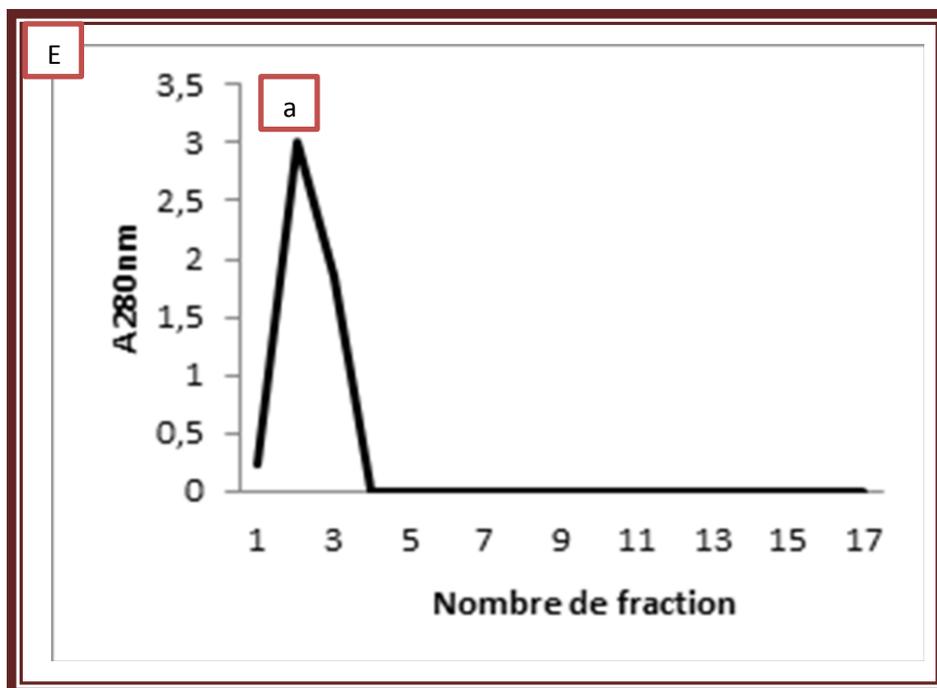
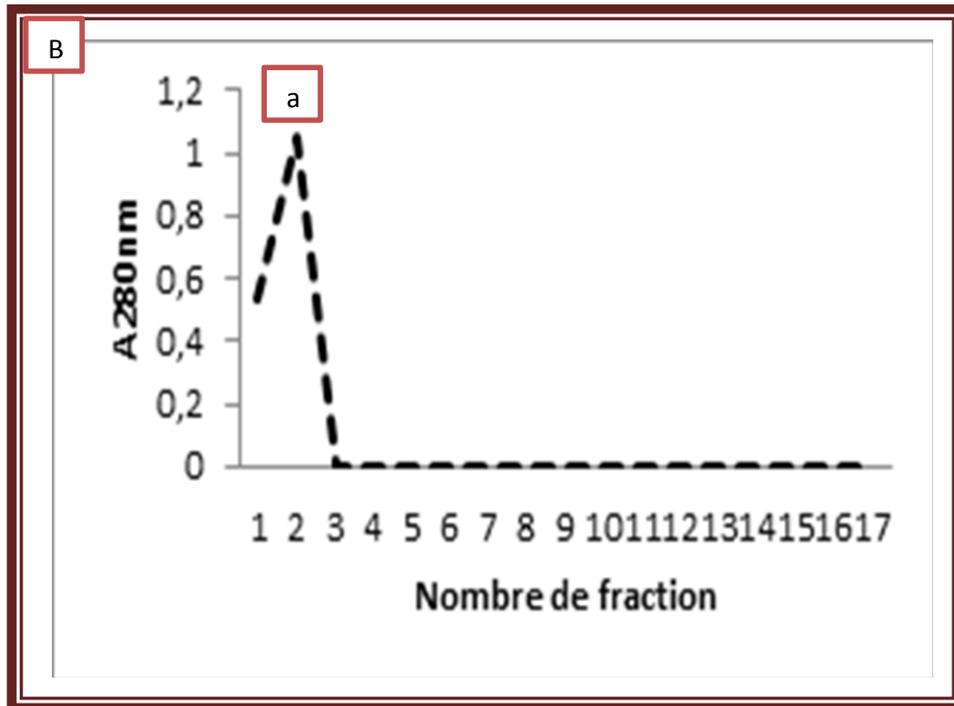
Volume de la fraction : 5 ml .

La filtration par chromatographie échangeuse d'ions des extraits *d'Opuntia ficus indica* (racine, raquette), *Artemisia absinthium*, *Ephedra alata* a donné deux pics : le premier correspond à l'élution par le tampon phosphate, le deuxième correspond à l'élution par l'NaCl (0,1M, 0,2M, 0,3M); par contre *Phoenix dactylifera* a donné trois pics, les deux premiers correspondent à l'élution par le tampon et l'autre par l'NaCl.

10. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de Sephadex G25 et G75



Résultats et discussion



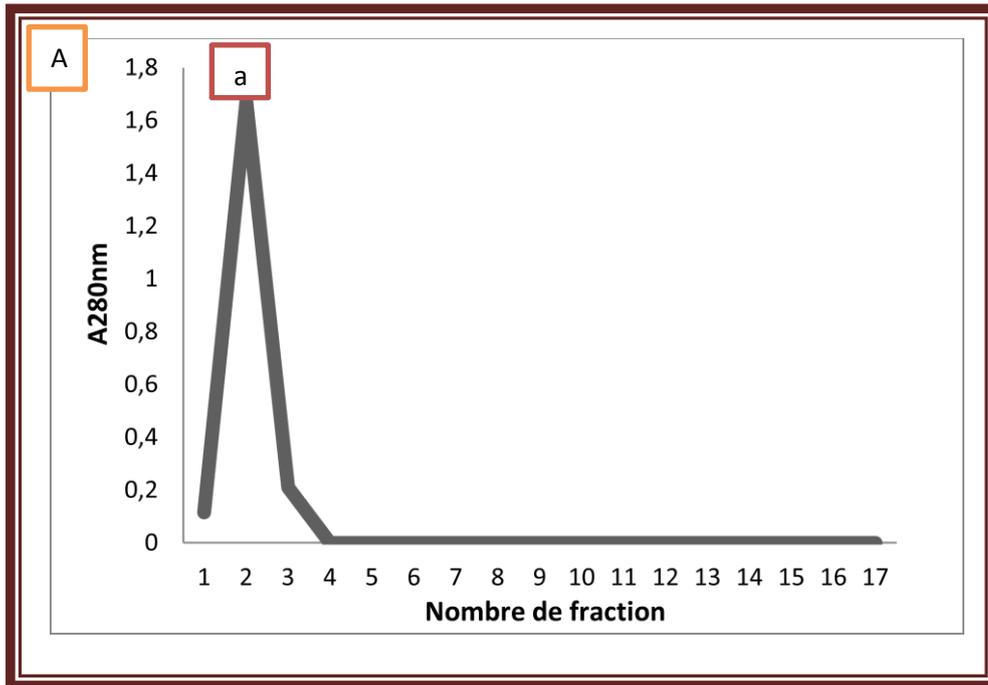


Figure 22 : Filtration de l'extrait d'*Opuntia ficus indica* (racine A) *Phoenix dactylifera* (B), *Opuntia ficus indica* raquette (C), *Artemisia absinthium* (D), et *Ephedra alata* (E) sur colonne de Sephadex G25.

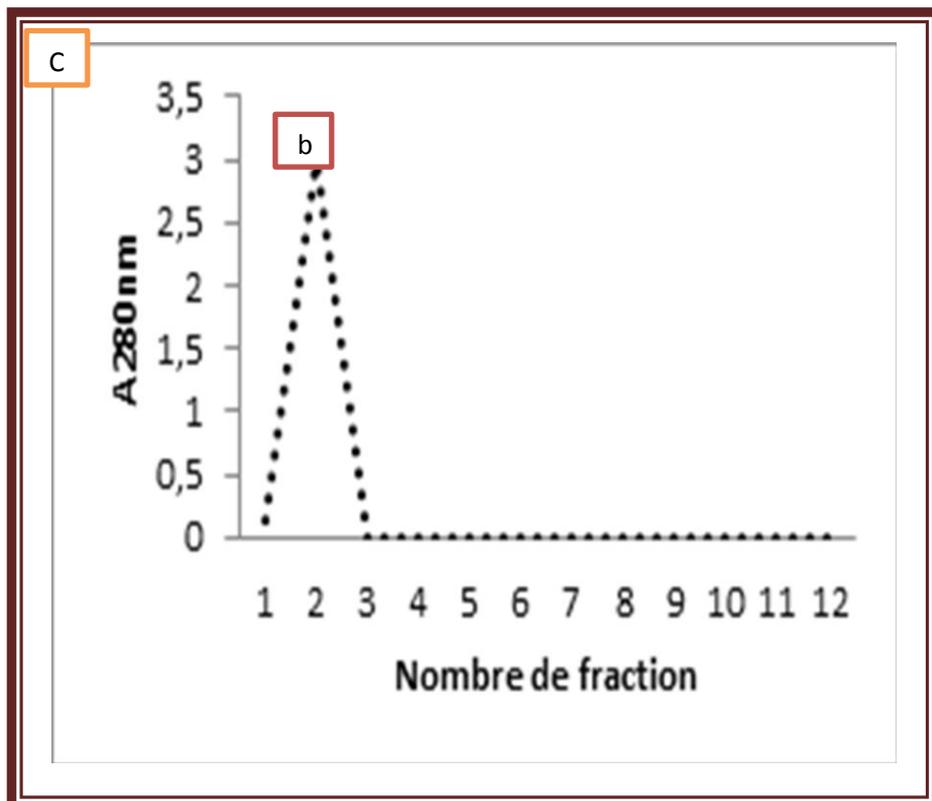
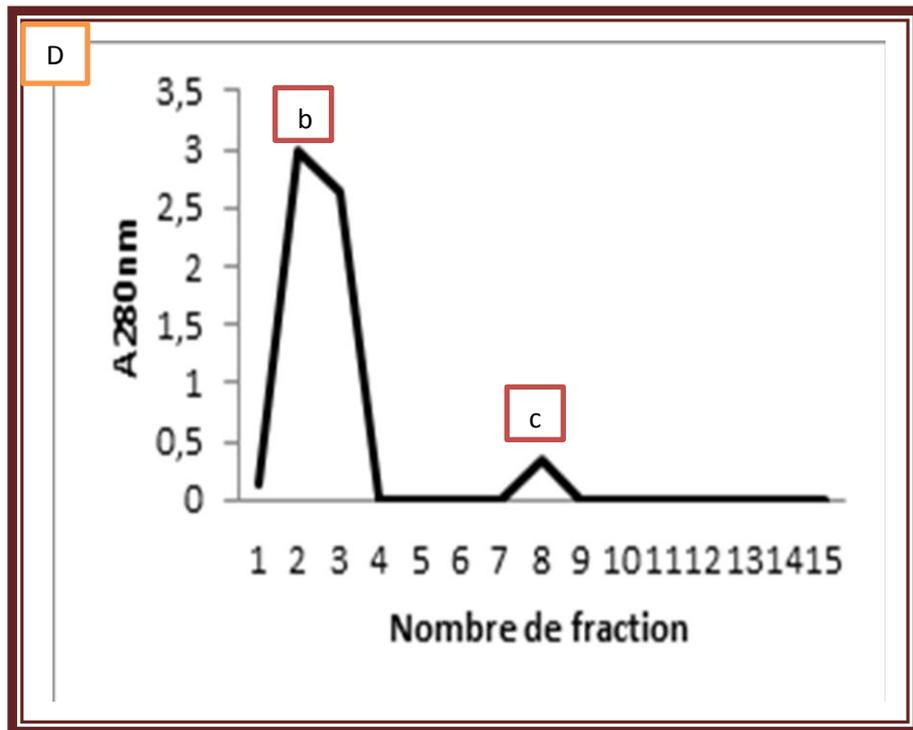
Eluant : PBS (pH7,2).

Absorbance à 280 nm .

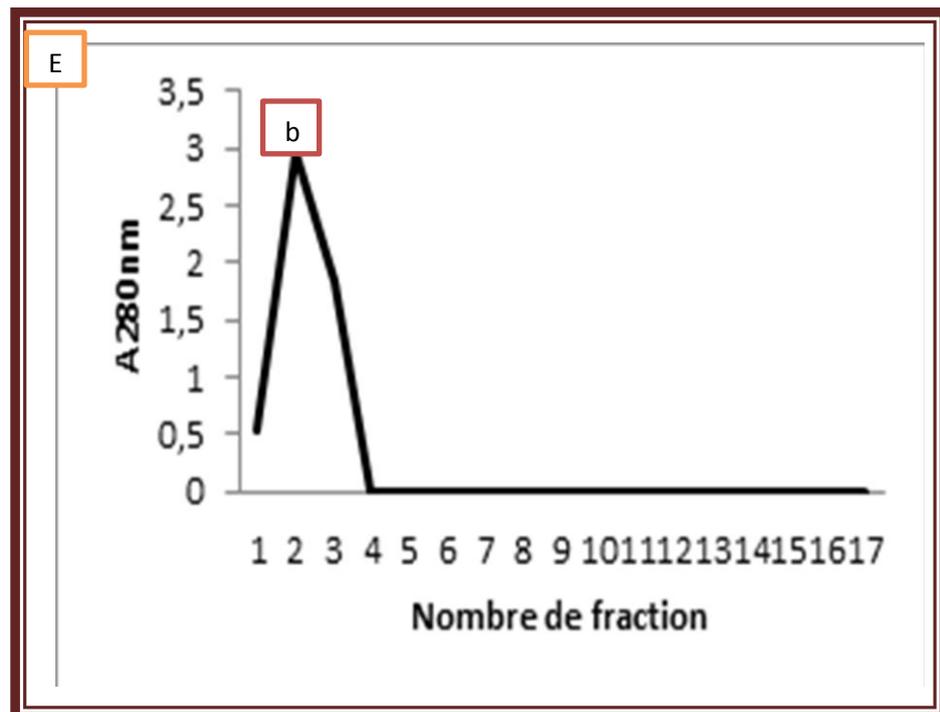
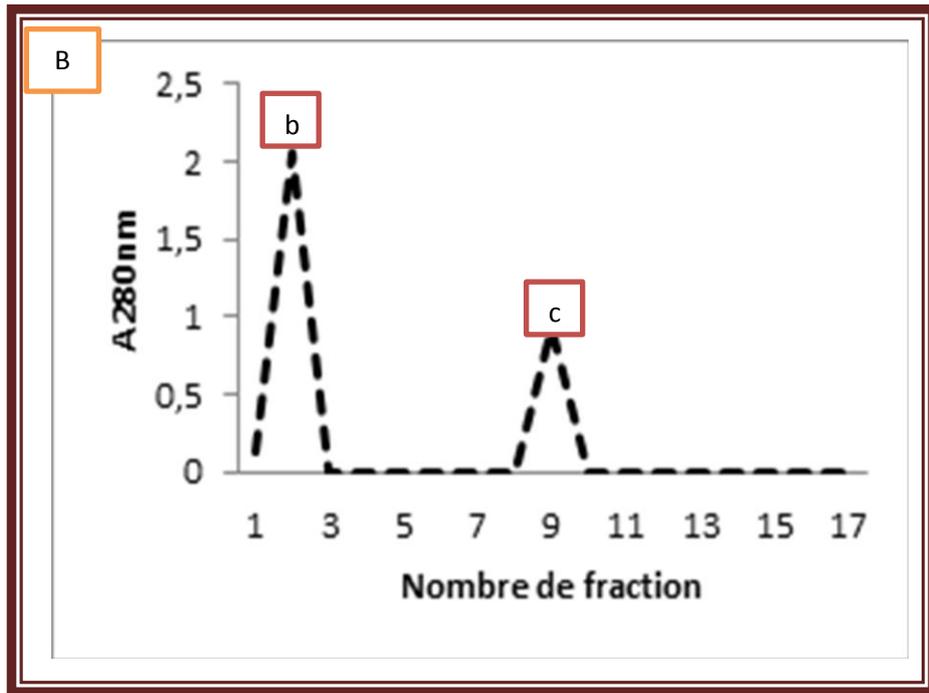
Volume de la fraction : 5 ml .

La filtration de l'extrait d'*Opuntia ficus indica* (raquette et racine), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* sur colonne de sephadex G25 et la lecture à 280nm a montré un seul pic ; ces résultats sont similaires à ceux des lectines de *Pterocladia capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G75 (Necib *et al.*, 2015).

Résultats et discussion



Résultats et discussion



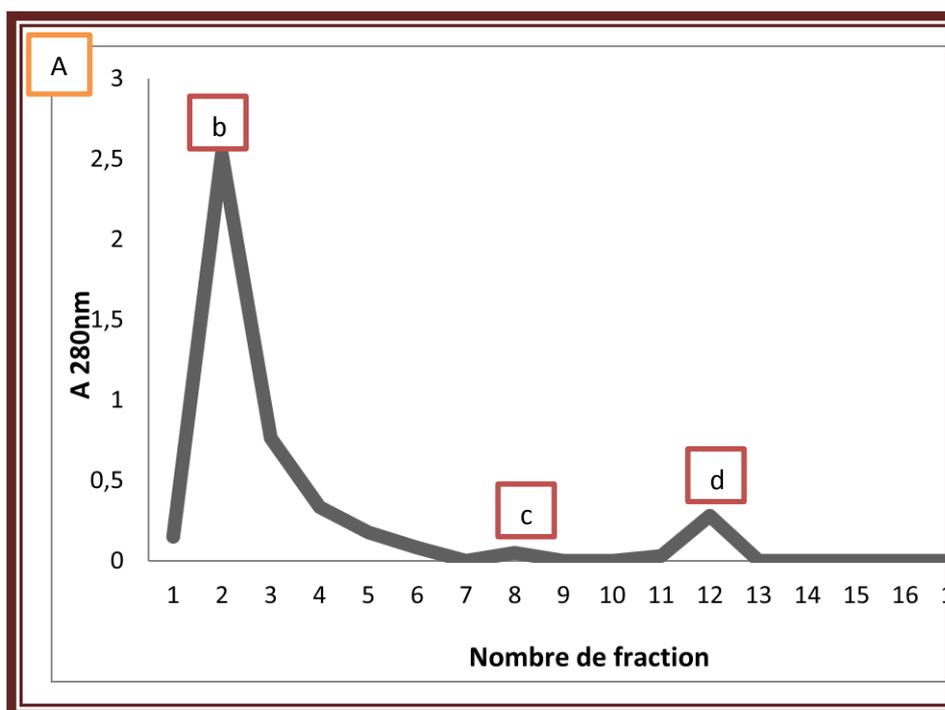


Figure 23: Filtration de l'extrait d'*Opuntia ficus indica* (racine A) *Phoenix dactylifera* (B), *Opuntia ficus indica* raquette (C), *Artemisia absinthium* (D), et *Ephedra alata* (E) sur colonne de Sephadex G75.

Eluant : PBS (pH7,2).

Absorbance à 280 nm .

Volume de la fraction : 5 ml .

Les résultats de séparation en utilisant le séphadex G 75 ont montrés un bon fractionnement des extraits (pics séparées), dont *artemisia absinthium* et *Phoenix dactylifera* ont donner 2 pics, ce resultat est en accord avec celle des lectines de *Ruta Graveolens* fractionné sur gel sephadex G75 (*necib et al., 2015*); ainsi avec celle des lectines de *Clarias gariepinus* fractionées sur le gel séphadex G 150 avec un volume de rétention de 4 ml (*Odekanyin et Kuku, 2014*); par contre l'extrait d'*opuntia ficus indica*(raquette) et *ephedra alata* ont montré un seul pic, des résultats similaires ont été obtenus avec les lectines de *Cyperus Rotundus* et *Pistacia Lentiscus* (*necib et al., 2015*); alors que l'extrait d'*opuntia ficus indica* (racine) a montré trois pics.

11. Etude de l'activité antioxydante in vitro des lectines extraites des plantes *Opuntia ficus indica* (racine et raquette) ,*Phoenix dactylifera* ,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*

11.1. Dosage des protéines

Tableau 17 : La Concentration des proteines dans l'extrait des lectines brut et purifiés d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette) ,*Phoenix dactylifera* ,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*

	plantes	Concentration de protéines (mg/ml)
Brute	<i>Artemisia absinthium</i> ,	0.35±0.01
	<i>Opuntia ficus indica</i> (Raquette),	0.37±0.02
	<i>Phoenix dactylifera</i> ,	0.21±0.01
	<i>Ephedra alata</i> ,	0.38±0.01
	<i>Opuntia ficus indica</i> (Racine),	0.452±0.02
Lectines purifiées	<i>Artemisia absinthium</i> ,	0.056±0.002
	<i>Opuntia ficus indica</i> (Raquette),	0.13±0.002
	<i>Phoenix dactylifera</i> ,	0.11±0.001
	<i>Ephedra alata</i> ,	0.11±0.002
	<i>Opuntia ficus indica</i> (Racine),	0.014±0.01

Les lectines purifiées montrent une forte concentration en protéines après purification avec des valeurs de 0.13 , 0.11 , 0.11 mg/ml dans les extrait d'*Opuntia ficus*

Résultats et discussion

indica(raquette),*Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* respectivement ; notant que ces deux dernière ont la mêmes concentration .Cependant les lectines purifiées d'*Artemisia absinthium* et *Opuntia ficus indicica*(racine) montrent une faible concentration de protéine avec 0.056 et 0.014 mg/ml respectivement .

11.2. dosage de DPPH , SOD , Fer ferrique in vitro

Tableau 18 : l'activité antioxydante des lectines d'*Opuntia ficus indica*(racine et raquette) ,*Phoenix dactylifera* ,*Artemisia absinthium* et *Ephedra alata*

Plantes	L'activité antioxydante		
	DPPH	SOD	Fer ferrique
<i>Artemisia absinthium</i>			
<i>a</i> (G25)	52.74±0.13	61.1±0.13	44.7±0.15
<i>b</i> (G75)	72.52±0.1	65.3±0.1	62.8±0.1
<i>c</i> (G75)	51.31±0.12	41.2±0.14	23.37±0.13
<i>d</i> (lectine purifiée)	78.5±0.13	71.9±0.1	65.9±0.13
<i>Opuntia ficus indica</i> (Raquette)			
<i>a</i> (G25)	71.75±0.16	65.4±0.1	59.2±0.1
<i>b</i> (G75)	8.29±0.01	15.6±0.1	27.8±0.12
<i>c</i> (lectine purifiée)	71.07±0.15	67.3±0.15	62.2±0.12
<i>Phoenix dactylifera</i>			
<i>a</i> (G25)	64.06±0.15	67.2±0.12	51.7±0.13
<i>b</i> (G75)	53.68±0.1	62.2±0.1	45.3±0.1
<i>c</i> (G75)	53.62±0.12	40.3±0.12	44.3±0.13
<i>d</i> (lectine purifiée)	67.25±0.15	65.0±0.15	52.5±0.1

Résultats et discussion

Ephedra alata			
a(G25)	50.54±0.13	55.3±0.13	64.1±0.15
b (G75)	25.88±0.12	36.2±0.14	40.1±0.13
c (lectine purifiée)	79.09±0.15	62.2±0.1	70.1±0.1
Opuntia ficus indica (racine)			
a(G25)	67.3±0.12	72.3±0.15	53.3±0.15
b(G75)	15.2±0.15	24.4±0.12	20±0.12
c(G75)	40.1±0.14	35.4±0.15	37.5±0.14
d(G75)	37.5±0.15	40.2±0.12	44.4±0.14
e(Lectine purifié)	69.2±0.12	75.7±0.19	66.2±0.15
Standard (Acide ascorbique)	79.19±0.12	76.17±0.17	71.47±0.13

les fractions (b) et (d) de la plante *Artemisia absinthium* ont une activité antioxydante du DPPH , SOD , Fer ferrique maximal que les autres fractions avec un pourcentage d'inhibition 72.52% et 78.5% (DPPH) , 65.3% et 71.9 (SOD), 62.8% et 65.9% (fer ferrique) respectivement par apport le standard qui possède une activité antioxydante de (DPPH)79.19% , (SOD) 76.17% et (fer ferrique) 71.47%. Les fractions (a) et (c) d'*Opuntia ficus indica*(raquette) ont une activité antioxydante (DPPH ,SOD et fer ferrique) plus élevée avec un pourcentage d'inhibition 71.75% et 71.07% (DPPH), 65.4% et 67.3% (SOD) et 59.2% et 62.2% (Fer ferrique) respectivement comparé avec le standard. Les fractions (a) et (d) de la plantes *Phoenix dactylifera* et les fraction (a) et (e) d' *Opuntia ficus indica* (racine) possèdent une activité antioxydante maximal avec des pourcentages d'inhibition de DPPH 64.06 % et 67.25 % , SOD 67.2% et 65.0% et Fer ferrique 51.7% et 52.5% respectivement pour *Phoenix dactylifera* . celle d'*opuntia ficus indica* (racine) est de 67.3% et 69.2% (DPPH) , 72.3% et 75.7% (SOD) et 53.3% et 66.2% (Fer ferrique) respectivement comparé avec le standard. Pour *Ephedra alata* seulement la fraction (c) possède une activité antioxydante élevé par

Résultats et discussion

rapport aux autres fractions avec un pourcentage d'inhibition de DPPH 79.09% , SOD 62.2% et fer ferrique 70.1% comparé avec le standard .

Les lectines purifiées de nos extraits sont testées pour l'activité antioxydante en utilisant le test du radical DPPH , celle d'*Artemisia absinthium* , *Opuntia ficus indica* (raquette) et *Ephedra alata* ont montrés une activité antioxydante maximale avec 78.5% , 71.07% , 79.09% respectivement . les lectines purifiées de *Phoenix dactylifera* et *Opuntia ficus indica* (racine) ont montrés aussi une activité antioxydante avec 67.25% et 69.09% respectivement par rapport le standard (79.19%).

Les valeurs de l'activité antioxydante des lectines purifiées déterminée par la méthode de SOD sont de 71.9, 67.3% , 65.0% , 62.2% et 75.7% pour les plantes *Artemisia absinthium* , *Opuntia ficus indica* (raquette) , *Phoenix dactylifera* , *Ephedra alata* et *Opuntia ficus indica* (racine) respectivement.

Le test de réduction du fer ferrique est souvent utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant à donner un électron. dans ce test la capacité des lectines purifiées de nos plantes de réduire Fe^{+3} en Fe^{+2} est déterminées ; les lectines des plantes *Artemisia absinthium* , *Opuntia ficus indica* (raquette) , *Phoenix dactylifera* , *Ephedra alata* et *Opuntia ficus indica* (racine) montrent une activité antioxydante maximale avec 65.9% , 62.2% , 52.5% , 70.1% et 66.2% respectivement . Parmi les fractions purifiées, celle d'*Ephedra alata* possède la meilleure activité anti -oxydante par rapport aux autres plantes avec un pourcentage d'inhibition de DPPH 79.09% tandis que celle du standard est de 79.19%.

Le déséquilibre entre la formation des ROS et la défense antioxydante mène au stress oxydant ,ayant pour résultats des dommages cellulaire (**Souza et Pinto, 2005**). plusieurs maladies tel que le cancer , le diabète , vieillissement prématuré et les désordre de dégénérescence ont été liés au stress oxydatif provoqué par les ROS.(**Kalinowski et al.,2002 ; Gajula et al .,2009**)

L'analyse de DPPH est une méthode très utilisée pour examiner l'activité antioxydante des produits naturels (**Baskar et al., 2008**) .la valeur maximale de l'inhibition de l'activité de DPPH et SOD a été observée en acide ascorbique (standard) 79.19% et 76.17% respectivement ,l'activité anti radicalaire de DPPH et SOD des lectines extraite des plantes *Artemisia absinthium*, *Opuntia ficus indica* (raquette) , *Phoenix dactylifera* , *Ephedra alata* et *Opuntia ficus indica* (racine) peut être due au groupe hydroxyle présent dans les lectines .ces

Résultats et discussion

résultats sont similaires à celle trouvée dans les lectines des plantes *Morus nigra*, *Ruta graveolens*, *Cyperus rotundus* et *Pistacia lentiscus* dont la valeur de standard est maximale avec IC_{50} de DPPH et SOD 97.1 $\mu\text{g/ml}$ et 71.47 $\mu\text{g/ml}$ respectivement (Necib *et al.*,2016) et les lectines des champignons endophytiques de *Viscum album* (Sadananda *et al.*,2014).

Le test de réduction du fer ferrique dépend de la capacité de réduction qui convertit le fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{2+} , ce test sert d'un indicateur de l'activité antioxydante (Angel *et al.*,2013). La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700nm (Chung Y-C *et al.*,2002). Cependant, les lectines extraites à partir de nos plantes montrent toutes une grande activité réductrice du fer ferrique, des expériences réalisées sur les lectines des plantes *Morus nigra*, *Ruta graveolens*, *Cyperus rotundus* et *Pistacia lentiscus* ont montré des résultats similaires (Necib *et al.*,2016), aussi avec les lectines des champignons endophytiques de *Viscum album* (Sadananda *et al.*,2014).

12. L'effet d'extrait d'*Ephedra alata* sur l'activité phagocytaire

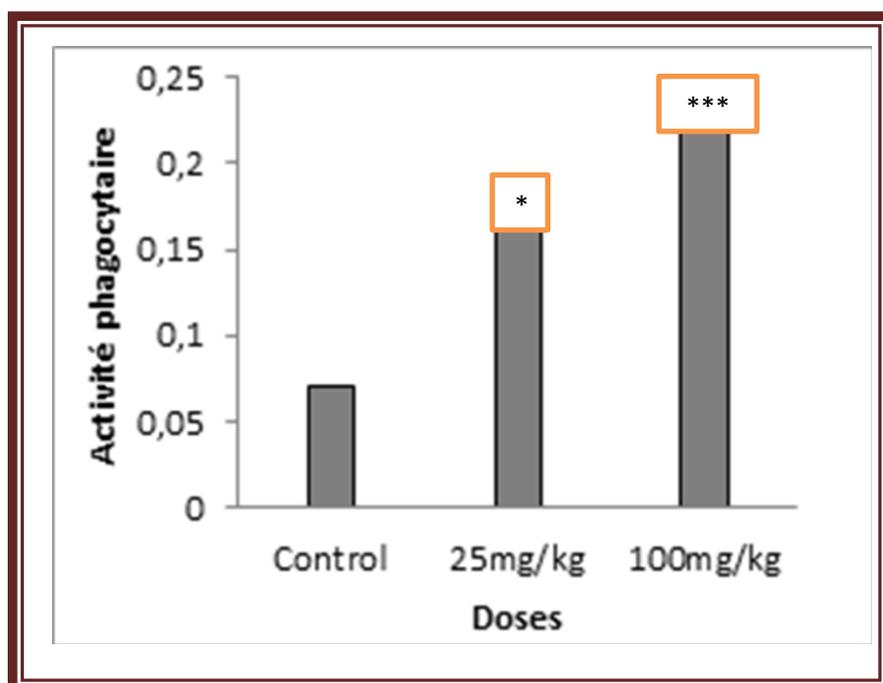


Figure 24 : Effet des lectines extraites d'*Ephedra alata* sur l'activité phagocytaire

* : Significatif ; *** : très hautement Significatif

Résultats et discussion

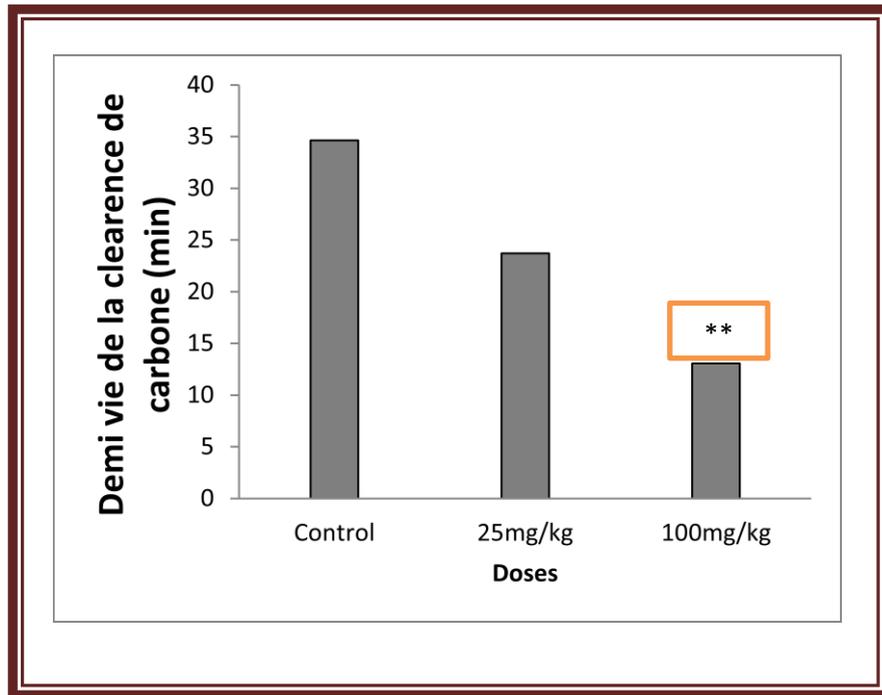


Figure 25 : Effet de lectines extraites d'*Ephedra alata* sur la demi-vie $t_{1/2}$ de carbone dans le sang.

** : hautement significatif

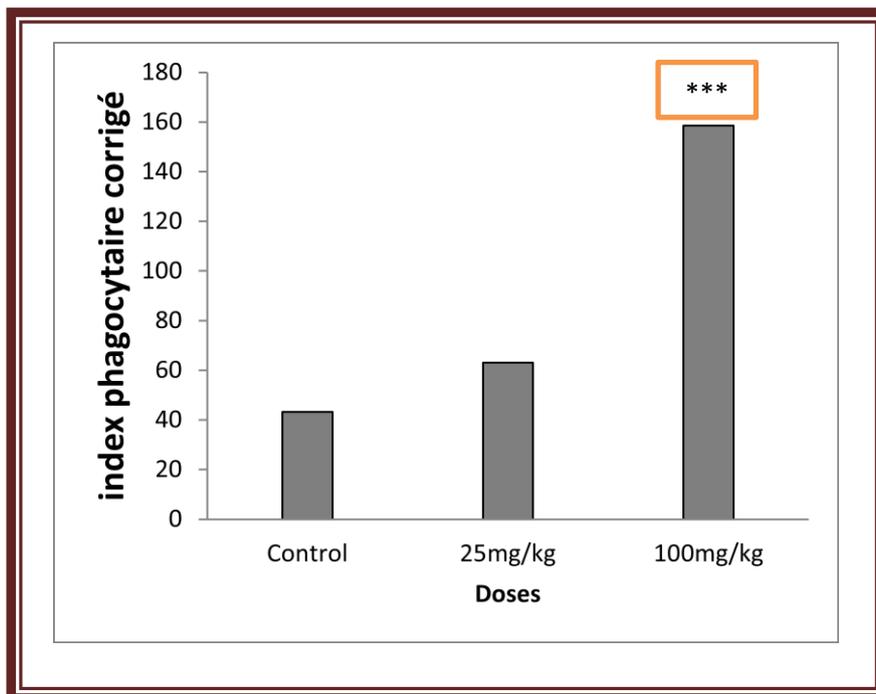


Figure 26 : Effet de lectines extraites d'*Ephedra alata* sur l'index phagocytaire corrigé

*** : très hautement significatif

Résultats et discussion

Afin de déterminer le rôle des lectines *d'Ephedra alata* dans le système immunitaire, un test d'activité phagocytaire (**Figure 24**) a été réalisé où la vitesse d'élimination du carbone et l'index phagocytaire corrigé ont été calculées (**Figure 25**) et (**Figure 26**) respectivement. Les résultats illustrés dans la **figure 24** montrent une augmentation statistiquement significative chez les souris traitées par la dose 25mg/kg et très hautement significative chez les souris traitées par la dose 100mg/kg par rapport au témoin, par contre on observe une diminution non significative dans la clearance de carbone chez les souris traitées par la dose 25mg/kg et hautement significative chez les souris traitées par la dose 100mg/kg par rapport au témoin (**Figure 25**). Les résultats obtenues dans la **figure 26** montrent une augmentation statistiquement non significative dans l'index phagocytaire corrigé α chez les souris traitées par la dose 25mg/kg et très hautement significative chez les souris traitées par la dose 100mg/kg par rapport au témoin.

Le système réticulo-endothélial (RES) se compose de la rate, le thymus et d'autres tissus lymphoïdes, ainsi que les cellules qui tapissent les sinus de la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques et l'endothélium capillaire du foie (cellules de Kupffer), et de la surrénale et la glande pituitaire, ceux-ci comprennent l'essence ou macrophages fixes, qui sont transportées par les fluides corporels ou errent à travers les tissus. Par conséquent, l'activité phagocytaire des macrophages est un indicateur important des fonctions immunitaires de l'organisme, et ce qu'il a été remarqué dans notre test : au fur et à mesure qu'on augmente la dose on a une augmentation parallèle de l'activité phagocytaire. L'élimination est la phase qui assure la disparition d'une substance de l'organisme soit parce qu'elle est excrétée, soit parce qu'elle est transformée en autres produits qui ne sont plus décelables. Pour confirmer l'effet de lectine extraite à partir *d'Ephedra alata* sur l'activité phagocytaire, un test (clairance du carbone) a été réalisé et a ainsi révélé que de plus en plus la dose est injectée ; le temps de clairance du carbone dans le sang diminue graduellement. Ceci indique que la lectine extraite de *d'Ephedra alata* influence le mécanisme de phagocytose, largement distribué par les monocytes, macrophages ou RES qui se traduisent par une augmentation significative de l'indice phagocytaire du test de clairance de carbone, ce qui est en accord avec les expériences de (**Hou et al., 2010**), (**Necib et al., 2014**), (**Bouadi et al., 2014**) .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes, qui sont considérés comme de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

A l'issue de ce travail, une étude d'extraction de nouvelles lectines des espèces *Opuntia ficus indica* (racine, raquette), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium*, *Ephedra alata* a été réalisée. La recherche des lectines à partir de notre plantes a conduit à une activité d'hémagglutination.

- L'extrait d'*Opuntia ficus indica*(raquette),*Artemisia absinthium* ne montrent aucune spécificité pour les hématies des groupes sanguins du système ABO, tandis que l'extrait d'*Opuntia ficus indica*(racine),*Phoenix dactylifera*, *Ephedra alata* agglutinent tous les types de groupe sanguins qui ne peuvent pas être utilisés comme des réactifs de groupages d'origines végétales.
- Le test d'inhibition d'hémagglutination révèle qu'il y a une affinité différente chez les monosaccharides et les glycoprotéines, les lectines d'*Artemisia absinthium* sont inhibés par le glucose, galactose et celles d'*Opuntia ficus indica*(raquette) sont inhibés par le glucose, galactose, mannose, cette affinité de la lectine pour ce sucre peut être utilisée pour sa purification.
- Nos résultats indiquent que les lectines d'*Opuntia ficus indica*(raquette),*Phoenix dactylifera*, *Ephedra alata* sont thermorésistants et plus résistants à la température par rapport à l'extrait d'*Opuntia ficus indica*(racine) et *Artemisia absinthium*.
- Nos lectines ont été partiellement purifiées par chromatographie échangeuse d'ions en utilisant la cellulose DEAE.
- La chromatographie sur séphadex G25 a donné un seul pic pour tous les extraits par contre la chromatographie sur séphadex G75 a donné un seul pic pour *Opuntia ficus indica*(raquette), *Ephedra alata*, deux pics pour *Artemisia absinthium* et *Phoenix dactylifera*, trois pics pour *Opuntia ficus indica*(racine).
- Les extraits soumis à un test d'activité antioxydante in vitro en utilisant le radical DPPH, SOD, Fer ferrique ont montrés une forte activité antioxydante dont la meilleure est celle d'*Ephedra alata* pour le DPPH et Fer ferrique

Conclusion et perspectives

- Le test immunomodulateur montre un effet positif de l'extrait *d'Ephedra alata* sur l'activité phagocytaire et l'amélioration de la vitesse d'élimination des substances étrangères de l'organisme.

Les perspectives à court terme de ce travail sont nombreuses. La purification des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC, la détermination des poids moléculaire des lectines par électrophorèse et leur séquençage, Des tests de l'activité antivirale, l'activité anticancéreuse.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

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

Assreury 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, Antioxidant 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 langerine. 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 dietrylectins 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.

Edelman 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.

- Gajula D, Verghese M, Boateng J , LT Walker LT, Shackelford L, Mentreddy SR, Cedric S.(2009).** Int J of Cancer Res.5: 130-143.
- 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 stressinducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. Free Rad Res. 41, 251-9.
- Ghopskins 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 foltroric medicinal plant extract ankaferd blood stooper. 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-chimical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine. ELSEVIER. INC, 49-50.
- Gomes B S, Siqueira A B S, Maria R C C , Teisceira V G E H, Anuda F V S, Naximmento K S D, De Lima A N, Souza-Motta M, Porto A L F. (2012).** Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. Braz. J. Microbiol 43(2) ,770-778.
- Gomes J. (1994).** Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. Agent Action . 41, 132-135 .
- 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, Kanska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M and Penault-Llorca F. (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer.* 91, 141-158.

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

Kalinowski L, Matys T, Chabielska E, Buczek W, Malinski T.(2002). Hyp. 40: 521–527.

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 insectects. 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 extrated 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 lactin extrated 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. Acadimic jornals. 9(20), 869-879.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. (2009). Agroforestree 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 .
- Peumans WJ , 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. pp 549-585.
- 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. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. Adv. Exp. Med. Biol.408, 1-8.

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 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.

Souza ME, Pinto MM.(2005) Síntesis of xanthones: an overview. *Curr Med Chem*, 12: 2447-2479.

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 , Ekhlesi-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.

Wang 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.

Xu 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 *Penaeus 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.

Références bibliographiques

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

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 (Na ₂ HPO ₄)	0,435 g
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	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
MgCl ₃	0,048 g	100 ml
CaCl ₃	0,032 g	4 ml
MnCl ₃	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)

Annexe

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 une longueur d'onde 580nm contre le blanc.

Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capable d'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 à l'obscurité pendant 30min, la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH.
- Lire l'absorbance à une longueur d'onde : 517nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante

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

La procédure expérimentale est basé sur les étapes suivantes :

Annexe

- ✚ 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 à 700 nm après 10 min contre le blanc qui contient le méthanol à la place d'échantillon

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

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

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 → 1 mg/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

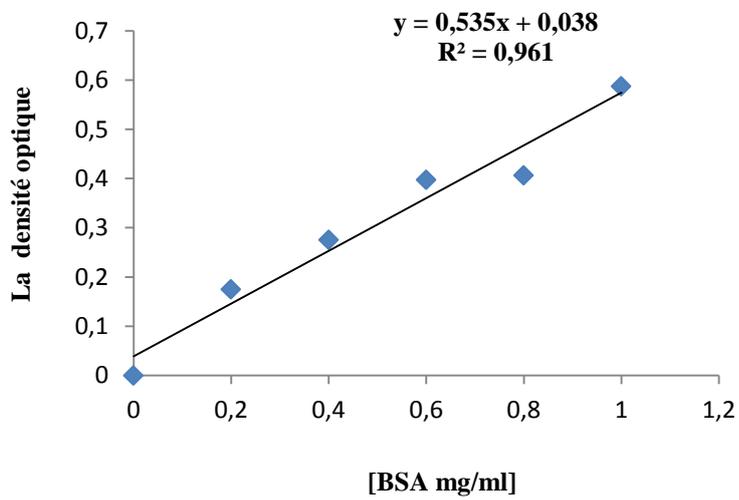
Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

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

Annexe

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 antioxydante in vitro et les propriétés immunitaire des plantes d'origine Algérien

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé

Résumé

Les lectines sont des substances protéiques extraites des plantes ou d'animaux. Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans les extraits d'*Opuntia ficus indica* (racine, raquette), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* 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'extrait d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette), *Phoenix dactylifera*, *Artemisia absinthium* et *Ephedra alata* a été de 1 : 11 (2048), 1 : 3 (8), 1 : 7 (128) 1 : 4 (16) et 1 : 13 (8192) respectivement. Le traitement thermique des lectines d'*Opuntia ficus indica* (raquette), *Phoenix dactylifera* et *Ephedra alata* de 40°C jusqu'à 90°C n'a pas été suffisant pour leur inactivation, par contre les lectines d'*Opuntia ficus indica* (racine) et *Artemisia absinthium* possèdent une résistance jusqu'à 60°C. L'activité hémagglutinante d'*Opuntia ficus indica* (racine et raquette) est stable à pH [7-12] et [2-7] respectivement, celle de *Phoenix dactylifera* est stable à pH [2-12], *Artemisia absinthium* à pH [3-5] et [7-12] et celle d'*Ephedra alata* à pH [1-12]. Un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et glycoprotéines et qui a montré que les lectines d'*Opuntia ficus indica* (raquette) ont été spécifiquement inhibés par le galactose, mannose, glucose et celles d'*Artemisia absinthium* par le glucose et galactose. Les lectines de nos plantes sont tous des métalloprotéines sauf *Ephedra alata*. Pour le test d'ABO, les lectines extraites de nos plantes ne possèdent aucune sélectivité vis-à-vis des groupes sanguins humains. La purification par chromatographie échangeuse d'ions de nos extraits a donné un seul pic pour toutes les plantes. La filtration des extraits sur colonne séphadex G25 ont montrés un seul pic ; alors que les résultats de séparation sur colonne de séphadex G75 ont montrés un seul pic pour *Opuntia ficus indica* (raquette), deux pics pour *Artemisia absinthium* et *Phoenix dactylifera* et trois pics pour *Opuntia ficus indica* (racine).

L'activité antioxydante (DPPH et Fer ferrique) in vitro des lectines extraites de la plantes *Ephedra alata* est plus élevée par rapport aux autres.

Un autre test a montré que plus la dose employée augmente plus le système immunitaire est stimulé, ce qu'il prouve l'effet qu'exercent les lectines d'*Ephedra alata* sur le système immunitaire.

Mots clés : Lectine, extraction, hémagglutination, système ABO, inhibition, sucres

Laboratoire de recherche : BIOCHIME, ENZYMOLOGIE

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB Y (Pr - UFM Constantine),
Rapporteur : BAHIA (MC - UFM Constantine),
Examineur : DJEMAI ZOUGHLACHE S (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 01/06/2016