



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



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

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

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

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie/Nutrition Moléculaire et Sante

Intitulé :

**Isolement, purification et caractérisation partielle des lectines
à partir des cônes fructifères du Cyprés méditerranéen
(*Cupressus sempervirens*)**

Présenté et soutenu par : Hamouy lamis
Neggar fatima zohra

Le : 06/07/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. *NECIB Y.* (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : Mr. *MEROUANE F.* (MAB- UFM Constantine).

Examineur : Mme. *BENKAHOUL M.* (MCB- UFM Constantine).

*Année universitaire
2016 - 2017*

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant, de nous avoir donné

la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Monsieur **MEROUANE F.** Pour avoir dirigé ce travail, pour toute la compréhension qu'il a montré, la disponibilité et la patience dont il a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, pour sa générosité scientifique pour sa gentillesse, ses conseils précieux et ses encouragements qu'il nous a prodigués tout au long de ce mémoire.*

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

*A notre président du jury Monsieur Pr **NECIB Y.** C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.*

*On veut également remercier Mme **BENKAHOUL M.** On vous exprime notre reconnaissance de nous avoir fait l'honneur d'être l'examinatrice de ce travail.*

MERCI

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux moments difficiles

Ma mère pour m'avoir donnée la vie l'amour et la joie de vivre

Mon père merci pour tout que vous avez fait pour moi

A toute ma famille : mes sœurs et mes frères

A tout mes amis : lamis, Zyneb, Ilhem, Nessrin, Halima, Ismahan,

Rayan, Radia, Nahla et Hadjer.

A tout mes collègues

Enfin, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui

Nous a aidés de près ou de loin durant ce passage.

Fatima Zohra

DEDICACE

*Je remercie **ALLAH** le clément pour avoir m'aidé durant toute ma vie.*

Je dédie ce modeste travail à :

*A ma mère **Rahima** , à qui je dois tellement. Que ceci soit un témoignage de mon Respect, de ma reconnaissance et de tous les sentiments que je lui porte.*

*A mon père **Amar** , en souvenir d'une enfance heureuse.*

*A mes soeurs: **Djouhaina ; Aya ;Ala Elrahman***

*A mes tentes **Sabah et Hadjira***

*A toute la famille **HAMOUY et KHALEF***

*A mes amies **Fahima ; Ibtissem ; Ilhem ; Fatima ; Amal; Zineb ; Ahlem ; Meriem ; et Randa .***

A Tous les professeurs et membres de Départements de biochimie

Hamouy lamis.

Résumé

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capable de reconnaître des glucides, elles sont présentes dans toutes les branches du règne vivant.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans l'extrait des fruits de *Cupressus sempervirens*.

Les lectines extraites de ces fruits montrent une moyenne activité hémagglutinante sur les hématies de lapin.

L'extrait n'a montré aucune sélectivité pour les groupes du système ABO, un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et glycoprotéines et qui a montré que les lectines de *Cupressus sempervirens* présentent une affinité pour la fétuine et le BSA.

Le traitement thermique de lectine à différente température pendant une heure présente une activité maximale entre 40 et 50°C. Elles gardent de leur activité à température moyenne, cette hémagglutination est stable dans une gamme de pH basique entre 6.5 à 8, la purification de l'extrait par filtration sur gel de séphadex G 75 donne 3 pics avec une hémagglutination moyenne.

Mots clés : Lectines, *Cupressus sempervirens*, Extrait, Activité hémagglutinante , Purification, inhibition de l'hémagglutination.

الملخص

الليكتينات هي بروتينات من أصل غير مناعي لها القدرة على التعرف على الكربوهيدرات و الارتباط بها تتواجد في جميع فروع العالم الحي. الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الليكتينات في مستخلص ثمار *Cupressus sempervirens* بواسطة اختبار التراص , يتم استخلاص الليكتينات بإتباع الخطوات التالية : تنظيف تجفيف ثم الطحن للحصول على مسحوق ناعم يوضع هذا الأخير في محلول ملحي , إن نشاط التراص لمستخلص ثمار *Cupressus sempervirens* من 1 إلى (128) , خلال اختبار نظام ABO لاحظنا أن الليكتينات المستخلصة من ثمار *Cupressus sempervirens* لا تملك أي انتقائية اتجاه خلايا دم الإنسان , بالنسبة لاختبار التثبيط مع مختلف السكريات البسيطة و البروتينات السكرية تم اظهار ان الليكتينات *Cupressus sempervirens* تتوافق مع fetuine و BSA .

إن إخضاع الليكتينات ثمار *Cupressus sempervirens* لدرجة حرارة من 30 إلى 90 درجة غير كافي لتثبيطها , فيما يخص, pH نشاط التراص لمستخلص ثمار *Cupressus sempervirens* اقصى في يكون درجة نشا طه في حموضة محصورة بين (6.5 الى 8) , تنقية المستخلص تم بواسطة هلام séphadex G 75 الذي أعطى ثلاث دروات.

الكلمات المفتاحية : الليكتينات, استخلاص, تراسة, مستخلص, التثبيط , انجذاب.

Abstract

Lectins are proteins of non-immune origin capable of recognizing carbohydrates, they are present in all branches of the living kingdom.

The aim of this work is to investigate the presence of lectins in the extract of the fruit of *Cupressus sempervirens*.

The lectins extracted from these fruits show a strong haemagglutinating activity on rabbit red blood cells.

The extract showed no selectivity for the groups of the ABO system, An inhibition test was subsequently carried out with different monosaccharides and glycoproteins and showed that *Cupressus sempervirens* lectins exhibit an affinity for fetuin and BSA.

The heat treatment of lectin at different temperatures for one hour has a maximum activity between 40 and 50 ° C, They retain their activity at Average temperature.

They retain their activity at high temperature, this hemagglutination is stable in a range of basic pH between 6.5 and 8.

The purification of the extract by sephadex G 75 gel filtration gave a 3 peaks with medium haemagglutination.

Key words: Lectins, *Cupressus sempervirens*, Extract, Haemagglutinating activity, Purification, inhibition of haemagglutination.

SOMMAIRE

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre I : les lectines

<i>Introduction</i>	1
1. Définition des lectines	3
2. Historique	3
3. Nomenclature	5
4. La structure des lectines	5
5. Mode d'action des lectines	7
6. Spécificité et affinité des lectines Sources des lectines	8
7. Sources des lectines	9
8. Activités biologiques des lectines végétales.....	13
9. propriétés des lectines	13
10. intérêt pour l'homme	16

Chapitre II : Généralité sur Cupressus sempervirens

1. Caractéristiques générales de la plante.....	17
1.1 Généralités.....	17
1.2 Classification scientifique.....	18
1.3 Historique et origine	18
1.4 Distribution	18
1.5 Caractéristiques botaniques	20
1.6 Caractéristiques écologiques	22
2. les Utilisations médicinales de cyprès	23
2.1 Les cônes fructifères.....	23
2.2 Les rameaux.....	23

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	25
2. Protocol d'extraction des lectines à partir de <i>Cupressus sempervirens</i>	25
3. Test d'hémagglutination.....	26
3.1. Préparation des hématies de lapin.....	27
3.2. Test d'hémagglutination (détermination du point d'équivalence).....	27

3.3. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO.....	27
4. Test d'inhibition de l'hémagglutination des lectines par les saccharides	28
5. Caractérisation des lectines.....	28
5.1. Effet de la température sur l'hémagglutination.....	28
5.2. Effet du pH sur l'hémagglutination.....	28
6. Purification des lectines	28
6.1. Préparation du gel Sephadex G 75.....	29
6.2. Purification des lectines sur gel Sephadex G 75.....	29
7. Dosage des protéines	29

Chapitre IV: Résultats et discussion

1. Test d'hémagglutination de l'extrait brut	30
2. La limite de l'activité hémagglutinante de l'extrait	30
3. Effet de la température sur hémagglutination.....	31
4. Effet du pH sur l'activité hémagglutinante	32
5. La chromatographie de la purification des lectines sur colonne gel séphadex G75....	33
6. Dosage de protéines par la méthode Bradford (1976).....	35
7. Test d'inhibition de lectine par les saccharides.....	35
8. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.....	37
Conclusion générale et perspective.....	39

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

RIP : protéines inactivantes de ribosome

Con A : Concavaline A

Man : Mannose

His : Histidine

Asn : Asparagine

Arg: Arginine

Glu : Glucose

Gal : Galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

GlcNAc : N-acétylglucosamine

Fuc : fucose

NeuAc : acide N-acétylneuraminique

PBS: Phosphate Buffer Saline

KH₂PO₄: Phosphate mono Potassique

K₂HPO₄ : hydrogénophosphate de dipotassium

pH : Potentiel Hydro isoélectrique

BSA: Bovine sérum albumine

UH: Unité hémagglutinante

KDa: Kilo Dalton :

NaCl : Chlore de Sodium.

Trs/mn : Tours par minute

V0 : Volume mort

Liste des tableaux

Tableau 01 : Histoire des lectines	4
Tableau 02 : La spécificité osidique de certaines lectines végétales	8
Tableau 03 : Lectines dans différents tissus végétaux avec des activités biologiques distinctes	9
Tableau 04 : Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses	12
Tableau 05 : Absorbance a longueur d'onde 595nm	35
Tableau 06 : Inhibition d'héماغglutination de la lectine par les saccharides.....	36
Tableau 07 : L'agglutination des hematies par l'extrait brut des cônes fructifères	37

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Structure de la première lectine Concanavoline A	5
Figure 02: Représentation graphique d'un monomère de Concanavoline A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannoside.....	6
Figure 03 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique.....	7
Figure 04: Site de reconnaissance de la galectine-7 humaine (<i>Homo sapiens</i>) en complexe avec le D-galactose	7
Figure 05 : Classification des lectines végétales proposée par <i>Peumans</i> et <i>Van Damme</i>	11
Figure 06 Hémagglutination des érythrocytes.....	14
Figure 07 : Inhibition des lectines par les sucres.....	17
Figure 08 : <i>Cupressus sempervirens L</i>	19
Figure 09 : Aire de répartition du <i>Cupressus sempervirens L</i>	21
Figure 10 : Cyprès vert	22
Figure 11 : Etapes de formation des graines <i>cupressus sempervirens L</i>	25
Figure 12 : Fruits du <i>Cupressus sempervirens L</i>	26
Figure 13 : Schéma représentatif de différentes étapes de l'extraction du <i>Cupressus sempervirens L</i>	30
Figure 14 : Agglutination des hématies du lapin par l'extrait du <i>Cupressus sempervirens L</i>	31
Figure 15 : Agglutination des hématies du lapin test de limite	32
Figure 16 : Effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait brut.....	33
Figure 17 : Effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait brut.....	33
Figure 18 : Courbe représentant la concentration des protéines dans chaque fraction.....	34
Figure 19 : Test d'hémagglutination des fractions après la chromatographie	34
Figure 20 : Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante de <i>Cupressus sempervirens</i> par les sucres	36
Figure 21 : Agglutination des hématies humaines par l'extrait brut de <i>Cupressus sempervirens</i>	37

Introduction

Introduction

Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides. Elles interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (par exemple lors de réponses immunitaires, et d'infections). **(Amit, 2016).**

Les premières lectines découvertes chez les plantes sont la ricine (présente dans les extraits de *Ricinus communis*) et l'abrine (obtenue à partir d'extraits d'*Abrus precatorius*), par Peter Hermann Stillmark en 1888, elles sont capables d'agglutiner des cellules sanguines et sont des protéines inactivantes de ribosome (RIP) **(Santos et al., 2014).**

Après cette découverte plusieurs lectines sont isolées et purifiées essentiellement à partir des plantes et sont considérées actuellement comme les principales sources des purification des lectines, elles contiennent souvent des quantités importantes de ces dernières **(Rostislav et al., 2016) .**

Les lectines végétales ont un rôle essentiel dans la défense contre les microorganismes pathogènes et les virus, les insectes, les nématodes et les prédateurs d'herbivores, et sont impliquées aussi dans l'organisation cellulaire, la protection cellulaire, les mécanismes de croissance de la paroi cellulaire, et la mitose induite **(Santos et al., 2014).** En raison de leurs propriétés biologiques les lectines aujourd'hui s'appliquent dans différents domaines biotechnologiques et médicales comme les applications anti tumorales exemple : les cellules de cancer du sein traitées par l'hémagglutinine *Pseudomonas aeruginosa* **(Sze et Tzi, 2011).**

Elles peuvent induire la mort de cellules cancéreuses en ciblant les voies de mort cellulaire programmées et sont donc considérés comme un agent anticancéreux prometteur pour une future thérapie contre le cancer **(Zheng et al., 2016).** Elles sont aussi exploitées pour d'autres activités biologiques, telles que les activités antifongiques, antivirales.

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est aussi lié sans doute à leur capacité unique de lire l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont des récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire.

L'étude des lectines peut être divisée en deux parties principales :

- a) la caractérisation des propriétés chimiques et biochimiques de ces protéines *in vitro*,
- b) l'étude des fonctions biologiques *in vivo*.

Les travaux de recherche de ce mémoire s'inscrivent dans cette volonté de mettre en évidence de nouvelles molécules bioactives d'origine protéique à partir d'une espèce végétale représentative de la flore méditerranéenne: le cyprès méditerranéen (*Cupressus sempervirens*). Le choix de cette plante est motivé par le fait qu'aucune étude ne s'est intéressée à l'extraction des lectines à partir des fruits de cette dernière.

L'objectif de ce travail se décompose en plusieurs étapes :

- Extraction et mise en évidence des lectines à partir des graines de *Cupressus sempervirens* ;
- Etude de la spécificité glucidique des lectines extraites ;
- Purification et caractérisation partielle de ces molécules ;

Etude bibliographique

Chapitre 1:
les lectines

1. Définition

Le mot lectine dérivé du verbe latin *legere* qui veut dire « sélectionner » ou « choisir ». Ce sont des groupes de protéines d'origine non-immune qui s'attachent spécifiquement et de façon réversible aux sucres et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats (**Gianluca, 2006**). Ce sont des glycoprotéines constituées de sous-unités avec des masses moléculaires entre 25 et 35 kD disposées sous forme de dimères ou de tétramères (**Steven, 1996**). Ces protéines sont des molécules ubiquitaires qui possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment : l'agglutination des cellules, l'activité mitogène les effets mimétiques des hormones, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antivirales et les effets immunologiques. Ces diverses propriétés sont à la base de l'utilisation des lectines dans les domaines biomédical (hématologie, immunologie, cancérologie, biologie cellulaire) et agronomique (défense des plantes contre les agents pathogènes) (**Meite et al., 2010**). Les lectines ont été appelées aussi hémagglutinines, ou phytoagglutinines, car elles ont été trouvées à l'origine dans des extraits de plantes (**Sharon et lis., 2004**).

2. Historique

La présence des protéines agglutinantes est connue depuis le début du 19^{ème} siècle, ces protéines cellulaires spécifiques au sucre ont été nommées lectines, la première découverte de ces molécules était par Peter Hermann Stillmark dans sa thèse de doctorat présentée à l'Université de Dorpat à partir de l'extrait de graines de castor (*Ricinus communis*) qui a été nommé ricin (**Sharon et lis., 2004**), ensuite d'autres découvertes ont suivies, les scientifiques ont essayés de tester d'autres espaces comme *P. Ethrlichea* qui a montré la même activité dans l'extrait du pois rouge (*Abrus precatorius*).

En 1919 James B. Sumner de l'université Cornell a isolé la première lectine, c'était la première fois qu'on a obtenu une hémagglutinine pure, la concavoline A, qui a été isolée à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) (**Sharon et lis., 2004**).

Après cette découverte Sumner et Howell ont continué à travailler sur la concavoline A et en 1936 ont montré que le glycogène peut être précipité entièrement par un excès de concavoline A, mais elle se dissout en excès de glycogène ce qui décrit la spécificité des lectines pour la première fois. (**Sumner et Howell., 1936**).

En 1954, des études par 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**). Après 3 ans, O. Mäkelä a réalisé une étude sur des extraits de graines de 743 espèces de légumineuses différentes, il a mis en évidence qu'un peu plus d'un tiers de ces extraits possèdent une activité hémagglutinante et qu'environ un dixième d'entre eux révèlent une spécificité envers les groupes sanguins A, B ou O.

Tous ces découvertes jouent un rôle essentiel dans les études structurales et fonctionnelles des lectines (**Poiroux, 2011**). (**Tableau 01**).

Tableau 01: Histoire des lectines (Renato et al., 1991).

Année	Auteur	Découvertes
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' <i>Abrus Precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalline A
1926-1927	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-1949	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hémagglutinines
1949	Liener and 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 nomenclature

En 1965 Prokop et Uhlenbruck ont proposé une nomenclature basée sur la sérologie des groupes sanguins et sur la nomenclature binomiale des espèces pour classer et désigner les lectines par un système d'abréviations.

La plupart des lectines ont également été désignées par les initiales des noms de genre et d'espèce des plantes dont elles étaient issues suivies de la lettre A (pour agglutinine) ou L (pour lectine).

Exemple : PsA ou PsL pour la lectine du Pois (*Pisumsativum*), Db A ou DbL pour la lectine du Dolique (*Do lichosbiflorns*) (houles, 2001)

4. La structure des lectines

Dans les années 1970 les études ont été concentrée sur les propriétés moléculaires des lectines pour une compréhension approfondie de leurs activités au niveau moléculaire (Kumar et al., 2012).

En 1972 ils ont pu de cristalliser la première structure d'une lectine la concavaline A qui a été déterminée par diffraction des rayons X, depuis cette date à nos jours, plus de 500 structures cristallines de lectines ont été déterminées (Gianluca, 2006).

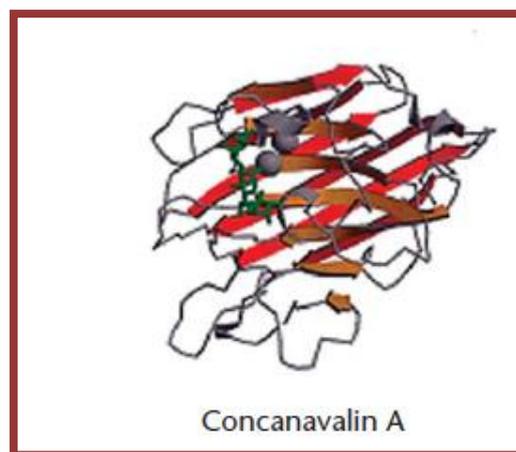


Figure 01 : Structure de la première lectine concanavaline A (Sharon et lis., 2004).

En fonction de leur structure ; les lectines sont classées en deux grandes classes :

- **Les lectines simples**

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 41 kDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose) (*zitouni, 2015*).

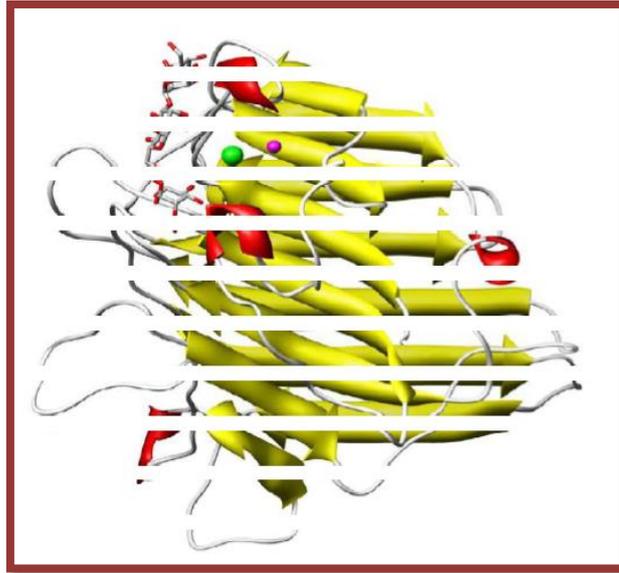


Figure 02 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *Canavalia ensiformes* en complexe avec le trimannoside (**Lenka, 2006**).

- **Les lectines en mosaïque**

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (*zitouni, 2015*).

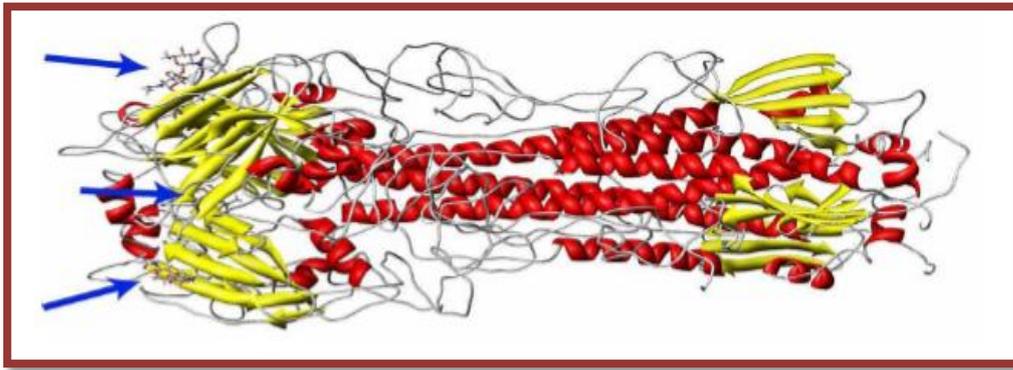


Figure 03 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (Lenka, 2006).

5. mode d'action 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. Seules les liaisons hydrogènes sont impliquées dans l'interaction du sucre avec la protéine (Lenka, 2006).

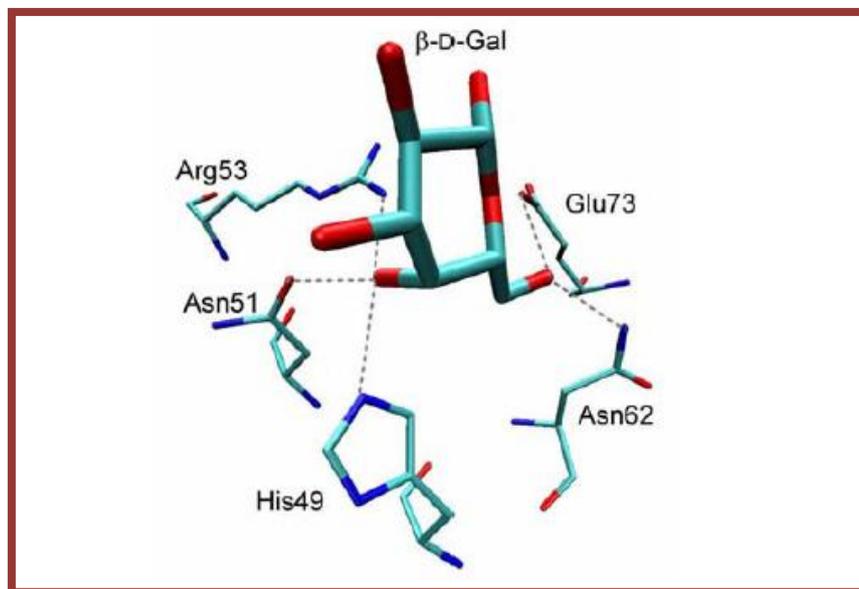


Figure 04 : Site de reconnaissance de la galectine-7 humaine (Homo sapiens) en complexe avec le β -D-galactose (Lenka, 2006)

6. La spécificité et l’affinité des lectines

La spécificité des lectines est la capacité de différents sucres monosaccharides, oligosaccharides ou glycopeptides à inhiber soit l’hémagglutination soit la précipitation de polysaccharides (ou glycoprotéines) par la lectine mais la majorité de celles-ci ne reconnaissent que quelques-uns des sucres existant dans la nature. (Charon, 2009).

Les lectines se divisent en deux catégories celles qui présentent une affinité pour les monosaccharides et l’autre pour les oligosaccharides mais l’affinité pour les monosaccharides est plus faible que les oligosaccharides.

En fonction de leur spécificité, les lectines qui ont une affinité pour les monosaccharides sont classées dans les cinq groupes suivants: mannose (Man), galactose (Gal) / N-acétylgalactosamine (GalNAc), N-acétylglucosamine (GlcNAc), fucose (Fuc), et acide N-acétylneuraminique (NeuAc) (Charon, 2009).

Tableau 02 : La Spécificité osidique des lectines de certaines plantes (Baracate, 2016)

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

7. sources des lectines

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants.

Les plantes sont une source riche de lectines et constituent la principale source (**Santos et al., 2014**).

7.1. Les lectines végétales

On obtient également les lectines végétales à partir pratiquement de toutes sortes de tissus végétatifs, comme les écorces, les feuilles, les tiges, les fruits et les racines. Lorsqu'ils sont isolés de la même famille et du même tissu, ils sont structurellement similaires, mais peuvent avoir des spécificités différentes (**Santos et al., 2014**).

Tableau 03 : Lectines dans différents tissus végétaux avec des activités biologiques distinctes (**Santos et al., 2014**).

Les tissus	Activités biologiques
Des graines	Propriétés d'agrégat anticoagulant et antiplaquettaire; Activités coagulantes, mitogènes, antibactériennes, antifongiques et anti tumorales
Écorce	Activités antifongiques et insecticides
Le bois de cœur	Activité termiticide
Tige	Activités antivirales et induisant l'apoptose
Feuilles	Activités antivirales, antibactériennes et antifongiques
Fruits	Activités mitogènes et antiviraux
Les racines	Activités antifongiques et termiticides
Tubéreux	Activités insecticides et anti tumorales
Ampoules	Activité protéolytique
Rhizomes	Activités antiprolifératives, immunostimulantes, antivirales, antifongiques, anti tumorales et induisant l'apoptose

7.1.1. Classification des lectines végétales

Peumans et Van Damme (1995) ont proposé une classification des lectines végétales en quatre groupes (mérolectines, hololectines, chimerolectines et superlectines) qui prend en compte leurs structures moléculaires mais aussi leur réactivité (nombre de sites fonctionnels) (**houles, 2001**).

➤ **Les Mérolectines**

Ce sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides (exemple : héveine, protéines d'orchidées) (**Doumbia, 2005**). Ce sont aussi de petites protéines monovalentes incapables de précipiter des glycoconjugués ou des cellules agglutinantes (**Santos et al., 2014**).

➤ **Les hololectines**

Contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides dont deux ou plusieurs sont identiques ou très similaires, Cette classe comprend toutes les lectines qui ont plusieurs sites de liaison et sont capables d'agglutiner des cellules ou de précipiter des glycoconjugués. (**Santos et al., 2014**). La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines (**Doumbia, 2005**)

➤ **Les chimerolectines**

Possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chimerolectines se comportent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (**Doumbia, 2005**)

➤ **les superlectines**

Elles sont constituées de molécules avec deux ou plusieurs domaines distincts de liaison aux glucides (**Santos et al., 2014**).

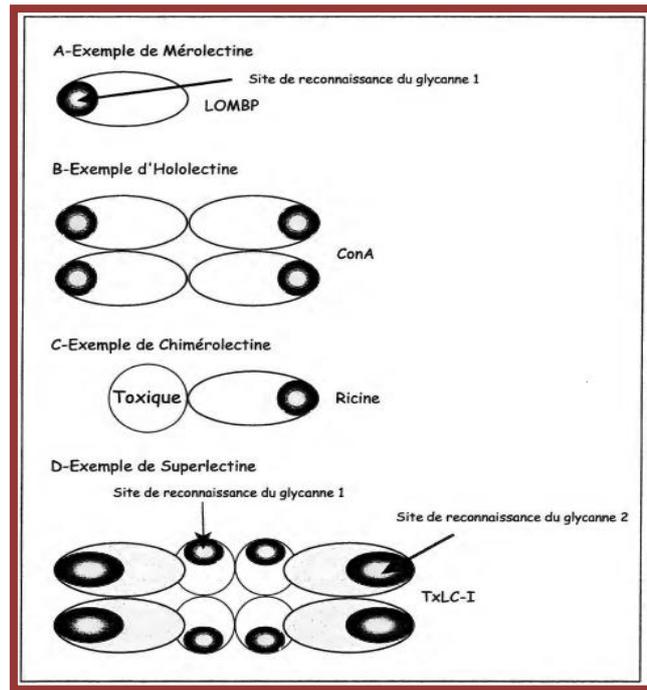


Figure 05 : Classification des lectines végétales proposée par Peumans et Van Damme (1995)(houles, 2001)

Cette classification est basée sur la structure globale des lectines.

A) Les mérolectines possèdent un seul site de reconnaissance des glycanes.

B) Les hololectines possèdent au moins deux sites de reconnaissance identiques des glycanes.

C) Les chimérolectines sont des protéines de fusion constituées d'une chaîne polypeptidique liant les glycanes associée en tandem avec une chaîne polypeptidique ayant une activité biologique ou catalytique.

D) Les superlectines sont des protéines ayant deux sites de reconnaissance des glycanes de spécificité différente (houles, 2001)

Il existe d'autres classifications des lectines végétales selon différents critères moléculaires on peut classer les lectines des plantes en 7 familles :

- Les lectines de Légumineuses
- Les lectines mannose-spécifiques de Monocotylédones
- Les lectines chitine-spécifiques composées de domaine hévéine
- Les lectines RIP de type 2
- Les lectines apparentées à la jacaline
- Les lectines de la famille des Amaranthaceae
- Les lectines du phloème des Cucurbitaceae (houles, 2001).

➤ **Les lectines de Légumineuses**

Les lectines de légumineuses comprennent la plus grande famille de protéines de cette classe, avec environ 200 membres. Ils sont tous constitués de deux ou quatre sous-unités presque identiques de 25-30 kDa, chacune avec un seul site de combinaison de glucides et un Ca²⁺ + et un Mn²⁺ + par sous-unité qui sont essentiels pour la liaison des glucides (**Charon, 2009**).

Ces protéines peuvent être présentes dans les graines, feuilles, tiges et racines des végétaux (**Raquel, 2012**)

Les possibilités d'utilisation des lectines de légumineuses comme outils biotechnologiques sont considérables au vu du grand nombre d'études scientifiques démontrant les activités biologiques de ces molécules (**tableau 04**).(Raquel, 2012)

Tableau 04 : Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses (**Raquel, 2012**)

<i>Lectine</i>	<i>Rôle</i>
Dgui (<i>Dioclea guianensis</i>)	Activité antifongique
ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>), CFL (<i>Cratyliafloribunda</i>), Dgui, DGL (<i>D. grandiflora</i>), Dvir (<i>D. Virgata</i>)	Effet toxique sur les Mollusques
CGL (<i>Canavaliagladiata</i>)	Activité anti-inflammatoire et Analgésique
ConBol (<i>Canavaliaboliviana</i>)	Activité antinociceptive
ConBr, CGL, ConM (<i>Canavaliamaritima</i>)	Effet vasodilatateur
ConM	Relaxation de l'aorte et libération d'oxyde nitrique
ConBr, DGL, DVL (<i>Diocleaviolacea</i>)	Activation des lymphocytes
ConBr	Activité antidépresseur
ConA (<i>Canavalia ensiformes</i>), ConBr, CFL, DVL, DGL	Interférence dans le processus de formation des biofilms microbiens

➤ **Lectines de céréales**

Une autre famille de lectines végétales est celle des céréales, dont un exemple important est l'agglutinine du germe de blé (WGA). Les lectines de cette famille sont toutes spécifiques

pour la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylauraminique et se composent également de deux sous-unités identiques, mais elles diffèrent nettement de celles des légumineuses. Elles sont exceptionnellement riches en cystéine et elles sont dépourvues de métaux (**Charon, 2009**)

8. Rôles biologiques des lectines végétales dans les plantes

Depuis la découverte des lectines des plantes, les scientifiques se sont posé de nombreuses questions quant à leur rôle dans les plantes. Il semblerait qu'elles n'agissent uniquement dans cette dernière mais qu'elles puissent aussi interférer avec les glycoconjuguées d'autres organismes. Il est ainsi probable que les lectines jouent un rôle dans la défense des plantes

- Les lectines jouent un rôle important dans la protection de la plante contre les prédateurs en affectant la croissance et le développement des insectes et en présentant des toxines aux herbivores. Certaines lectines sont toxiques exemple : la lectine extraite à partir de graines de *Dialium guineense*.
- Les lectines végétales sont de puissants inhibiteurs des virus animaux et humains exemple : La lectine de l'alga verte *Boodleacoacta* (BCA) qui a inhibé le VIH-1.
- Les lectines ont la capacité de se lier spécifiquement aux hyphes fongiques et de prévenir la consommation de nutriments et l'incorporation des précurseurs requis pour la croissance du champignon.
- Effet anticoagulant la lectine isolée à partir de graines de *M. oleifera* (cMoL) agit comme une protéine anticoagulante sur des échantillons de sang in vitro.
- Activités insecticides exemple : *Ostrinia nubilalis* et *Diabrotica undecimpunctata* se nourrissent sur le maïs. La lectine du blé et la lectine des graines *Bauhinia purpurea* ont des effets létaux pour ces deux insectes. (**Santos et al., 2014**).

9. Propriétés des lectines

9.1 Liaison avec les sucres

Les lectines sont, dans la plupart des cas, di ou multivalentes et peuvent interagir avec des hydrates de carbone ou des glycoprotéines en solution ou liées à des membranes cellulaires et leurs sites de liaison interagissent avec des cellules formant différents liens réversibles (**Santos et al., 2014**).

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules, cette caractéristique est typique des lectines (Karoline, 2008)

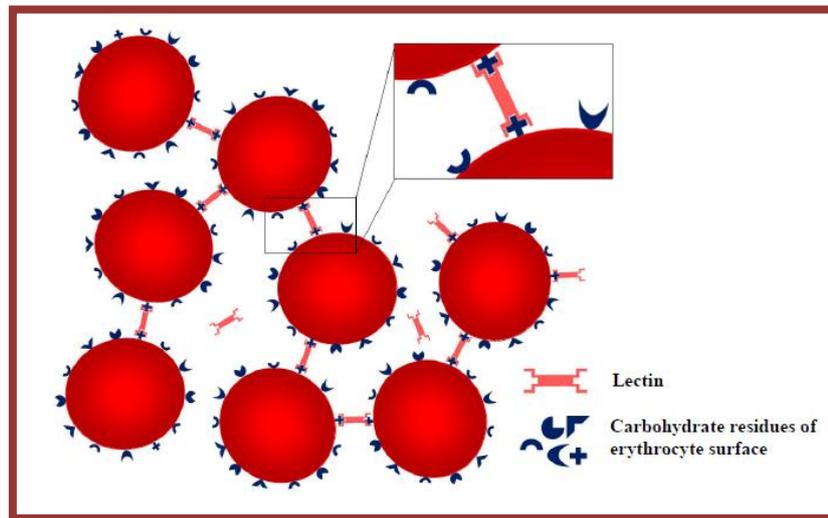


Figure 06 : l' Hémagglutination des érythrocytes (Santos et al., 2014).

Cette caractéristique est typique des lectines Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation. Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (Karoline, 2008)

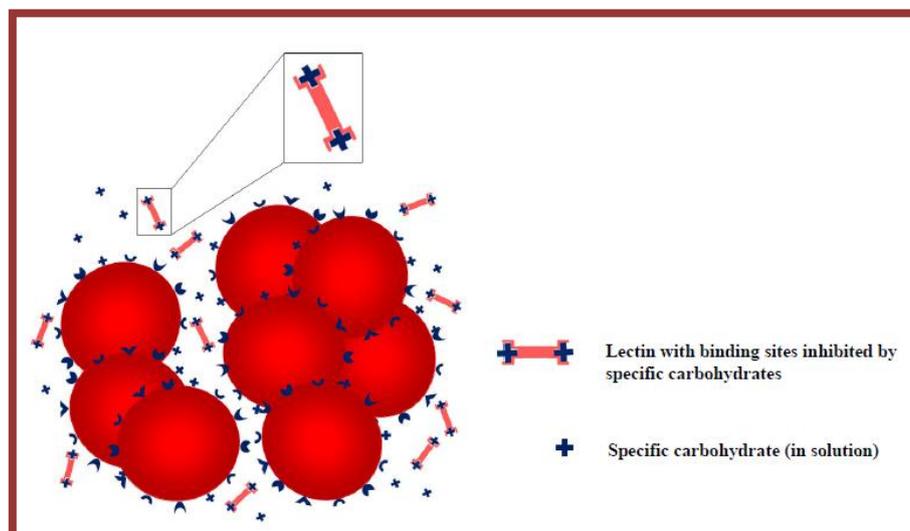


Figure 07 : Inhibition des lectines par les sucres (Santos et al., 2014).

9.2 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 (**Baracate, 2016**)

9.3 Activité mitogène

En 1960, P.C. Nowel caractérisait le pouvoir mitogène de certaines lectines montrant qu'elles étaient capables d'induire la transformation blastique, de transformer les lymphocytes en lymphoblastes et d'en induire la mitose. (**Zentero, 1986**)

L'une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Ramata, 2010**).

9.4 Effets mimétiques des hormones

Les lectines des graines de 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. De même les lectines des graines de *Momordica charantia* comme diverses autres lectines possèdent des activités antilipolytiques et lipogénique (activités insuline-like) à cause de son interaction avec les récepteurs d'insuline des adipocytes (**Ramata, 2010**).

9.5 Activité antivirale

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

9.6 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Les travaux de Valentier et coll. (2003) suggèrent que les lectines pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme *in vitro*. Quant à Banwell et

coll. (1983), ils montrent que les lectines des graines de haricot rouge provoquent l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses (**Ramata, 2010**).

9.7 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 l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes les effets pro et anti-inflammatoires l'induction de l'apoptose (**Ramata, 2010**).

10. intérêt des lectines pour l'homme

Les lectines sont une classe spéciale de protéines largement distribuées dans la nature, qui reconnaissent sélectivement et se lient de manière réversible aux glucides et aux glycoconjugués à travers leurs sites de liaison, ces protéines sont des molécules prometteuses en tant que médicaments pour le traitement et pour le diagnostic de maladies humaines (**Santos et al., 2014**).

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

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation
- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.
- Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires
- Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histo-chimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycannes présents sur les cellules (**Karoline, 2008**).

Chapitre:2
Cupressus sempervirens

1. les caractéristiques générales de la plante « *cupressus sempervirens* »

1.1. Généralités

Le nom *Cupressus* est d'origine latine il désigne le genre de cette plante ; certains pensent aussi qu'il viendrait de *cyprès* qui indique son origine chypriote et l'espèce *sempervirens* signifie : toujours, vert «*semper*» traduit toujours et «*virens*» l'adjectif vert (Riom, 2010).

Cupressus sempervirens L., connu sous le nom de cyprès méditerranéen ou commun, est un arbre de conifères de taille moyenne et à feuilles persistantes caractérisé par une forme de couronne très variable, de la colonne à la propagation, du feuillage vert foncé et des petits cônes brun ovoïdes. Ses habitats naturels sont les montagnes semi-arides autour du bassin de la Méditerranée orientale et du Moyen-Orient (Caudullo, 2016).



Figure 08 : *Cupressus sempervirens* L

1.2. Classification scientifique

- ❖ *Règne: Plantae*
- ❖ *Sous- Règne : Viridiplantae*
- ❖ *Embranchement :Tracheophyta*
- ❖ *Sous-embranchement : Spermatophytina*
- ❖ *Classe : Pinopsida*
- ❖ *Sous-classe :Pinidae*
- ❖ *Ordre :Pinales*
- ❖ *Famille :Cupressaceae*
- ❖ *Genre : Cupressus*
- ❖ *Espèce : Cupressus sempervirens (Esmail, 2016)*

1.3 Historique et origine

Au début de ce siècle, des peuplements spontanés de Cyprès ont été découverts. Il y a eu le *Cupressus dupreziana* au Tassili et le *Cupressus atlantica*. Ces deux espèces ont été, à un moment confondu avec le *Cupressus sempervirens*, ce n'est qu'après des études botaniques approfondies qu'il y a eu différenciation des trois espèces.

STEWART (1969) pense qu'à l'origine il y a eu une seule espèce de *Cupressus* qui recouvrait toute la zone méditerranéenne. La différenciation entre le Cyprès vert, le Cyprès du Tassili et le Cyprès de l'Atlas s'est faite au cours du temps et serait due à l'influence du milieu. **(Nichane, 2015).**

1.4 Distribution

On ne connaît pas exactement l'aire naturelle de Cyprès qui a été depuis très longtemps, planté sur tout le pourtour du bassin méditerranéen. Il est vraisemblablement spontané dans les montagnes du nord de l'Iran et sans doute aussi en Asie mineure. Pour certains auteurs, il serait originaire de l'île de Chypre et de là, il serait propagé en Grèce, Turquie.

En France, le Cyprès a été planté et se trouve dans toutes les régions côtières allant des Alpes aux Pyrénées.

En Grèce, le Cyprès pousse du niveau de la mer jusqu'à la limite de la végétation (1750 m au dessus du niveau de la mer en Crète) et constitue des forêts naturelles en Crète, à Samos, Rhodes, Kos, Simi et Millos.

En Espagne, le *Cupressus sempervirens*, a été introduit seulement récemment et les espèces les plus vieilles ont environ 150 ans.

En Italie, nous ne trouvons pas de forêts naturelles de Cyprès. Des Cyprès de petite dimension se trouvent sur les collines de la côte de la mer Tyrrhénienne, de la Ligurie à la Calabre et en Sicile ; celles plus vastes et productives, sont localisées en Italie centrale, surtout en Toscane près de Florence, de Sienne et de Pise. Dans le Nord de l'Italie, le Cyprès se trouve principalement sur les rives des lacs.

Au Portugal, le *Cupressus sempervirens* n'est pas très diffusé. Il serait très anciennement naturalisé partout ailleurs. Quoi qu'il en soit, en Afrique du Nord et tout particulièrement en Algérie, il se comporte actuellement comme une essence autochtone, très bien adaptée à nos climats secs. Il en existe deux formes, souvent présentes dans le même lot de plants : la forme *fastigiata* à cime étroitement conique et la forme *horizontalis* à branches étalées

(Nichane, 2015).

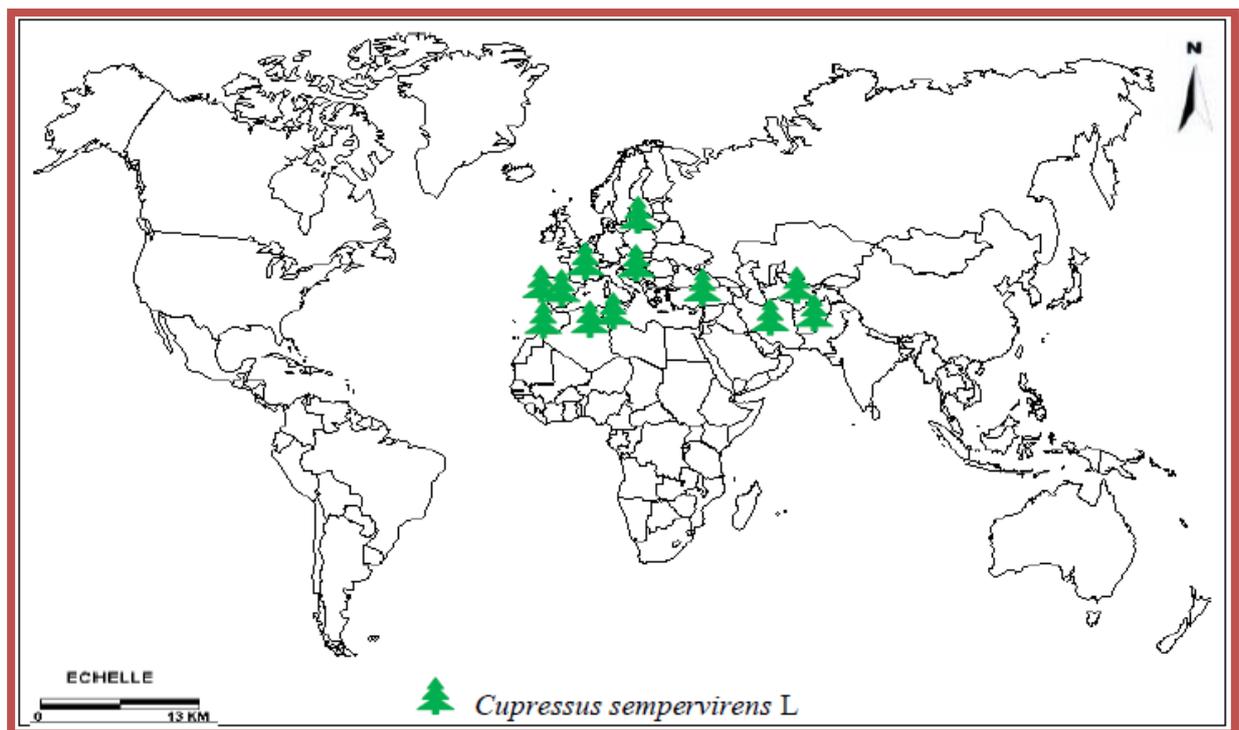


Figure 09 : Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L (Nichane, 2015).

1.5 Caractéristiques botaniques

Catégorie : arbre (conifère) à grande longévité, monoïque et thermophile, au tronc rectiligne à l'écorce d'un gris brunâtre fibreuse et striée verticalement, les rameaux écailleux sont bruns

Port : élancé, conique, en étroite colonne compact et dense.

Feuillage : persistant, aromatique, vert foncé. Sur de courtes ramules, petites feuilles glanduleuses (glandes résinifères), squamiformes, imbriquées sur au moins 4 rang à la pointe émoussée.

Fleurs coniques : à l'extrémité des rameaux, chatons mâles jaune à brun clair chargés en pollen pouvant être allergisant (en février – mars), les femelles globuleux verts réunis en bouquet à l'extrémité des jeunes pousses.

Cônes fructifères : Les cônes sont strobiles, globulaires, vertes (3 à 4 cm) et brillantes, légèrement mucronées à 6 – 14 écailles ligneuses polygonales d'un brun clair à brun foncé à maturité (tous les deux ans), contenant de nombreuses graines ailées.

Taille : l'arbre a une taille moyenne de 20 à 30 m. On distingue différentes formes de Cyprès qui par sélection, ont donné des variétés aujourd'hui bien distinctes reproduites par bouturage. On distingue notamment une forme aux branches horizontales et houppier conique : *Cupressus sempervirens* « horizontalis » et une forme colonnaire qui forme un fuseau plus ou moins étroit : *Cupressus sempervirens* « pyramidalis » ou « stricta ».

Graines : les graines sont petites, mesurant de 4 à 7 mm de long. Elles portent deux ailes, de part et d'autre de la graine.

Floraison : au début du printemps, la production importante de pollen est la cause, tous les ans, de nombreuses allergies. Certaines variétés produisent beaucoup de fruits, ce qui peut nuire à l'esthétique de l'arbre, notamment chez les formes colonnaires, en provoquant une arque des branches. Certaines variétés ont été sélectionnées pour leur capacité à former moins de fruits. La pollinisation est anémogame (pollen transporté par le vent).

Pollen : les graines de pollen de Cupressacées sont morphologiquement très homogènes. Il est donc impossible de réaliser des déterminations polliniques au niveau du genre ou de l'espèce. Le genre *Cupressus* pollinie abondamment en février – mars. Le Cyprès a un pollen au pouvoir allergisant, lorsqu'ils sont en trop grande quantité dans l'atmosphère, ils peuvent provoquer l'apparition d'allergies.

Multiplication : se fait par semis au printemps après avoir pris soin de conserver les graines au froid durant 3 mois (pour respecter la dormance), bouturage en fin d'été. (Nichane, 2015).

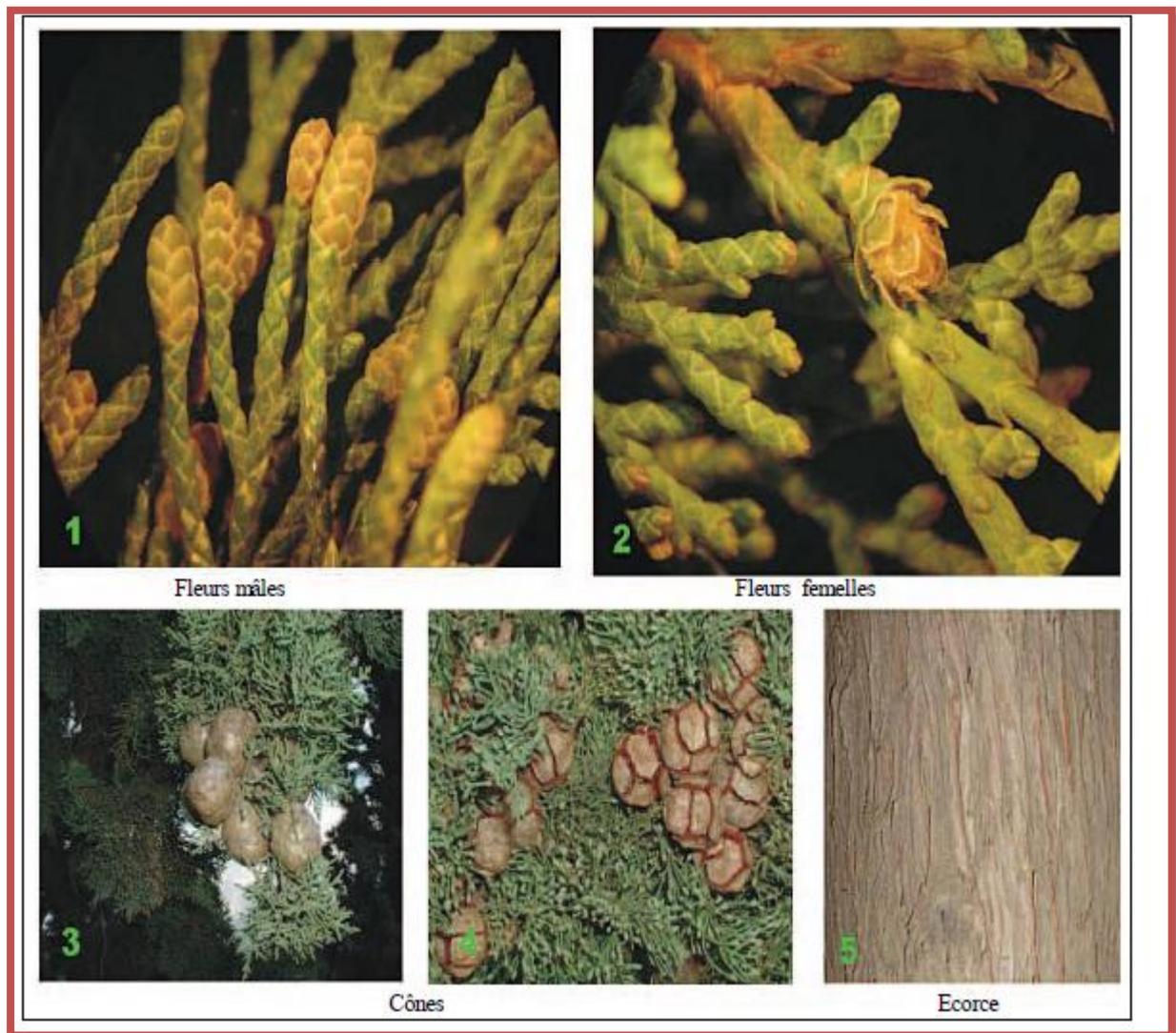


Figure 10 : Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L) (Nichane, 2015).

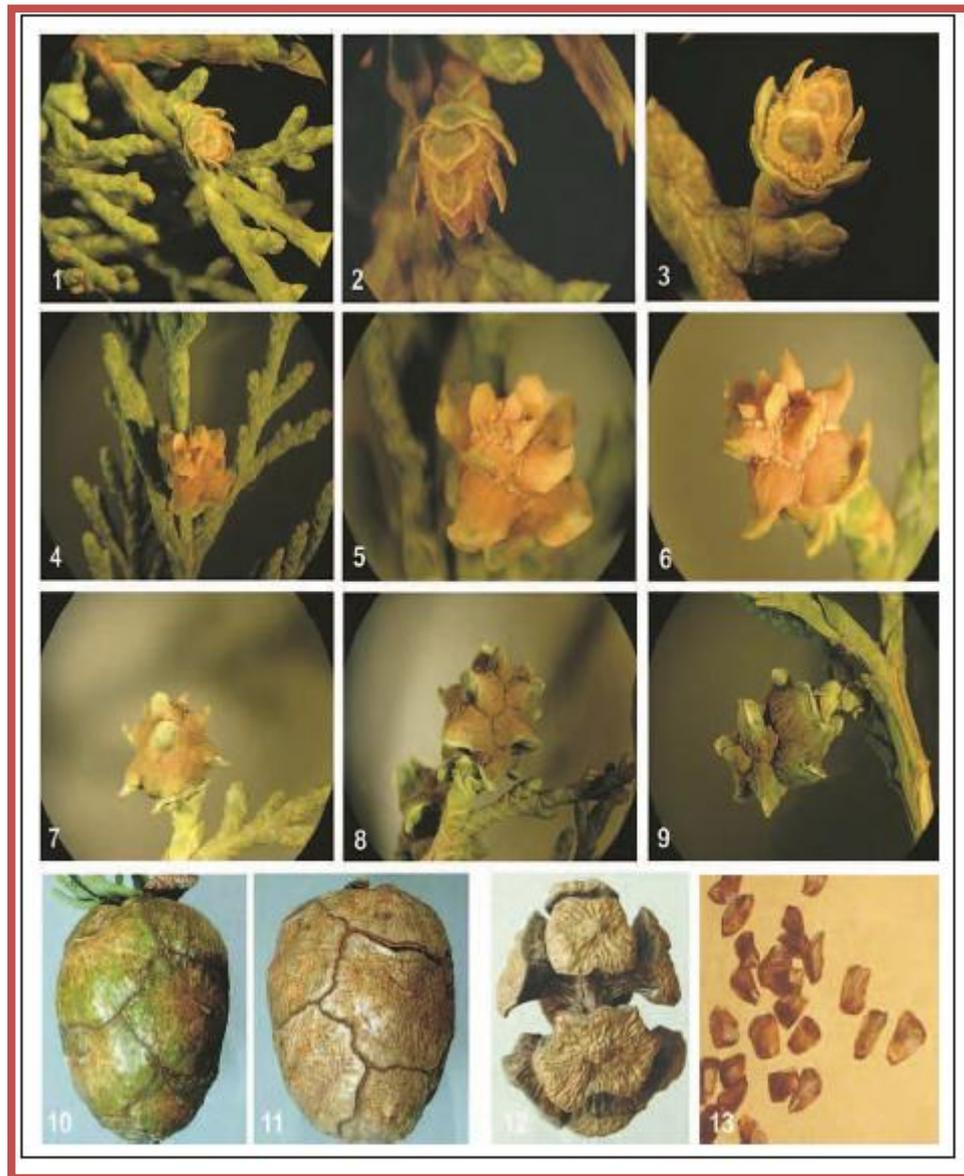


Figure 11: Etapes de formation de la graine du *Cupressus sempervirens* L (Nichane, 2015).

1- 2- 3 : Phase initiale avec exposition des ovules.

4- 5- 6 : Premières phases de la fécondation.

7- 8- 9 : Grossissement des carpelles et formation du jeune cône.

10- 11- 12- 13 : Développement du cône jusqu'à l'ouverture et à la production de la graine.

1.6 Caractéristiques écologiques

Le Cyprès est une plante de climat doux. Il a besoin de chaleur ; il doit être protégé des vents froids. Il peut résister à des températures négatives allant jusqu'à -20°C .

Température : du point de vue thermique, le Cyprès peut résister à une température jusqu'à – 20°C. Comme beaucoup de plantes méditerranéennes, c'est le froid humide en hiver qui peut être préjudiciable à sa longévité.

Précipitation : le Cyprès est une essence xérophile, car c'est un arbre robuste susceptible de s'adapter à des conditions physiques très sévères. Mais il peut être plastique, c'est-à-dire qui peut se développer dans des climats humides. En effet, le Cyprès est un arbre qui n'a pas d'exigence pluviométrique et peut se contenter de 250 à 350 mm / an.

Altitude : le Cyprès vert se rencontre spontanément dans toutes les zones basses du pourtour méditerranéen à moins de 500 m d'altitude. On les trouve souvent en limites de zones agricoles ou en alignement dans les parcs ou les propriétés où leur forme particulière en fuseau marque les paysages.

Sol : il est indifférent à la nature chimique du substrat. Il préfère les sols profonds, drainés, si non ras même sec et calcaire. Il supporte mal les terres argileuses ou trop gorgées d'eau. Néanmoins, le Cyprès vert tolère les sols superficiels (moins de 50 cm, voire 30cm) et caillouteux. Un sol trop humide peut entraîner le développement des champignons parasite C'est une excellente essence vis-à-vis la résistance au vent et à la sécheresse (**Nichane, 2015**).

2. Les Utilisations médicinales du cyprès

Toutes les parties de cette plante sont utilisées pour des intérêts industriels ou comme matière primaire pour différents produits mais le domaine le plus important est le domaine thérapeutique exemple : aromathérapie, phytothérapie car le Cyprès contient plusieurs constituants biologiques qui ont des propriétés pharmacologiques spécifiques elle est considérés comme une plante médicinale. Les deux parties le plus utilisés sont les rameaux et les cônes (**Riom, 2010**).

- **Les cônes fructifères**

La composition chimiques des cônes révèle a beaucoup de molécules chimiques comme les terpènes et les tanins les flavonoïdes qui s'utilisent dans les troubles capillaro-veineux et les troubles hémorroïdales, elles ont aussi des propriétés anti-inflammatoires.

- **Les rameaux**

Les feuilles qui sont imbriquées sur les rameaux présentent une fort odeur de résine qui le caractérise.à partir de ces feuilles les huiles essentielles vont être extraites, la révélation de la composition chimique montre que ces rameaux contient de flavonoïdes.

Le principal produit de cette plante sont les huiles essentielles qui sont extraites à partir des rameaux et les cônes fructifères, ces huiles contiennent plusieurs propriétés biologiques et sont utilisés pour traiter différentes pathologies :

- On les utilise dans les congestions veineuses qui se retrouvent principalement dans : les hémorroïdes, les varices, les œdèmes de membres inférieures, les jambes lourdes aussi dans l'énurésie infantile chez les enfants.
- On les utilise avec tous les types de toux mais spécialement, la toux sèche spasmodique cette activité antitussive est due à la présence de terpènes.
- Les femmes aussi peuvent les utiliser pour traiter les bouffées de chaleur au cours de la ménopause qui sont dues à une modification très rapide du diamètre des vaisseaux sanguins.
- Ces huiles sont immunostimulantes on les utilise dans les affections chroniques
- L'emploi des huiles essentielles de cyprès dans la régulation de la nervosité
(Riom, 2010).

Partie pratique

Chapitre:3

Matériel et méthode

1. Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est les fruits de *Cupressus sempervirens*. Ils ont été récoltés durant le mois de mars au niveau du foret de Chaab Erssas dans l'université des frères *Mentouri*-Constantine.



Figure 12 : Fruits de *Cupressus sempervirens*

2. Protocol d'extraction des lectines

Après la collecte, les fruits de *Cupressus sempervirens* ont été immédiatement lavées avec de l'eau distillée, sécher et broyée à l'aide d'un mortier jusqu' à l'obtention d'une poudre très fine. 20g de poudre sont pesés puis suspendus dans 200ml de solution tampon PBS (0.1M, pH 7,4) (**Voir annexe**). La macération se fait pendant 24 heures à température ambiante. Enfin, l'extrait brute obtenu est filtré jusqu'à l'obtention d'un filtrat clair.

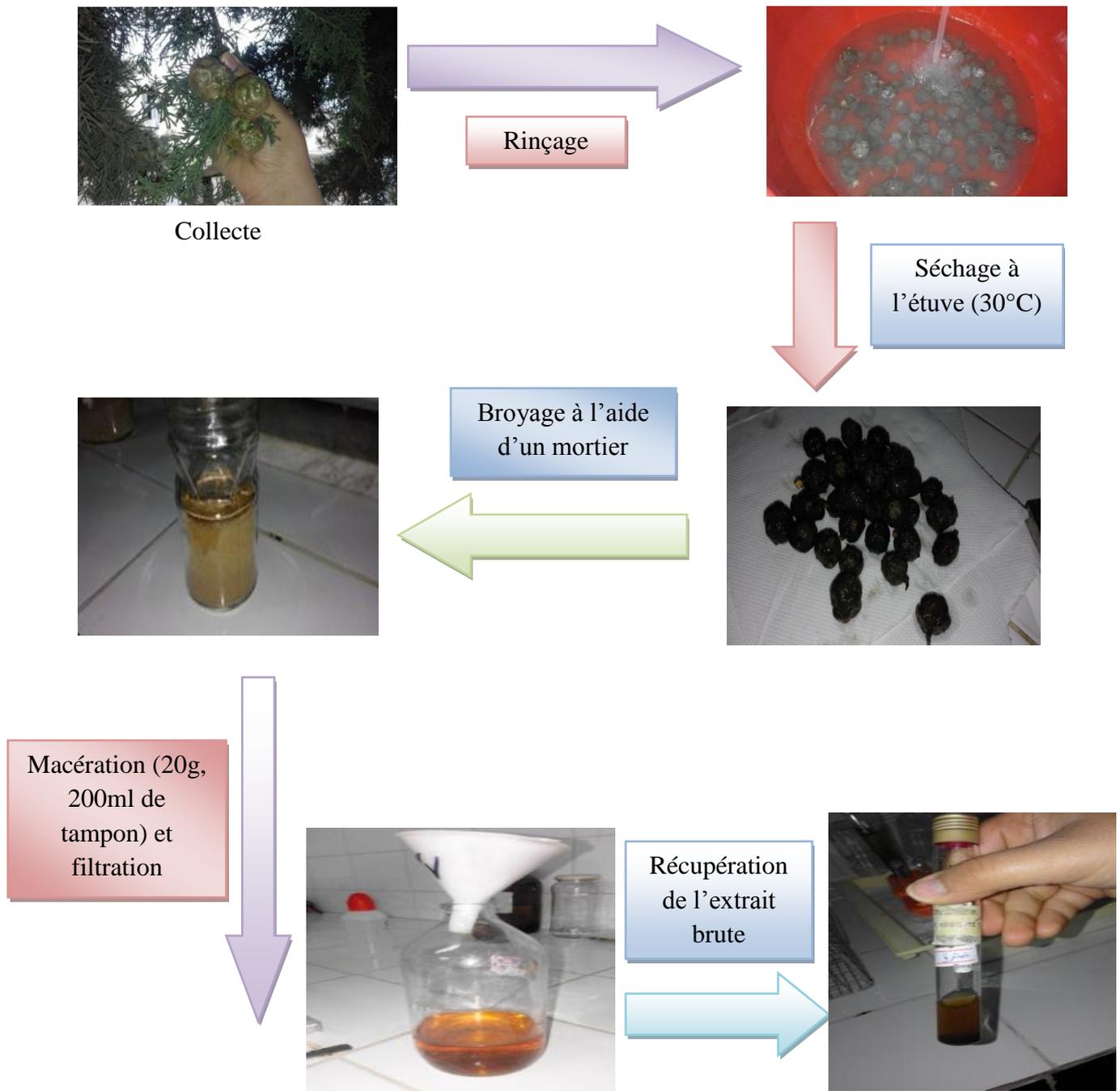


Figure 13 : Schéma représentatif de différentes étapes de l'extraction de *Cupressus sempervirens*.

3. Test d'hémagglutination

La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation. Cette technique repose sur la capacité des lectines à former un réseau avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de

surface. Cette interaction se traduit par une phase gélatineuse visible à l'œil nu. (Zitouni, 2015).

3.1 Préparation des hématies de lapin

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de (Meite et al., 2010) Les hématies utilisées sont issues de sang de lapin obtenues à partir de l'animalerie de l'université des frères Mentouri de Constantine. Le sang de lapin est recueilli dans des tubes héparinés. Les tubes sont centrifugés à 4000tr/min pendant 10 min à 4°C. Le surnageant éliminé et le culot lavé par l'eau physiologique ((NaCL 9%). Trois fois suivi par une centrifugation après chaque lavage. Une suspension de 4% d'hématies est finalement préparée dans de l'eau physiologique.

3.2. Test d'hémagglutination (détermination du point d'équivalence)

25µL de tampon PBS sont placés dans chaque puits de la microplaque, puis 25µL d'extrait brut sont ajoutés dans le premier puits, et une double dilution en série est réalisée. Ensuite, 25µL de la suspension d'érythrocytes à 4 % en solution saline (NaCl 150 mM) sont ajoutés et mélangés à chaque puits. La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après 30 minutes d'incubation à température ambiante. En cas d'un résultat positif, les hématies forment un tapis qui couvre le fond du puits de la plaque de microtitration. Contrairement à un résultat négatif ou l'hémagglutination n'a pas eu lieu, on observe que tous les érythrocytes précipitent au fond du puits, et un point rouge peut être observé. Cependant, des précautions doivent être prises afin de ne pas confondre entre hémolyse et hémagglutination. La différence entre ces deux phénomènes peut être simplement observée si les puits sont examinés par le côté. Dans le cas d'une hémagglutination, le tapis d'hématies ne couvre que le fond du puits, alors que le surnageant reste translucide. S'il y'a une hémolyse, l'ensemble du puits est rempli avec une solution rouge.

La plus petite concentration en extrait brut pour laquelle une hémagglutination est encore visible est appelée point d'équivalence et la concentration en extrait de ce puits correspond à une unité d'hémagglutination (UH).

3.3 Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO :

Ce test est réalisé pour déterminer la spécificité de groupe sanguin à l'extrait brut de (*Cupressus sempervirens*) qui se forme par la fixation de la lectine avec l'antigène présent à la surface d'hématie humaine a différents groupes sanguins du système ABO.

4. Test d'inhibition d'hémagglutination de la lectine par les saccharides

L'inhibition de l'hémagglutination représente une des premières techniques utilisées pour étudier les interactions sucre-lectine (Mastouri, 2013)

La spécificité osidique des lectines est définie en terme de concentration minimale de sucre nécessaires pour inhiber l'agglutination ou la réaction de précipitation induite par ces molécules (Torche, 2015).

Les sucres utilisés sont : le Glucose ; Galactose ; Fétuine ; Lactose ; Inuline ; BSA ; Raffinose ; Fructose, et Mucine. Dans ce test on a utilisé des solutions diluées à partir de l'extrait brut.

Dans chaque puits d'une microplaque, 25 µl de tampon (PBS) ont été déposés, puis 25 µl des inhibiteurs sont rajoutés au premier puits, ensuite une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants, après un volume de 25µl de l'extrait brute dilué est ajouté, l'incubation a été effectuée pendant 30 min à température ambiante. Finalement, 25 µl des hématies ont été additionnés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination a été faite à l'œil nu après une heure de temps.

5. Caractérisation des lectines

5.1 Effet de la température sur l'hémagglutination

Le test se fait par une incubation de l'extrait brut de *Cupressus sempervirens* à différentes températures, (30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°C) dans un bain marie pendant une heure de temps puis refroidi directement à 4°C. Le test d'hémagglutination est ensuite réalisé sur chaque échantillon.

5.2 Effet du pH sur l'hémagglutination

Des solutions tampons à différent pH ont été préalablement préparées (de 2,4 jusqu'à 8). 0,2 g de poudre de *Cupressus sempervirens* sont mis en suspension dans 1mL de chaque tampon. Après 24 heures l'activité hémagglutinante est testée pour chaque échantillon.

6. La purification des lectines :

Dans la chromatographie sur gel filtration, les molécules sont séparées selon leur taille et leur poids moléculaire. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance à base de dextran, dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G75 (Pharmacia). Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 5 à 100kDa.

6.1. Préparation de gel Sephadex G75:

6g de gel de séphadex G75 sont lavés avec 100 ml de solution tampon PBS (M 0,1 pH 7,4) et incubé 1heure dans un bain marie à 60C° puis mis à gonflé dans un excès de cette même solution tampon pendant 24heure à température ambiante. Une fois le gel prêt il est coulé sur les parois de la colonne. Le gel doit être bien tassé et homogène et présenté une seul phase.

6.2. Purification des lectines sur gel de séphadex G75 :

Une colonne d'une dimension de (1x60cm) est préparée puis équilibrée avec du tampon PBS (0.1M,pH7.4) jusqu'à stabilisation du débit à 0.5mL/min. Le volume mort (V_0) de la colonne est déterminé par injection du bleu de dextran (103 kDa) à une concentration de 1 mg/mL.

Un échantillon d'extrait brut (2mL) est déposé en haut de la colonne et élué dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 2mL sont recueillies et caractérisées (activité hémagglutinante contre le sang de lapin). La fraction active congelée pour la réalisation des différents tests biologiques.

7. Dosage des protéines par la méthode de (Bradford ,1976) :

Cette technique est plus simple plus rapide et plus sensible que d'autre. Basée sur la formation d'un complexe entre le bleu de coomassie et les protéines, En mesurant l'absorbance de la solution à 595 nm.

- Standard : 1ml de la PBS +5ml bleu de coomassie.
- Echantillon : 1 ml de l'extrait brute +5 ml bleu de coomassie.
- Le mélange est agité puis laisser 5 minutes.
- Lire l'absorbance contre le blanc.

Chapitre4:

Résultats et discussion

1. Test d'hémagglutination de l'extrait brut:

Dans ce travail, rentre dans le cadre de chercher la présence des lectines et leur extraction et aussi l'étude biologique de ces phytoagglutinines, premièrement on a investigué l'existence de lectine dans une plante médicinale « les cônes fructifères de cyprès méditerranéen ».

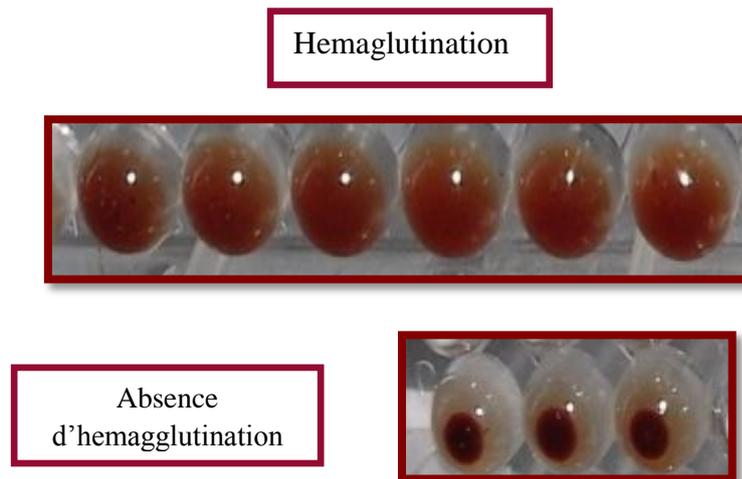


Figure 14 : Agglutination des hématies du lapin par l'extrait *Cupressus sempervirens*

On peut observer une forte agglutination avec les hématies de lapin, cette réaction est due à l'attachement des lectines avec les sucres présents à la surface des hématies.

Le test d'hémagglutination avec le sang de lapin confirme la présence de lectines dans les cônes fructifères de *Cupressus sempervirens*.

2. la limite de l'activité hémagglutinante de l'extrait :

Afin de quantifier l'activité hémagglutinante des lectines extraites à partir des cônes fructifères de *Cupressus sempervirens*, le test d'hémagglutination a été refait et répété 3 fois avec une gamme de dilution allant jusqu'à 12 puits.

La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction de dilution pour lequel on observe une hémagglutination, les résultats de ce test montrent une activité moyenne de 128 UH.

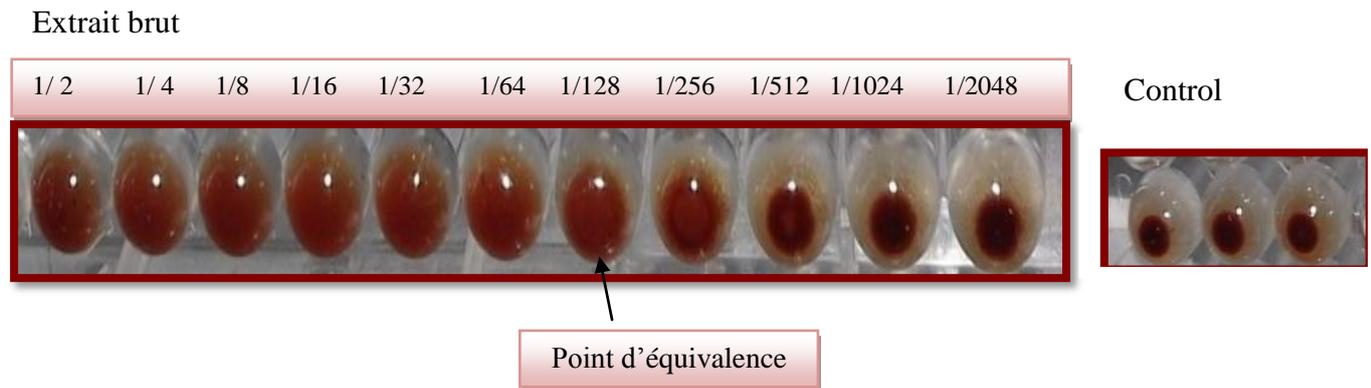


Figure 15: Agglutination des hématies du lapin avec l'extrait brut

Nos résultats montrent que l'activité d'hémagglutinante de l'extrait brute (cône fructifère) de *Cupressus sempervirens* est visible et claire jusqu'à la 7^{ème} puits ce qui donne un titre d'hémagglutination de (128UH) et diminue au niveau des puits qui se suivent jusqu'à la disparition complètement. Ceci met en évidence un pouvoir hémagglutinant fort de nos lectines, il est même plus important que d'autres lectines de fruits de la famille *Moracées* (*Morus nigra*) qui présente une moyenne activité 16UH (Derri, 2015). Les fruits de la famille de *Fagaceae* (*Quercus fusiformis*) aussi présente la même résultat 16UH (Ynalvez, et al., 2011). Au contraire des fruits la plante médicinale l'Aloé-véra montre une forte agglutination allant au 7^{ème} puits 128UH (Zitouni, 2015).

3-L'effet de température sur l'hémagglutination :

L'extrait a été soumis à différentes températures (30 °C jusqu'à 90) les résultats obtenus sont les suivants :

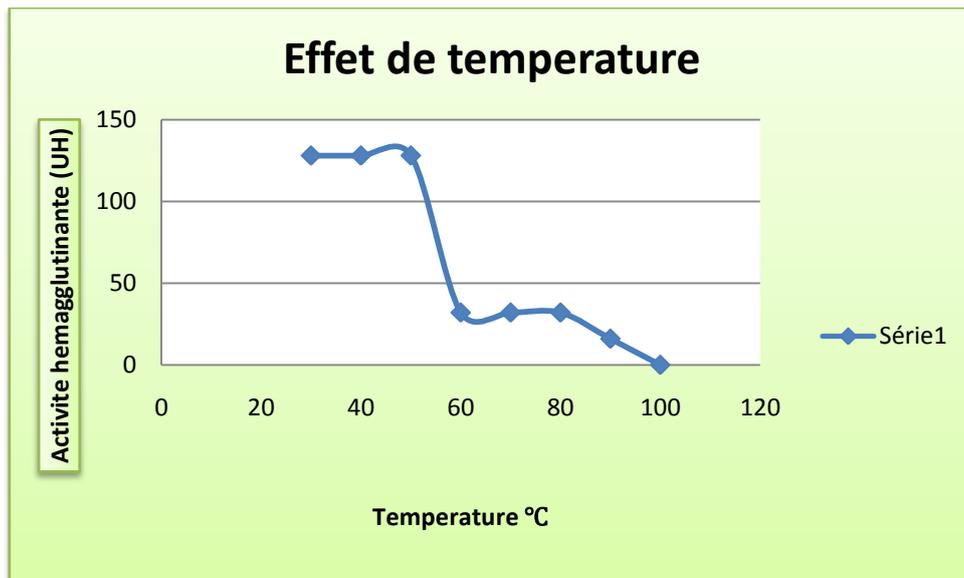


Figure 16 : Effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait brut

On peut observer que l'activité hémagglutinante de l'extrait brut reste stable jusqu'à une température 50 C, au delà l'activité commence à diminuer progressivement jusqu'à disparaître à une température de 100°C.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de température sur les lectines : (**Cao *et al.*, 2010**) ont montré que la lectine *Muscadomestica* est stable jusqu'à 65°C pendant 60min. (**Suseelan *et al.*, 1997**) ont montré que la lectine de *Vigna mungo* est stable à 50°C pendant 60min.

4-L'effet de pH sur l'activité hémagglutinante :

L'activité hémagglutinante de l'extrait brut des cônes fructifères des *Cupressus sempervirens* a été testée à différents pH.

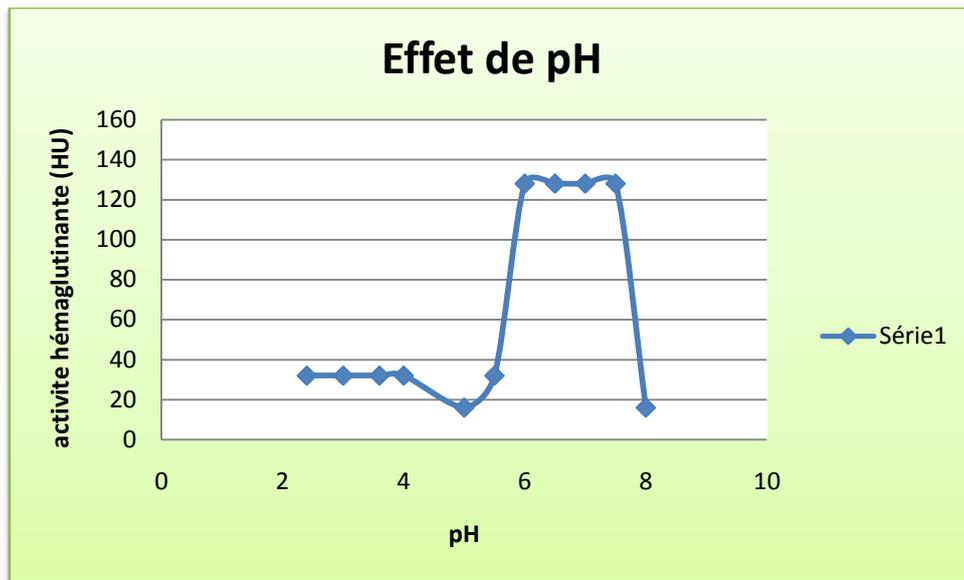


Figure 17 : Effet du pH sur l'activité hemagglutination de l'extrait brut

On remarque que les lectines reste stable dans une large gamme du pH de 2 a 8 comme les lectines de *Calycotom espinosa L* mais il ya forte agglutination a pH normale donc nos lectines conservent leur activités a des pH basique comme celles du *Euphorbia helioscopia* qui perdent leur activité d'hémagglutination plus rapidement, elles restent actif dans un intervalle de pH de 6-8 (Shaista *et al.*, 2014).

5- La chromatographie de la purification des lectines sur colonne gel de séphadex G 75 :

La colonne a été réalisée pour éliminer les impuretés afin d'améliorer l'activité hemagglutinante de L'extrait brut les résultats de la colonne sont représenté dans la courbe au dessous.

La figure met en évidence le profil d'éluion de l'extrait brut après son passage à travers la colonne chromatographique. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm qui correspondent aux fractions 26 et 28 et 35.

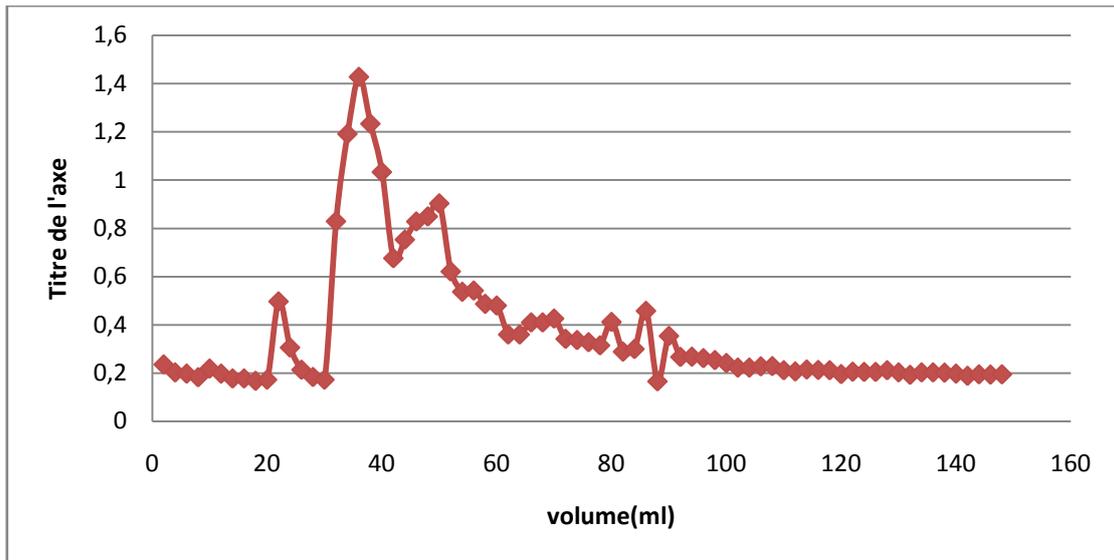


Figure 18 : Courbe représentant la concentration des protéines dans chaque Fraction

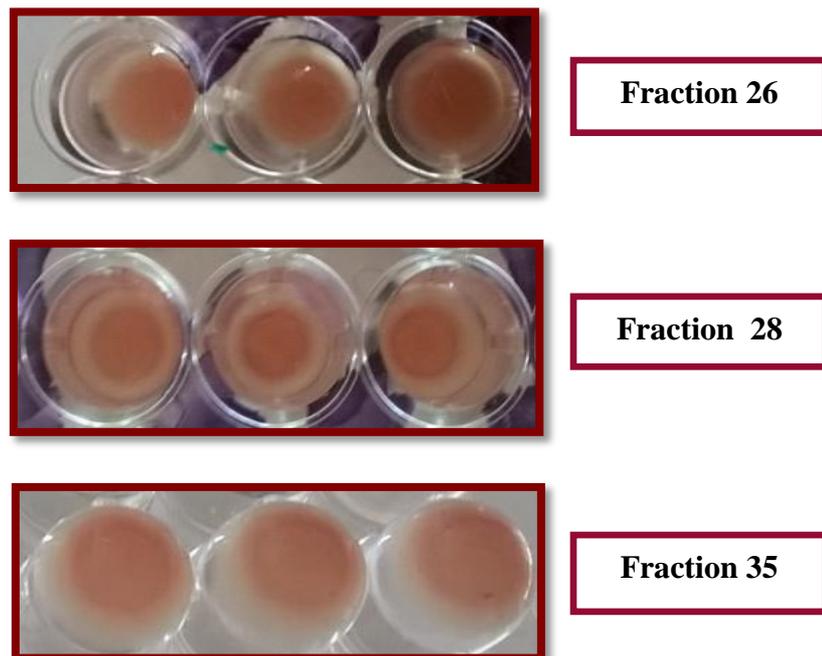


Figure 19: Test d'hémagglutination des fractions après la chromatographie.

Après le test de l'activité d'hémagglutination, on a trouvé les lectines dans les fractions 27, 28 et 35 correspondant à 52, 54 et 68 ml, C'est résultats différents de celle de *Pterocladia capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 75 (Necib *et al.*, 2015),

6- Le dosage de protéine par la méthode de Bradford (1976) :

On a utilisé une courbe d'étalonnage de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence pour déterminer la concentration totale des protéines contenues dans un mélange.

Les résultats :

L'équation de la courbe : $y=0,007x-0,081$

Tableau 05 : Absorbance à longueur d'onde 595 nm

	Blanc	Extrait brut	Fraction26	Fraction28	Fraction35
Absorbance à 595 nm	595	0,142	0,0163	0,024	0,035
Concentration (mg/ml)	0	0,031	0,013	0,015	0,016

A partir de ces résultats on observe que la concentration de l'extrait brut de *Cupressus sempervirens* (0,031 mg/ml) est supérieure par rapport aux fractions de la colonne.

7- Test d'inhibition de la lectine par les saccharides :

Le test d'inhibition a été effectué avec contre des monosaccharides et des glycoprotéines pour déterminer la spécificité des extraits en sucre.

Tableau 06 : Inhibition de l'activité d'hemagglutination de Cupressus sempervirens par les sucres

Sucre / glycoprotéine	L'activité d'hemagglutination
Glucose	-
Galactose	-
lactose	-
Raffinose	-
Fructose	-
Inuline	-
BSA	+
mucine	-
Fetuinte	+

+ : Inhibition de l'activité d'hemagglutination

- : pas d'inhibition

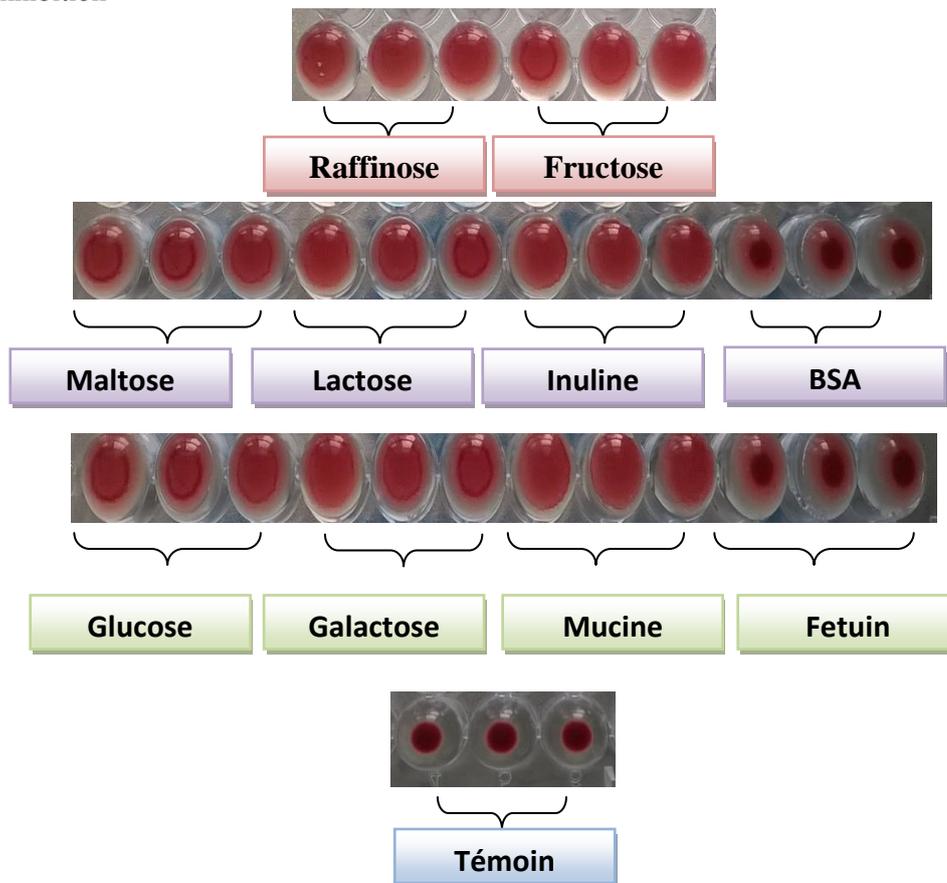


Figure 20 : Test d'inhibition de l'activité hemagglutination de Cupressus sempervirens par les sucres.

Dans ce teste on à utilisé l'extrait brut dilué (1/16)

L'extrait des cônes fructifères de *Cupressus sempervirens* à été spécifiquement inhibé par le BSA et le fetuine , Cette inhibition est due à l'occupation des sites de reconnaissances par ces deux glycoprotéines, il ya une inhibition de d'hemagglutination par ces glycoproteines .

Pour les (Galactose, inuline, fructose, raffinose, lactose, usine, glucose) L'extrait ne présente aucun spécificité pour c'est Saccharides ce qui résulte par une agglutination aux hématies de lapin.

On a compare ces résultats avec l'extrait des fruits d'Aegle marmelos de class *Magnoliopsida* qui présente une affinité pour le mannose (Subramaniya, 2011). Et *Musa paradisiac* (banana) qui aussi inhibe par le mannose (Koshte, 1990). Contrairement aux Champignons il ya beaucoup d'espèce qui présentent affinité pour le fetuine comme *Pholiota aurivella* (Singh, et al., 2010) .

8- Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO :

Tableau 07 : l'agglutination des hématies humaines par l'extrait brut des cônes fructifères de *Cupressus sempervirens*

Les groupes sanguins	A	B	AB	O
Extrait brut (<i>Cupressus sempervirens</i>)	-	-	-	-

+: Hem agglutination

- : absence d'hem agglutination

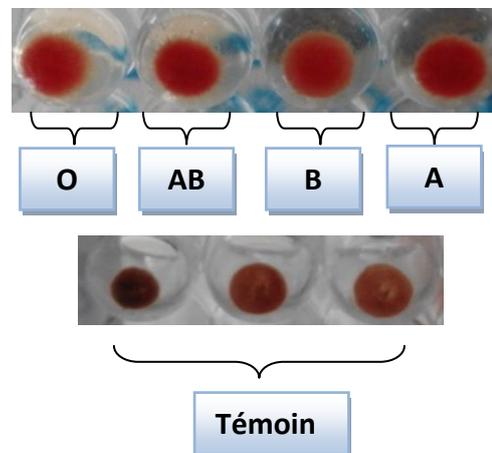


Figure 21: Agglutination des hématies humaines par l'extrait brut de *Cupressus sempervirens*

Les résultats du tableau montrent que l'extrait des cônes de *Cupressus sempervirens* n'agglutine aucune des types des groupes sanguins.

Donc ce lectine ne présente aucune sélectivité pour les groupes du système ABO.

Ce même résultat a été décrit pour l'extrait de *Brassica napus*. (Torche, 2015)

Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

Dans le cadre de notre travail de recherche, nous nous sommes intéressés à une plante de *Cupressus sempervirens*.

Nous avons extrait la lectine à partir de fruit de *cupressus sempervirens* cette protéine a une activité agglutinante sur les hématies de lapin, la lectine de *cupressus sempervirens* ne montrent aucune spécificité pour les hématies des groupes sanguins du système ABO, tandis que l'activité agglutinante de la lectine est inhibée spécifiquement par le fœtine et le BSA.

C'est une protéine à moyenne résistance, avec une gamme de pH stable dans un intervalle (2-8).

Cette lectine a été partiellement purifiée par chromatographie d'exclusion en utilisant le gel de séphadex G75. On a obtenu trois pics différents et ont présenté une activité hémagglutinante.

Ce travail est original et permet de mettre en évidence pour la première fois la présence de lectines chez les cônes fructifères *cupressus sempervirens* avec une spécificité unique pour les glycoprotéines.

- La découverte de ces lectines à partir de cette plante ouvre plusieurs perspectives notamment par l'étude structurale et fonctionnelle de ces dernières. Une purification complète par des techniques chromatographiques d'affinité est nécessaire, aussi bien pour la détermination du poids moléculaire de ces lectines, et la réalisation de différents tests biologiques (test d'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, immunomodulation, et anti-cancéreuse).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

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

Barcate, A., Derdouri, R. (2016). Etude de l'activité antioxydante in vitro et les propriétés immunitaires des lectines extraites des plantes d'origine Algérien. Biochimie Moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. Algerie. Pp : 1-18.

Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954). "Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). " *Science*, Vol. 119. (3091): 419.

Caudullo, G., de Rigo, D. (2016). "Cupressus sempervirens in Europe: distribution, habitat, usage and threats". European Atlas of Forest Tree Species. *Journal of the European Union*, Luxembourg.

Doumbia, M. (2004). Etudes de l'activité hemagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne. Faculté de Médecine de Pharmacie et Odontostomatologie. Mali. Pp : 34-41.

Esmail, A. (2016). " Medical importance of Cupressus sempervirens". *International Organization of Scientific Research Journal Of Pharmacy*, Vol. 6. Pp. 66-76.

Gianluca, C. (2006). Etude structure-fonction de glycoconjuges et de lectines bactériennes et fongiques. Biochimie. Université Joseph-Fourier. France. Pp : 15-43.

Houles, C. (2001). Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes a la jacline. L'institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp : 11-35.

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

Koshte, V.L., Vandijk, W., Marleen, E.T., Vander, S., Rob, C. (1990). "Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana)". *Biochemical journal*. Vol.272. Pp : 721-726.

Lenka, S., Imberty, A., Jaroslave, K. (2006). Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. Université de Grenoble I. France. Pp : 56-58.

laakso S. (2016) Protein determination by the Bradford methode using the labrox multimode reader. Failand.

Mastouri, A. (2013). Étude des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques par AFM : investigation de l'influence de la multivalence sur les interactions sucre-lectine. Sciences de l'ingenieur physique. Université de Technologie de Compiègne. France. Pp : 68- 74.

Meite, A., Kouame, K., Offoumou, M. (2008)." Evaluation de l'activite hemagglutinante des lectines graines de trois espèces de *cucurbutaceae* couramment consommées en Cote d'Ivoire". *Science et Nature*, Vol.5. Pp.199-204.

Merahi, W. (2014). Extraction des lectines a partir des plantes médicinales : (*Aloès Vera*, *Rosmarinus Officinalis L*, *Syzygium aromaticum*) avec des testes biologiques. Biochimie Moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. Algerie. Pp : 37-43.

Nichane, N. (2015). Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen). Département d'Ecologie et Environnement. Université Tlemcan. Algerie. Pp :22-26.

Poiroux, G.M. (2011). Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. Biologie cellulaire et Biochimie. Université Toulouse. France. Pp : 35-45.

Ramata, N. (2010). Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines d'*Abrus precatorius L.* Université de Bamako. Mali.Pp :8-24.

Raquel, L., Benevides, R.G. (2011). Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel.* . Biologie Structurale et Nanobiologie. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà. France.Pp : 11-20.

Renato, D., Moreira, A. (1991). "Plant lectins, chemical and biological aspects". *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Vol. 86. Suppl. II, 211-218.

Riom, C. (2010). Le Cupressus Sempervirens et l'approche du concept du polinier sentinelle nantais. Faculté de pharmacie. Université de Nantes. France. Pp : 3-79.

Rostislav, A., Alexander, L., Volodymer, A. (2016). "Lectin purification from carp roe (*Cyprinus carpio L.*), investigation of its carbohydrate specificity and application in histochemistry". Department of Histology and Embryology.*Romania journal of Morphology and Embryology,* Vol.75. Pp : 985–994.

Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014). "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research,* Vol. 15, 2014.

Senjam, S. S., Hexiang, W., Yau S. C., Wenliang, P., Xiuli D., Cui M., Ouafae, A., Tzi B. (2015). Lectins from Edible Mushrooms. *Molecules,* Vol.20.Pp : 446-469.

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

Sharon,N. (2009). "lectines". Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. In: *Encyclopedia of Life Sciences* ,DOI: 10.1002/9780470015902.a0000708.pub2.

Shaista, R., Sakeena, Q., Ishfak, W.H., Showkat, A.G., Akbar, M., Rabia, H. (2014). Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia.**Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences,* Vol.27. Pp.1805-1810.

Spilatro, S.R., Graham, R.C., Ruth, E.W., Khari, C., Christine, C. (1996).

"Characterization of a New Lectin of Soybean Vegetative Tissues". Department of Biology, *Plant physiology*, Vol. 110.Pp. 825-834.

Subramaniya, B.R., Malliga, R.M., Nirmal, K.K., Sivasitambaram, N.D. (2011)."

Isolation and Partial Characterisation of a Novel Lectin from Aegle marmelos Fruit and Its Effect on Adherence and Invasion of Shigellae to HT29 Cells". *Plos one*.

Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936). "Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A". *Bacteriol*, Vol. 32. Pp. 227-237.

Torche, I., Chekakta, M. (2015). Extraction des lectines à partir des plantes médicinales (*Anacyclus Pyrethrum L*, *Brassica napus L*, *Calycotome spinosa L*, *link et Urtica dioica L*) avec des tests biologiques. . Biochimie Moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. . Algerie. Pp : 26-31.

Ynalavez, R.A., Fuentes, L.M., Sanchez, C.V. (2011). " Comparison and temperature study of lectin activities in texas live Oak (*Quercus fusiformis*) crude extracts". *journal of Plant sciences*. Vol.6.Pp :124-134.

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

Zheng, S., Rong, S., Tian, Y., Rong, L., Li-Jia, C., Jin-Ku, B., Liang, Z., Yong, T. (2016).

"Identification of Novel Pathways in Plant Lectin-Induced Cancer Cell Apoptosis". *Molecular Science*, Vol.7.Pp.228.

Annexes

Annexe 1**Composition de tampon PBS à ph 7,4 :**

Pour préparer 1000ml de PBS

Réactif	quantité
K_2HPO_4	1,82g
KH_2PO_4	0,24g
Na Cl	8,7g
L'eau distillée	1000 ml

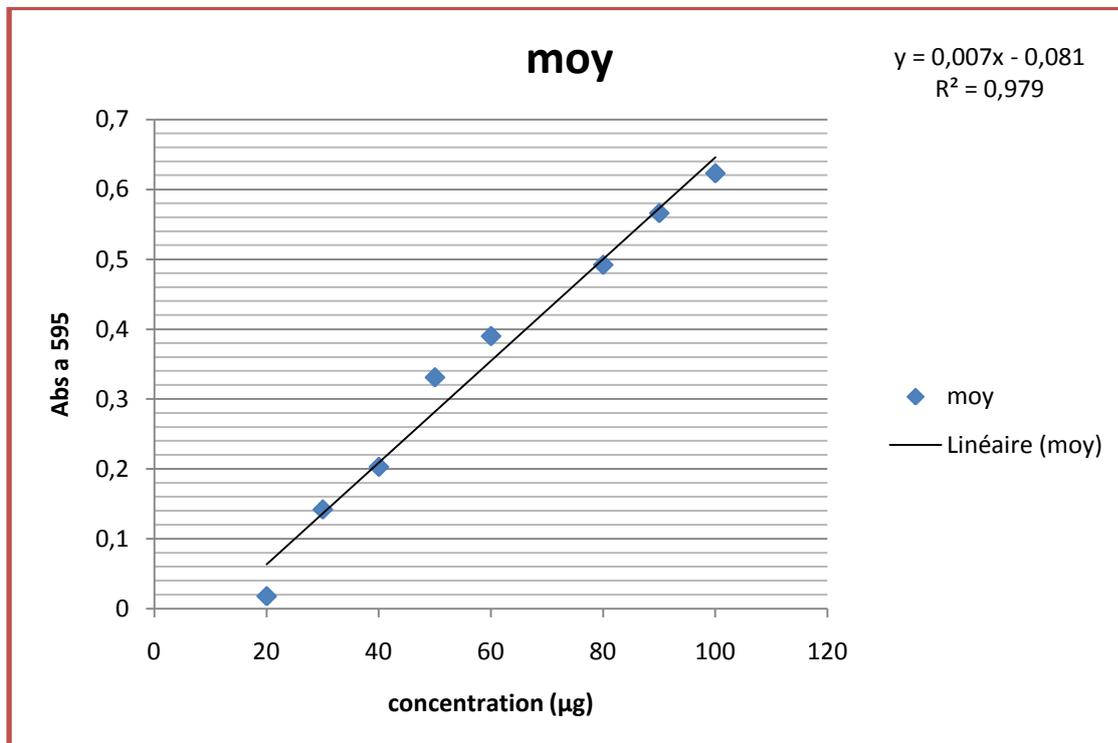
Annexe 2

HCL [1M]	HCL [0, 1M]	HCL [0,01M]
8 ml de HCl[12M] + 9ml H ₂ O	1ml HCl [12M] +9ml H ₂ O	1ml (0,1M) + 9ml H ₂ O

NaOH [1M]	NaOH [0, 1M]	NaOH [0,01M]
4 g dans un 100 ml H ₂ O	1ml (NaOH [1M]) +9 ml H ₂ O	1ml (NaOH [0, 1M]) +9 ml H ₂ O

Glycine (0,1M)
0,75g + 100 ml H ₂ O

Annexe 3



**Isolement, purification et caractérisation partielle des lectines à partir
des cônes fructifères du Cyprès méditerranée
(*Cupressus sempervirens*)**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie nutritionnelle et santé.

Résumé :

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capable de reconnaître des glucides, elles sont présentes dans toutes les branches du règne vivant.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans l'extrait des fruits de *cupressus sempervirens*.

Les lectines extraites de ces fruits montrent une moyenne activité hemagglutinante sur les hématies de lapin.

L'extrait n'a montré aucune sélectivité pour les groupes du système ABO, un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et glycoprotéines et qui a montré que les lectines de *Cupressus sempervirens* présentent une affinité pour la fétuine et le BSA.

Le traitement thermique de lectine à différente température pendant une heure présente une activité maximale entre 40 et 50°C. Elles gardent de leur activité a température moyenne, cette hemagglutination est stable dans une gamme de pH basique entre 6.5 à 8, la purification de l'extrait par filtration sur gel de séphadex G 75 donne 3 pic avec une hemagglutination moyenne.

Mots clés : Lectines, *Cupressus sempervirens*, Extrait, Activité hémagglutinante ,

Purification, inhibition de l'hémagglutination.

Laboratoire de recherche : laboratoire de : Mr. *NECIB Y.*

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. *NECIB Y.* (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : Mr. *MEROUANE F.* (MAB- UFM Constantine).

Examinatrice : Mme. *BENKAHOUL M.* (MCB- UFM Constantine).