



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 والبيولوجيا الخلوية والجزئية
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 Appliquée
Intitulé :

Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines de la
plante : (*Fredolia aretioides*)

Présenté et soutenu par :
Hichour Mohamed Ibrahim

Le : 03 /07/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr Necib .Y
Encadreur : Mr Zitouni.A
Examineur : Mr Hafi . A

Professeur - UFM Constantine
Maitre de conférence - UFM Constantine
Maitre-assistant – UFM Constantine

Année universitaire: 2017 /2018

Remerciements:

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

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes parents .

A mon encadreur Mr Zitouni Maitre de conférence la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine,

A l'université des frères Mentouri Constantine, qui m'a permis d'accéder au laboratoire de biochimie et mis à ma disposition les produits et le matériel dont j'ai eu besoin, sans compter son aimable personnel.

A monsieur Toumi Seddik-eddine, pour m'avoir accordé de son temps et surtout de son savoir, et qui m'a aidé ainsi que mes camarades à plusieurs étapes de notre parcours, et à monsieur Bahri pour son aide précieuse dans l'animalerie.

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'examineur Mr HAFI Maitre assistant à l'université des frère Mentouri.

MERCI

Résumé:

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène ayant la capacité de se lier spécifiquement et de manière réversible aux hydrates de carbones.

Elles peuvent être d'origine animale, végétale, bactérienne, ou virale.

Notre objectif consiste en une recherche des lectines à partir d'une plante endémique (*Fredolia aretioides*) qui colonise actuellement, une portion très restreinte du Sahara Nord-occidental algérien : L'aire de cette plante englobe une portion du Sahara septentrional où elle a été signalée par les botanistes à partir de 1848 entre Biskra et Touggourt, mais depuis cette date, sa présence n'a été que très rarement signalée. C'est une plante qui n'a jamais fait l'objet d'une recherche sur les lectines, et c'est dans ce contexte que se situe le but de notre travail. Ces lectines ont été mises en évidence par des tests d'hémagglutination, présentent un pH optimum dans une gamme de PH allant de 1 à 12, thermostables jusqu'à 90°C, présentent une affinité envers une glycoprotéine, la sérum albumine bovine (BSA). Leurs profil électrophorétique révéla l'existence probable de deux lectines dont les PM varient entre 8,5 et 9 KDa pour l'une, et 35 à 36 KDa pour l'autre.

En outre, nos lectines ont manifesté une activité anti-inflammatoire non négligeable.

Mots clés : Lectines, Extraction, Hémagglutination, Sucres, glycoprotéines

ABSTRACT:

Lectins are a family of heterogeneous proteins and glycoproteins with the ability to bind specifically and reversibly to carbohydrates.

They can be of animal, plant, bacterial, or viral origin.

Our goal is to search for lecthines from an endemic plant (*fredolia aretioides*) that is currently colonizing a very small portion of the Algerian North-Western Sahara: The area of this plant includes a portion of the northern Sahara where it has botanists from 1848 between Biskra and Touggourt, but since then, its presence has been very rarely reported .This is a plant that has never been the subject of research on lectins, and it is in this context that the purpose of our work lies.

These lectins have been demonstrated by haemagglutination tests, have an optimum pH in a pH range of 1 to 12, thermostable up to 90 ° C, have an affinity for BSA glycoprotein. Their electrophoretic profile gives a molecular weight between 29 and 36 kDa,

Our lectins showed significant anti-inflammatory activity.

Keywords: Lectins, Extraction, Haemagglutination, Sugars, glycoproteins

ملخص:

تشكل الليكتينات عائلة من بروتينات والجليكوبروتينات غير متجانسة مع القدرة على ربط الكربوهيدرات بشكل محدد وقابل للانعكاس يمكن أن تكون من أصل حيواني أو نباتي أو بكتيري أو (fredolia) هدفنا هو البحث عن الليكتينات المتواجدة في نبتة (aretioides) المتواجدة في أماكن محدودة من الصحراء الجزائرية : تم اكتشافها من طرف العلماء في سنة 1848 في منطقة ما بين تقرت وبسكرة، هدفنا هو إستخلاص ليكتينات هذه النبتة التي لم يسبق لأحد العمل عليها .

وقد تم إختبار هذه الليكتينات عن طريق اختبارات التراص، لديها درجة الحموضة المثلى في مجموعة من درجة الحموضة 1-12 ومستقرة حراريا تصل إلى 90 درجة مئوية، ويكون لها بروتين تم تنقيتها تحت ظروف مفسدة). (BSA)سكري مخصص لتثبيطها ، لطبيعتها .

بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت لنا اللقاحات نشاطاً كبيراً مضاداً للالتهاب

الكلمات المفتاحية إستخلاص سكر الجليكوبروتينات التراص لليكتينات

SOMMAIRE :

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines	1
2. Historique	2
3. La structure des lectines	5
3.1. Les lectines simple	5
3.2. les lectines en mosaïques	6
3.3. Les assemblages macromoléculaires	6
4. Les sites de liaisons des lectines	7
5. La spécificité et l'affinité des lectines	8
6. La Classification des lectines	9
6.1. Chez les animaux	9
a. Les lectines extracellulaires	9
b. Les lectines intracellulaires	9
6.2. Chez les végétaux	10
a) Les mérolectines	10
b) Les hololectines	10
c) Les chimérolectines	10
d) Les superlectines	11
7. Distribution des lectines dans le monde de vivant	11
7.1. Les lectines animales	11
7.2. Les lectines des plantes	13

7.3.	Les lectines des microorganismes	14
8.	Fonction biologique des lectines.....	15
8.1.	Chez les plantes	15
8.2.	Chez l'homme	15
9.	Propriétés des lectine	15
9.1.	L'interactionlectine–glucide	16
9.2.	L'agglutination des cellules	16
9.3.	L'activités mitogène	16
9.4.	Effets mimétiques des hormones	16
9.5.	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses	17
9.6.	La propriété antivirales	17
9.7.	La propriété antibactérienne	17
9.8.	Autres propriétés	18
10.	L'intérêt des lectines	18
10.1.	En biochimie et protéomique	18
10.2.	Dans le domaine biomédical	18
	a)Hématologie	19
	b) Immunologie	19
	c) Biologie cellulaire	19
	d) Cancérologie	19
10.3.	Dans le domaine agronomique	19
11.	Le rôle des lectines dans l'immunité	20
	1. 21 Chapitre II : Généralités sur la plante	
I.	1 <i>Fredolia aretioides</i>	23

Matériels et méthodes :

1	Matériel végétale :.....	23
2	Méthodes :.....	23
	a) Broyage :.....	23
	b) Extraction :.....	23
3.	Le test d'hémagglutination :.....	23

4.Préparation des hématies à 3% :.....	23
5.technique d'hémagglutination :.....	23
6.Test de la limite d'hémagglutination	23
7.L'effet température sur l'hémagglutination	24
8..L'effet du pH sur l'hémagglutination	24
9.Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines	24
10.L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G50.	24
a). La préparation de la colonne de Sephadex G50.	24
b).Dessalage de l'extrait sur la colonne Sephadex G50.....	25
c) La recolte des Fractions et leurs lyophilisation	25
11. Electrophorèse en gel de polyacrylamide :.....	25
12.Etude des propriétés anti-inflammatoires de la plante chez les rats	25

1. Résultats et discussion

1. Le test d'hémagglutination	28
2. La limite d'hémagglutination	29
3. L'effet de la température sur l'hémagglutination	30
4. L'effet du pH sur l'hémagglutination	31
5. L'effet d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et glycoprotéines	32
6. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G50	33
7. Résultats de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.....	34
8. Résultats du test anti-inflammatoire sur les rats	35
Conclusion et perspective.....	37
Références bibliographiques.....	38

LISTE DES ABREVIATIONS

Con A : Concavaline A lectine

ConBr : Lectine de Canavalisbrasilensis

FRE : Fredolia aretioides

PBS : Phosphate Buffer Saline

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 01 : les lectines et leurs applications	1
Tableau 02 : Historique de la découverte des lectines	3
Tableau 03 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines	8
Tableau 04 La composition des lots de rats	27
Tableau 05 :L'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de <i>Fredolia aretioides</i>	28
Tableau 06 :L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Fredolia aretioides</i>	31
Tableau 07 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Fredolia aretioides</i>	31
Tableau 08 : Analyse de variance du groupe des rats.....	35

LISTE DES FIGURES :

Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de <i>canavali ensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde.....	5
Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique	6
Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i>	6
Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides	7
Figure 05 : La classification structurale des lectines des plants	10
Figure 06 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T)	11
Figure 07 : Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavaliamaritima</i> complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6)	12
Figure 08: Courbe représenté la Filtration d'extrait <i>Fredolia aretioides</i> sur colonne de Sephadex G50	33
Figure 09 : Courbe représenté la Filtration d'extrait précipité a 90% au sulfate d'ammonium <i>fredolia aretioides</i> sur colonne de Sephadex G50.....	33
Figure 10: profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes....	34
Figure 11: effet anti-inflammatoire d'un extrait de lectine après injection de formaldéhyde chez les rats.....	36

LISTE DES PHOTOS :

Photo 01 : Photographie de <i>Fredolia aretioides</i> dans le desert algerien	24
Photo 02 : Photographie de <i>Fredolia aretioides</i>	26
Photo 03 : mesure de l'œdème.....	28
Photo 04 : Injection de nos échantillons.....	28
Photo 05 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait <i>fredolia aretioides</i>	28
Photo 06 : test de la limite d'hémagglutination de <i>Fredolia aretioides</i>	29
Photo 07 : L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.....	30
Photo 08 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.....	31
Photo 09: Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de <i>fredolia aretioides</i> par les sucres et glycoprotéines.....	32

INTRODUCTION :

Les lectines constituent un groupe de protéines ou de glycoprotéines d'origine nonimmunitaire, 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**).

La présente étude a été réalisée afin d'étudier la présence des lectines dans la plante *Fredolia aretioides*. Cette plante n'a jamais été étudiée en Algérie sur l'extraction des lectines, raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants:

- ❖ Etudier la présence des lectines par le test hémagglutination avec le sang des lapins.
- ❖ Etudier l'effet de la température sur l'activité de ces lectines.
- ❖ Etudier l'effet du pH sur l'activité des lectines .
- ❖ Etude l'affinité de ces lectines avec les sucres .
- ❖ Passage sur colonne sephadex G50.
- ❖ Unelectrophorese(SDS-page) .
- ❖ Un test de l'effet anti-inflammatoire.

Chapitre 1 : la lectine

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 «lectines» 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) sousunités 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 reconnaissance par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses(**Liener et al., 1986**) Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est fonction de la température et de la durée de traitement (**Meite et al, 2006**) Bien qu'il existe des lectines thermorésistants (**Guillaume, 1993**) Quelques lectines importantes sont énumérées dans le tableau 1

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

Lectines	Exemple et commentaire
Lectine de légumes	Concanavalline A, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E.coli et toxine du choléra
Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectine animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

2. Historique

En 1888, P. H. Stillmarka découvre la première lectine qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes. (Sharon and Lis, 2004) A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. Ensuite P. 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 concanavalline 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 Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytaires humains d'un groupe sanguin donne (**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 donnée (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	Toxicite de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicite de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hemagglutinante 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	Activite hémagglutinante de la graine d'Abrus Precatorius

1897	Elfstrand	Introduction du terme d' 'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La reversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hemagglutinines
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 lectine
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)

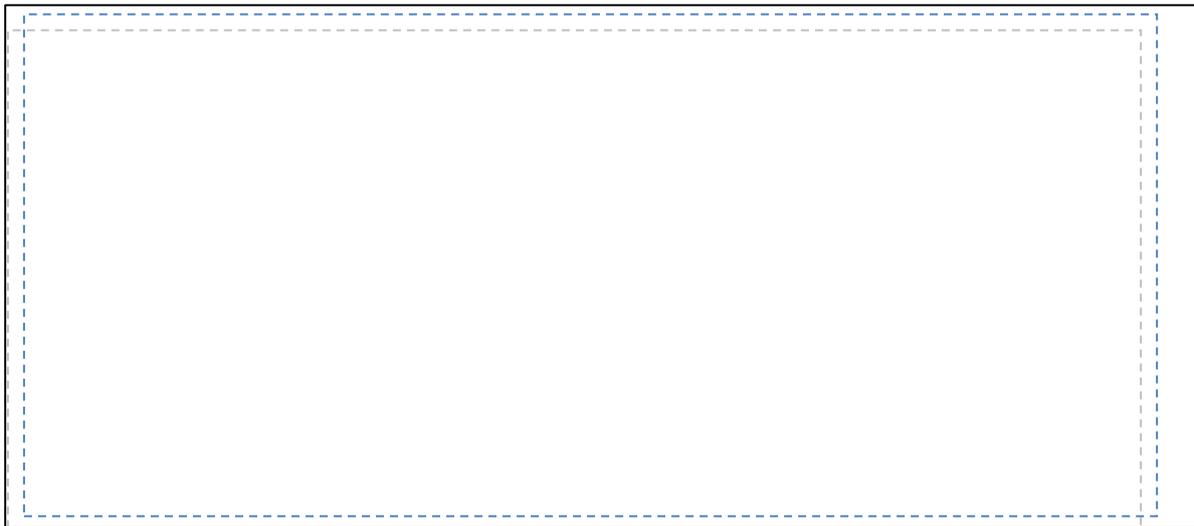


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (**Lenka, 2006**).

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 2 : 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 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae(**Lenka, 2006**)(Figure03)

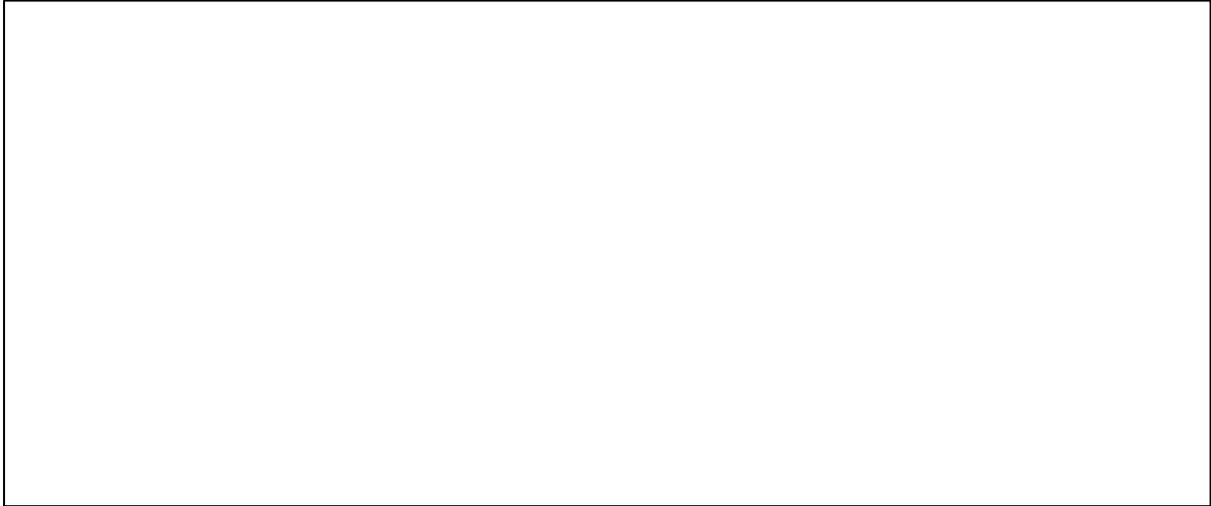


Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *d'Escherichia coli*(**Lenka, 2006**).

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 lectines-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**).

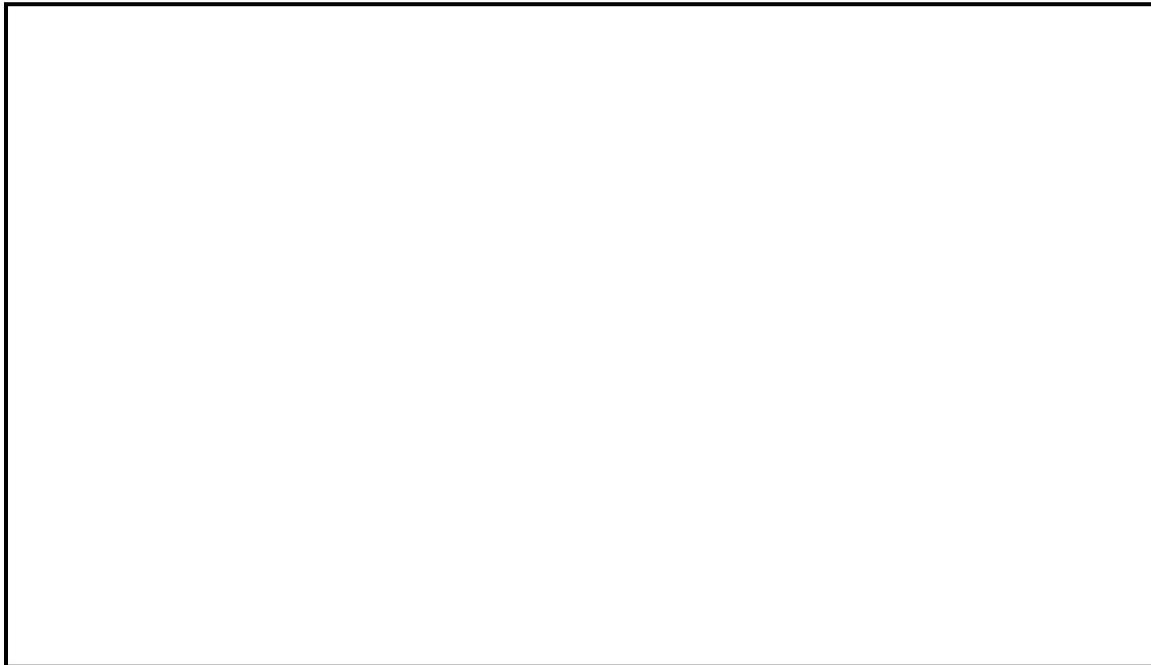


Figure 04 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharon et Lis, 1993**)

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 epitopes 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 brasilensis</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>Cytissuss essilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal

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 Lectines 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 ribosomin activating proteine ; protéinein activant 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 structurellement et fonctionnellement (**Van Damme et al, 1998**).

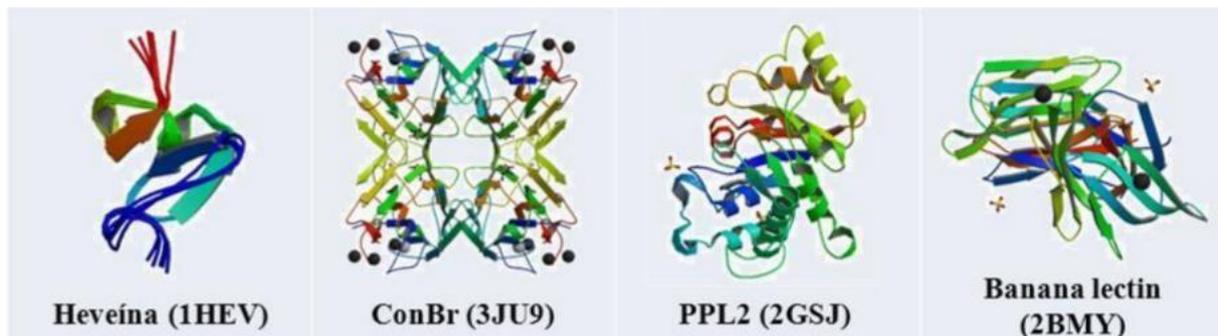


Figure 05 : La classification structurale des lectines des plants (**Van Damme et al, 1998**).

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 badispar*, 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 Nacetyl lactosamine (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 Lectines du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers et al., 2000**) (Figure 5).

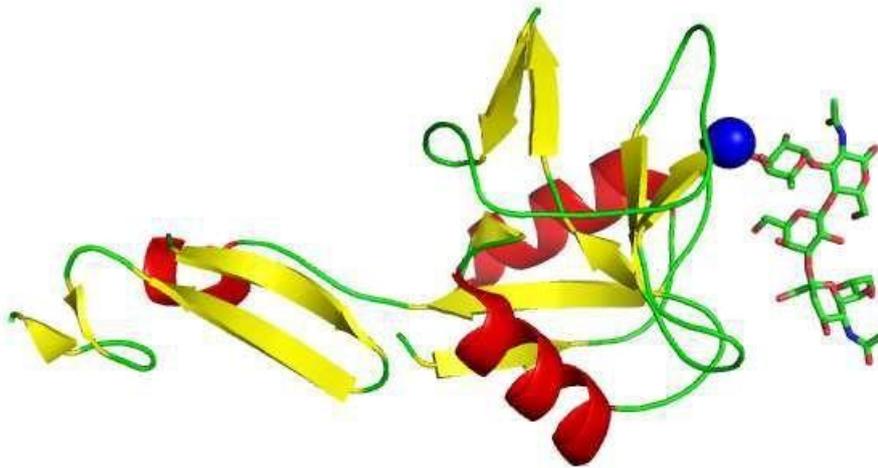


Figure 6 : Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl Lewis X (PDB 1G1T) (**Somers, et al. 2000**) Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- 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 et Ainsworth, 1972)

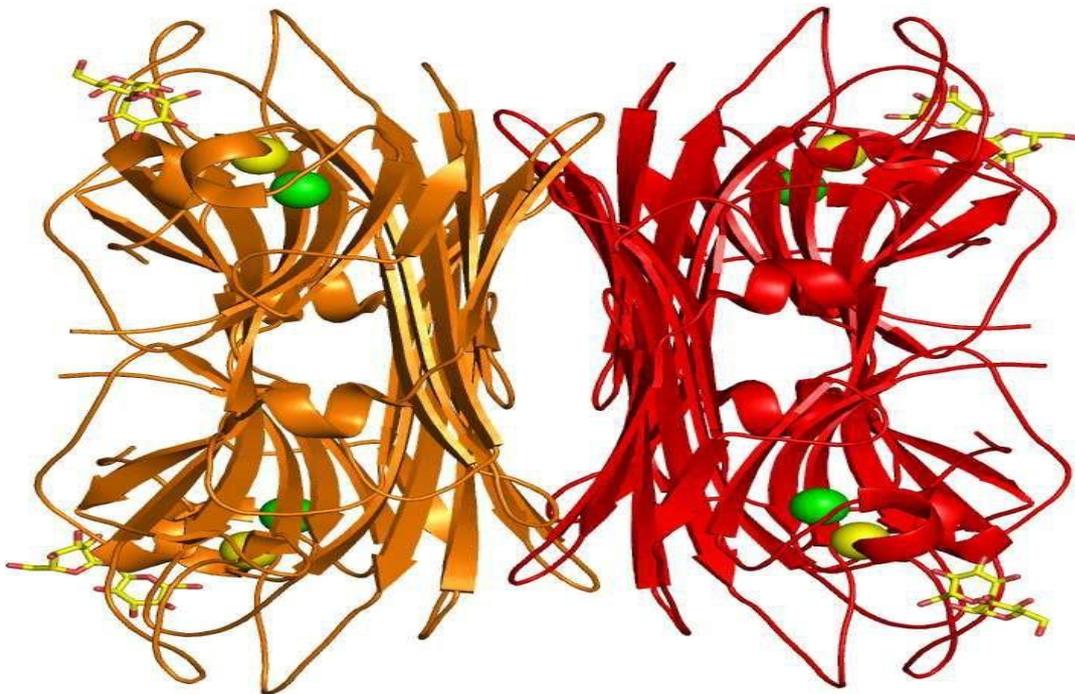


Figure 7 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre *et al.*, 2006) Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

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. et 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 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 et Raikhel 1991, Rudiger et 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 le microorganisme, et nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (**Bouchara et Trouchin, 2003**) Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imberty et Varrot 2008, Sharon**

1996) L'exemple le plus marquant de lectines 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 (**Weiset al , 1990**) Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymerehydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (**Imberty, 2011**) Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriaes (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles(**Imberty et al., 2005**) *Entamoeba histolytica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes Viau mécanisme dépendant du contact. Cette assassinat implique la protéine de surface amibienne dénommé le Gal / Gal Naclectine se lie au galactose et au Nacétyl galactosamine permettant l'adhérence des amibes aux cellules hôtes (**Boettner et al, 2002**) Les lectines des 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 (mitogénicité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (Etzler, 1986 ; Kaminski et coll.,1987). D'autres études, suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (Etzler, 1986).

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'héماغglutination 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 (Gokeret 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 lectine

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

9.1.L'interactionlectine–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 noncovalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de La lectines (**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'activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation 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 antivirale

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wang et coll, 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus 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 animales comme les lectines récepteurs des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (**Singh et al, 2012**) aussi bien pour les lectines de type C qui résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al, 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al, 2012 ; Huang et al, 2014 ; Xu et al, 2014**)

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

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

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 tel le cancer sont associées 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 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 binding lectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectines du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (Roos et al., 2007). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (Kawsar et al., 2010). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytes. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytes grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – Fucose, récepteur de galactose et récepteur de β -glucan (Guénard et al, 2000).

Chapitre 2 : La plante

Nom de la plante : *Fredolia Aretioides*

Famille : Chenopodiaceae

Nom vernaculaire : Degga

Cette plante appartient à la famille botanique des CHENOPODIACEAE qui est représentée par des herbes, des sous-arbrisseaux, des arbrisseaux et même des arbustes qui se caractérisent par des feuilles alternes, rarement opposées, non stipulées, parfois très réduites. En Algérie, cette famille comprend 20 genres stipulées, parfois très réduites. En Algérie, cette famille comprend 20 genres représentés par 58 espèces, parmi lesquelles *Anabasis aretioides* connue localement sous le nom de « Degga » ou de « chou-fleur du Sahara » et de « choufleur de Bou Hamama ». C'est un sous-arbrisseau nain, formant des coussinets très denses, fortement hémisphériques, pouvant atteindre 2 m de diamètre.

Les feuilles sont nombreuses, très serrées et coriaces, devenant blanchâtres par la dessiccation.

Les fleurs solitaires et sessiles portent 5 étamines et un ovaire ovoïde atténué en un style court.

Le fruit est comprimé dorsalement. *Fredolia aretioides* est une plante endémique. Cette plante colonise, actuellement, une portion très restreinte du Sahara Nord-occidental algérien :

Dans la Wilaya de Béchar elle constitue des peuplements sur les regs de Béni-Ounif, Taghit, Igli, Béni Abbès et Zéghamra.

Dans la Wilaya de Tindouf, la plante constitue de vastes peuplements dans la région de Tabelbala, dans la Hamada de Tindouf et du Drâa.

L'aire de cette plante englobe une portion du Sahara septentrional où elle a été signalée par les botanistes à partir de 1848 entre Biskra et Touggourt, mais depuis cette date, sa présence n'a été que très rarement signalée.



Photo01: fredolia aretioides dans le desert algerien .



Photo02 : fredolia aretioides

Matériels et méthodes

1 Matériel végétale :

Notre étude a été réalisée sur une plante (*Fredolia aretioides*) qui a été récolté dans le sahara algerien .

2 .Méthodes :

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

c) Broyage :

la plante a été coupée, puis broyée dans un broyeur avec de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre.

d) Extraction :

100 g de poudre ont été dilués dans 500 ml de tampon PBS . (Annexe 01) à raison de 5ml/g

Puis sont mis sous agitation pendant 24h,

Après la centrifugation de la suspension à 4500tr/min pendant 30min, le surnageant est récupéré et conservé pour la réalisation des tests souhaités

3.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

4.Préparation des hématies à 3% :

le sang du lapin est collecté à partir des lapins provenant au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine 1. Les hématies du lapin sont collectées pour la mise en évidence la présence des lectines dans les extraits.

5.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.

6.Test de la limite d'hémagglutination :

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 2µl de l'extrait (*Fredolia aretioides*) 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'oeil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

7.L'effet température sur l'hémagglutination

Quatre tubes à essai, contenant chacun une aliquote de l'extrait brut ont été incubé à des températures différentes (40, 60, 80, 90 °C) dans un bain marie pendant 45 min. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à la température ambiante, enfin le test d'hémagglutination a été fait.

8..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.

On fait une precepitation des proteines au sulfate d'amonuim avec les 230ml du surnagent . Puis on fait les testes suivant . une a 45 % et une a 90% .

9.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 Na Cl 0,9%)(Annexe02) [Fructose, Glucose , Mannitol , Galactose , Lactose , Mannose , Rhamnose , Glucosamine HCL , Mucine, Fétuine ,Ovalbumine, BSA ,caséine.] . Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, cela permettre au lectines 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.

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.

10.L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G50.

a). La préparation de la colonne de Sephadex G50.

4 g de Sephadex G50 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,2). Le mélange a ensuite été incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne.

b). Dessalage de l'extrait sur la colonne Sephadex G50

le dessalage de notre extrait a été fait grâce au gel Sephadex G50

c) La récolte des Fractions et leurs faire une lyophilisation .

On a fait une lyophilisation a nos fractions obtenues après leurs passage sur la colonne .

11. Electrophorèse en gel de polyacrylamide :

Afin d'analyser la pureté des fractions ayant montré une forte agglutination, déterminer les fractions contenant la protéine d'intérêt et estimer la masse moléculaire de nos protéines, une électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE (sigle anglophone de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) est réalisée, ce concept permet d'analyser les protéines et les séparer en fonction de la masse moléculaire de la chaîne peptidique, C'est une technique dénaturante qui dissocie les complexes protéiques non-covalents. A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique, cette propriété leur confère la possibilité de migrer sous l'influence d'un champ électrique (certaines migrent vers l'anode, d'autres vers la cathode), dans cette technique, les protéines sont d'abord incubées avec un agent réducteur, le β -mercaptoethanol qui rompt les liaisons disulfures, et aussi avec le SDS qui est un détergent fort et qui, via sa longue chaîne hydrocarbonée forme des interactions hydrophobes avec les chaînes peptidiques des protéines de telle sorte à leur procurer une charge nette négative, dès lors elles migrent toutes dans la même direction à travers le gel de polyacrylamide et ne sont séparées qu'en fonction de leurs masses moléculaires. On utilise deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation suivant la taille, précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation), moins dense permettant au préalable de concentrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées. Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 50 μ l par puits, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8). Une fois la migration électro-phorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie.

12. Etude des propriétés anti-inflammatoires de la plante chez les rats

Le matériel végétal est constitué par la plante (*fredolia aretioides*)

Les rats Wistar adultes (100 à 120 grammes) sont utilisés pour les tests antiinflammatoires. Pour cet intervalle de poids le volume du pied des animaux est de 1 ml. Ils ont une alimentation composée de maïs (48%), blé (24%), poisson (22%), huile d'arachide (5%) et un supplément de sels minéraux et de vitamines.

Nous avons utilisé le dispositif de (**Bhatt et al.1977**) modifié pour évaluer le volume du pied des rats.

➤ Induction et détermination du volume de l'œdème

L'œdème est provoqué par l'injection dans l'aponévrose de la plante du pied de 0,1ml de formaldéhyde à 2% (**Sen et Nag, 1991**). Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0 ; 30 ; 60 ; 120 et 180 minutes après l'injection du formaldéhyde. Trente minutes avant

l'injection du formaldéhyde, les rats à traiter ont reçu par voie intrapéritonéale l'extrait brut de la plante . Le tampon (PBS) est utilisé comme produit de référence à la dose de 1ml.

Dans un autre lot les rats ont reçu le formaldéhyde ; trente minute après l'injection du Diclofénac avec une concentration de (10 mg /2 ml tampon PBS), les mesures d'inflammation sont effectuées à 30 ; 60 ; 90 minutes.

Le volume du pied est déterminé par immersion qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Nous ramenons le niveau de l'eau à sa position initiale dans la grande seringue à l'aide des deux petites seringues. Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée est directement lu sur les petites Seringues

Volume du pied	Immersion du pied
----------------	-------------------



Photo 03 : mesure de l'œdème

Le volume de l'œdème VT à un temps t donné est :

$$VT=Vt-V_0$$

- V0 : le volume initial du pied,
- Vti: le volume du pied au temps t.

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est selon (Szekely et al.1997) :

- % d'inhibition = $100 (VT_f - VT_p) / VT_f$
- VTf : le volume de l'œdème chez les rats ayant reçu uniquement le formaldéhyde,
- VTp : le volume de l'œdème chez les rats traités avec l'extrait.

Le nombre de rats utilisé pour chaque dose est de 5(cinq).

• **Photo 04 : Injection de nos échantillons ont été comme suit**

PBS, molécule, Diclofénac	Forme aldéhyde
	
Injection intrapéritonéale	Injection sous cutanée

- **Composition des lots (tableau04)**

			Dose injectée
Lot 1	Témoin	Tampon PBS	1ml
Lot2	Contrôle +	Forme aldéhyde	80 µl
Lot3	Contrôle -	Diclofénac +forme aldéhyde	84.8 µl + 80 µl
Lot 4	Traité	Molécule + forme aldéhyde	84 µl +80µl

- **Méthode d'injection**

Lot 1 : injection du PBS une seul fois.

Lot 2 : injection du forme aldéhyde une seul fois.

Lot 3 : injection du Diclofénac —————> après une demi-heure injection de la forme aldéhyde.

Lot 4 : injection de la molécule —————> après une demi-heure injection de la forme aldéhyde.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Le test d'hémagglutination

L'extrait de *Fredolia aretioides* sur la photo suivante, montre une très forte agglutination vis-à-vis les hématies du lapin, il s'agit et donc d'une hémagglutination positive. En absence de lectines, les cellules roulent au fond du puits où elles s'accumulent en un bouton rouge dense qui donne au contraire une hémagglutination négative. Ces Résultats sont similaires à ceux des lectines extraites des racines des plantes de *Moringa GEt 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).

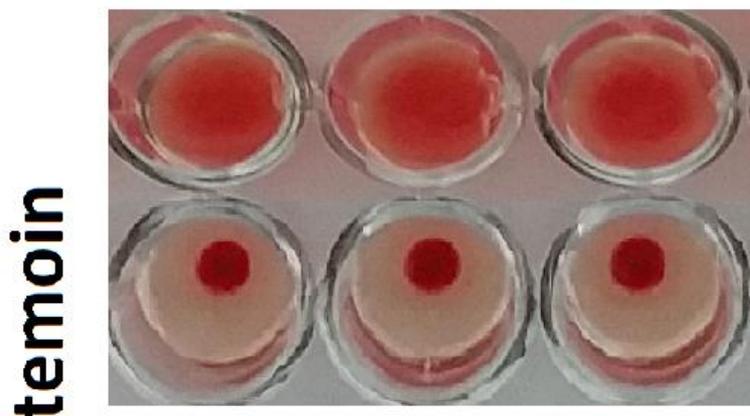


Photo05 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Fredolia aretioides*

2. La limite d'hémagglutination

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



Photo 06 : test de la limited'hémagglutination de *fredolia aretioides*

Nos résultats sur la photo 06 mettent en évidence une activité hémagglutinante de l'extrait de *Fredolia aretioides* jusqu'au 9^{ème} puit (1024) qui correspond à une concentration de 0,066µg/ml , ce qui est tout de même une concentration qui démontre clairement que le pouvoir agglutinant de nos lectines est réellement très important.. Dans une autre étude réalisée sur la lectines EHL isolées à partir d'*Euphorbia helioscopia*, l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml (**Shaista et al. , 2014**). Et d'après des travaux réalisés sur la truffe blanche du Sahara Algérien (*Terfezia bouderei*) ont montré une forte agglutination allant jusqu'au 7ème puits (**Zitouni et al ,2015**).

Temoin : Pbs + hématies du lapin.

3. Effet de la température sur l'hémagglutination

Les résultats obtenus après l'exposition de notre extrait à différentes températures

Tableau 06 :L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *Fredolia aretioides*

T°C	40	60	80	90
Plante FRE	++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination.

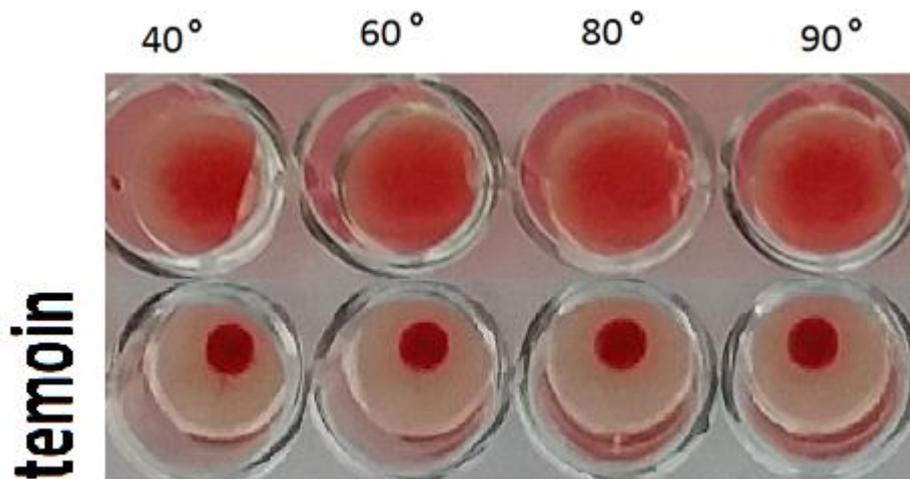


Photo 07: l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.

Le traitement thermique de l'extrait brut de la plante *Fredolia aretioides* à différentes températures de 40, 60, 80, 90°C pendant 45min, n'est pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante. Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistantes à la température. Cette thermorésistance à des températures assez élevées s'observe chez beaucoup de lectines. Comme c'est le cas des lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* et les racines des plantes *Cyperus rotundus*, *Pistacia Lentiscus* et *Ruta graveolens* qui résistent jusqu'à 100°C (Necib et al, 2015).

Temoin : Pbs + hématies du lapin.

4.L'effet du pH sur l'hémagglutination

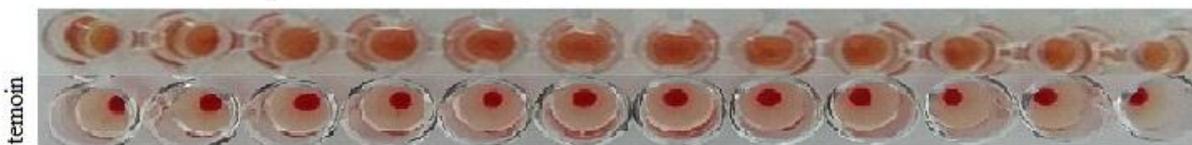


Photo 08: L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de *Fredolia aretioides*.

PH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait												
FRE	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Très forte agglutination.

L'extrait *Fredolia aretioides* manifeste la même résistance tout le long de gamme du pH testée de 1 jusqu'à 12. L'activité d'hémagglutination des lectines de l'extrait *Fredolia aretioides* reste stable tout au long de gamme du pH testée de 1 à 12. Ces résultats ont été comparés çà ceux de *Cyperus rotundus* et de *Pterocladia capillacea* qui ont montré que la lectine reste stable aux pH compris entre [2et12] (Necib et al, 2015).

5. L'effet d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et glycoprotéines

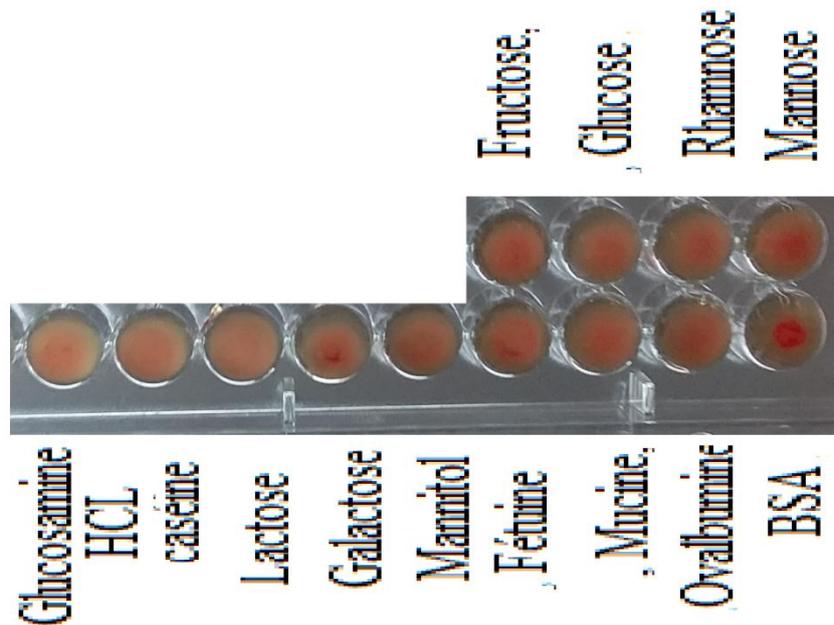


Photo 09 : Le test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait de *Fredolia aretioides*

L'extrait *Fredolia aretioides* a montré une inhibition avec les glycoprotéines BSA,. Le même résultat a été obtenu avec les lectines extraites à partir de *Pistacia Lentiscus* (Necib *et al*, 2015) L'extrait de *Fredolia aretioides* a montré une agglutination avec tous les sucres testés, C'est le cas des lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (Valadez *et al*, 2011) et à partir de bactérie *Canavalia ensiformis* (Kulkarni *et Tayade*, 2013).

9. Purification et dessalage des lectines par chromatographie sur colonne de Sephadex G50

Avant le passage à cette opération de dessalage nous avons opéré sur notre extrait une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium à deux pourcentages de saturation 45% et 90%.

Le résultat de cette opération est relaté sur les graphes suivants :

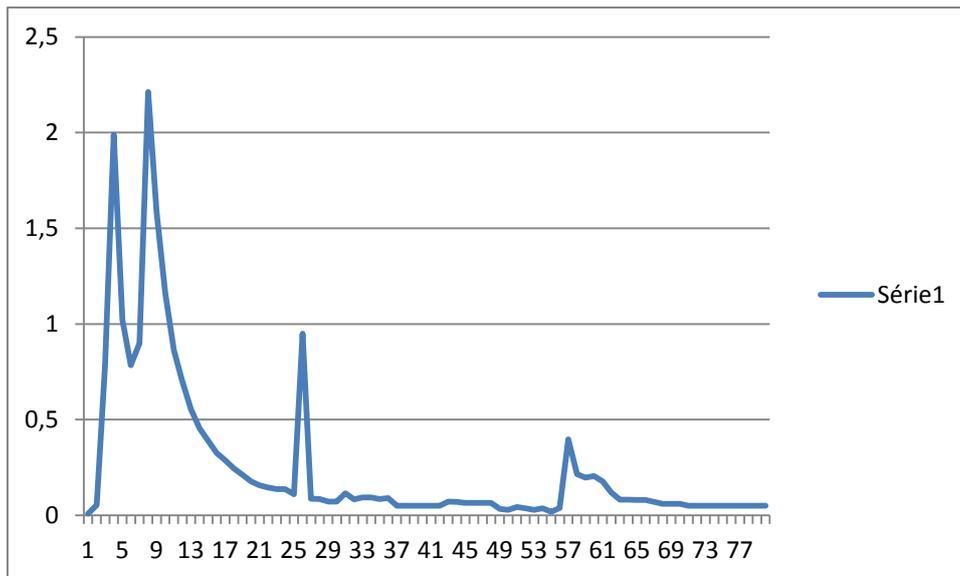


Figure08 : Courbe représentant l'éluion de l'extrait précipité a 45% de saturation au sulfate d'ammonium *fredolia aretioide* sur colonne de Sephadex G50.

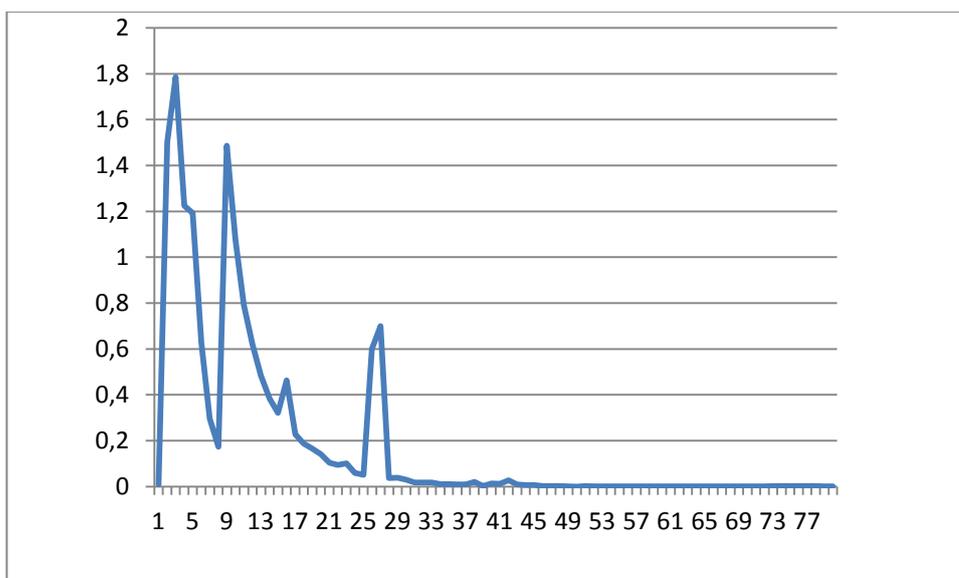


Figure09 : Courbe représentant l'éluion de l'extrait précipité a 90% de saturation au sulfate d'ammonium *fredolia aretioide* sur colonne de Sephadex G50.

Le volume de rétention : 5ml.

L'éluant : PBS à 0.1 M, pH 7,2.

La longueur d'onde : $\lambda = 280\text{nm}$.

La filtration des extraits de *Fredolia aretioides* (figure 08 et 09) sur colonne de Sephadex G50 et la lecture à 280nm a donné lieu à quatre pics dans la courbe.

Afin de confirmer la présence des lectines au niveau du 3^e, 9^e, 27^e et 59^e fraction obtenues après la précipitation a 45% au sulfate d'ammonium et les

fractions 3 , 11, 28 pour la précipitation a 90% au sulfate d'ammonium de l'extrait, un test d'héماغglutination a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit dans le chapitre précédent. Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence des lectines avec une très forte héماغglutination.

Nous avons ainsi décidé de mélanger nos sept (07) fractions pour enrichir notre extrait en protéine , afin de pouvoir réaliser le reste de nos manipulations .

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur les lectines de *Pterocladia capillacea* et des lectines de *Morus nigra* séparées par chromatographie sur colonne de Sephadex G75 (Necib *et al*, 2014) (Necib *et al.* , 2015) par contre l'extrait de lectines de *Ruta graveolens* séparées par chromatographie sur colonne de Sephadex G75 a donnée deux pics (Necib *et al*, 2015).

10-Concentration et lyophilisation des fractions ayant donné lieu à une activité héماغglutinante :

C'est une opération que nous avons réalisé grâce à un tube concentrateur qui sera centrifugé pour éliminer le maximum de tampon et faciliter la tache au lyophilisateur.

11-Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a donné le profil électro-phorétique suivant

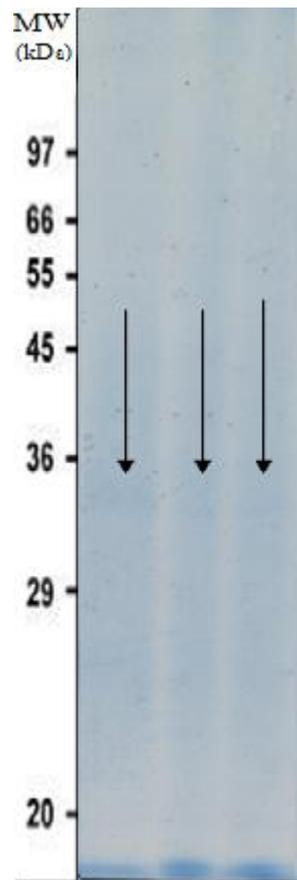


Figure10 : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes

Ligne 01 : 50 µl d'extrait - Ligne 3 : 70 µl d'extrait - Ligne 2 : 50 µl du lyophilisat

Les échantillons relatifs aux deux puits 1et3 correspondant à l'extrait avec deux concentrations respectives de 50 µl et 70 µl, et le puits 3 correspondant au lyophilisat avec 50µl , révèlent chacun deux sous unités se situant dans des zones dont le poids moléculaire est de l'ordre de 35 à 36 KDa pour l'une et de 8,5 à 9 KDa pour l'autre. On peut penser à ce stade que l'on se trouve dans le cas d'une présence de deux (02) lectines différentes avec deux PM différents, soit avec une seule lectine avec quatre (04) isoenzymes de PM 8,5 à 9 KDa que seule une électrophorèse en conditions non dénaturantes peut nous fixer sur le PM de ces lectines.

D'autres auteurs rapportent que les poids moléculaires des lectines fongiques sont d'une grande variabilité, ils se situent généralement entre 15KDa et 90KDa mais la majorité se situe entre 23KDa et 36KDa avec une à six sous-unités (**Feroz khan, 2001**). Quatre sous-unités furent trouvées chez la lectine de « *Pleurocybella porrigens* » (**Suzuki et al., 2009**) et la lectine extraite de « *Agaricus Blazei* » (**Kawagishi et al., 1988**).

12. Résultats du test anti-inflammatoire sur les rats :

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont représentés sous forme de moyenne et variance .Le traitement statistique avec des comparaisons multiples entre les différents groupes ont été exécutés par des mesures répétées ANOVA.

Le tableau suivant résume l'ensemble de nos données :

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Varianc e</i>
Ligne 1	5	5	1	0
Ligne 2	5	12.7	2.54	0.003
Ligne 3	5	13.4	2.68	0.057
Ligne 4	5	14.7	2.94	0.038
Ligne 5	5	11.4	2.28	0.092
Ligne 6	5	11.2	2.24	0.008
Ligne 7	5	10.8	2.16	0.053
Ligne 8	5	5	1	0
Ligne 9	5	6.5	1.3	0.005
Ligne 10	5	7.8	1.56	0.008
Ligne 11	5	6.1	1.22	0.022
Ligne 12	5	8.9	1.78	0.077

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabi lité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	24.9938333	11	2.27216667	75.1129 477	2.2219 E-26	1.99458001
A l'intérieur des groupes	1.452	48	0.03025			
Total	26.4458333	59				

Tableau 08: Analyse de variance du groupe des rats

lot 1	1
lot 2	2.72
lot 3	2.22
lot 4	1.37

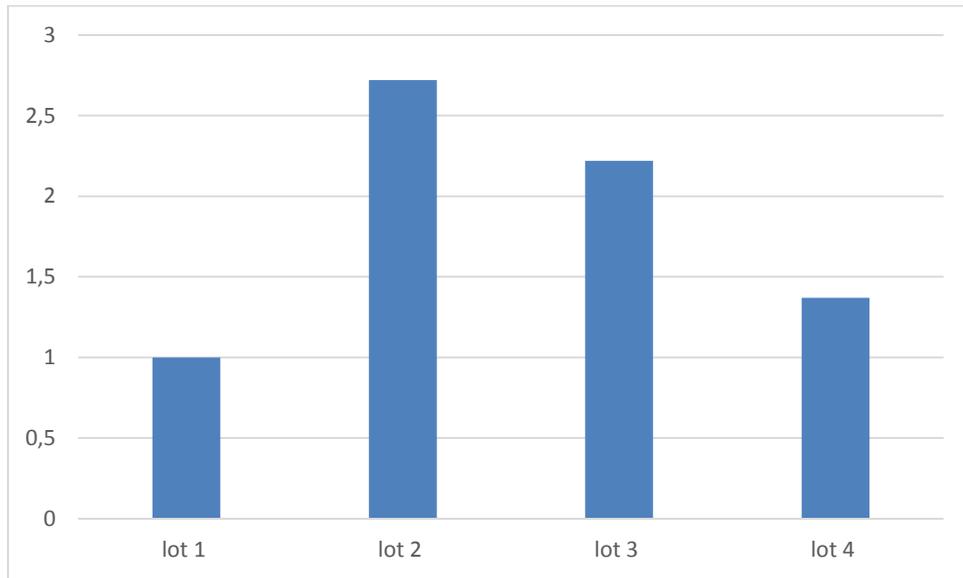


Figure11 : effet anti-inflammatoire d'un extrait de lectine après injection de formaldéhyde chez les rats .

Sur le premier lot (temoin) on ne constate aucune inflammation . tandis que le deuxième lot auquel nous avons injecté du formaldéhyde on constate une inflammation importante (**œdème**) .

Quant au troisième lot auquel nous avons injecté du diclofénac+formaldéhyde, on constate une baisse de l'inflammation. Et enfin pour notre dernier lot , auquel nous avons injecté notre extrait + formaldéhyde , on constate aussi une baisse de l'inflammation plus appréciable qu'avec le diclofénac . qui peut nous révéler une éventuelle activité anti-inflammatoire de notre extrait.

Ce résultat mériterait d'être confirmé avec d'autres doses de diclofenac élevées allant jusqu'à 150mg /kg de poids corporel du rat car, en ce qui nous concerne nous n'avons utilisé que 25mg/kg. Cela ne diminue en rien au mérite accordée aux lectines de cette plante naturelle.

CONCLUSION

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.

Nous avons extrait des substances à partir de la plante : *Fredolia aretioides* ces molécules ont une activité agglutinante sur les hématies et donc ce que signifie la présence de lectines.

Les lectines de *fredolia aretioides* sont thermorésistants, et ils sont différemment stables dans la gamme des pH neutre, alcalin et acide.

, Les lectines de *fredolia aretioides* sont inhibés par les glycoprotéines BSA,

La chromatographie sur Sephadex G50 a donné deux pics pour l' extrait. Ce travail peut être la première étape d'une naissance des nouvelles lectines. Les résultats obtenus encourageant la poursuite des études par : Des tests de l'activité antimicrobienne, l'activité antivirale, l'activité anticancéreuse et l'activité immune modulatrice.

Notre plante a fait preuve d'un début d'une activité anti-inflammatoire , ce test nous encourage a poursuivre et a pousser les études sur l'effet anti-inflammatoire de cette plante .

Liste Bibliographiques

Alencar .N.M, Cavalcante CF, Vasconcelos .M.P, Leite KB, Aragao .K.S, Assreuy .A.M, 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.

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.

Assreuy.A.M.S (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.

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

Boettner.D.R, Huston.C ,Petri.J.R, William.A.(2002). Galactose/ Nacétylgalactosaminelectin : the coordinator of host cell killing. J. Biosci 27 , 553-557.

Bothan .M.B, 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.

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

Boyd .W.C, 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 .W.C 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 lapratique clinique. 2ème édition .DE BOECK .196.

Brooker M. I. H. &Kleinig D.A. (2006).Field guide to Eucaliptus.Vol.1.Southeastern Australiathirdedition.Bloomings. Melbourne.

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

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

Chennoufi R., Morizur J. P., Richard H. & Sandret F. (1980). Etude des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* du Maroc. (Feuilles de jeunesse et feuilles adultes). *Riv. Ital. E. P. P. O. S.*, 62(7) : 353-357.

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

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

Daizy R. B., Harminder P. S., Ravinder K. K. & Shalinder K. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, **2565** :(12), 2166-2174.

Dam T.K and Brewer C.F. (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 .

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.

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

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

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

Dole.Aet Lindeberg S. (2005).Agrarian diet and diseases of affluence-do evolutionary noveldietrylectins cause leptin resistance.Bio,med central lid.doi .10.1186 ,1472-6823-5-10 .

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

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

Emsley.J, White H.E, O'Hara B.P, Oliva G, Srinivasan N, Tickle I.J, Blundell T.L, Pepys M.B and Wood S.P. (1994) . Structure of pentameric human serum amyloid P component. Nature. 367, 338-345.

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

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.

Farjon A (1984) Pines: dessins et descriptions du genre *Pinus*. 2ème edn. E.J. Brill, Leiden, Pays-Bas, p. 235

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

Gayda, Arnaud. Etude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie. Toulouse : Thèse, 2013

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

Goker H, Haznedaroglu I.C, Ercetin S et al. (2008). Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract ankaferd blood steeper. *Jint. Med. Res* (36) , 163170.

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 descarcinomes mammaires. Bull Cancer. 91, 141-158.

H**ardman K.D and Ainsworth CF. (1972).** Structure of concanavalin A at 2.4 A resolution. Biochemistry. 11, 4910-4919.

HirabayashiJ.(2004). Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycanprofiling. Glycoconj. J.21, 35-40.

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.

I**mberty Anne. (2011).** Les bactéries aiment nos sucres : approche structurale etthermodynamique 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 surfaceglycoconjugates. 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.

Jaffe W.G. (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.

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.

Kaminski P.A, 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. Belgrade* 62(4), 1027-1034.

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

Kim D.s, Lee HJ, Jeon YD et Al. Alpha-pinène Expositions activité anti-inflammatoire par la suppression de MAPK et la voie NF-κB dans la souris péritonéale Macrophages. *Am J Chin Med.* 43, 2015, vol. 4, 731-42.

Kramer .K.U, Green PS (1990) Les familles et les genres des plantes vasculaires, vol. 1 Pteridophytes et Gymnospermes. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.

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.

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

Laija. S. N., Mahesh. S., Smitha. L. S., Remani. P. Isolation and partial characterization of two plant lectins. *Current Research Journal of Biological Sciences*,
2010. 2(4): 232-237.

Leffler .H , CarlssonS, Hedlund .M, QianY and Poirier.F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433-440.

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

Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986). The lectins Properties. Functions and Applications in biologie and 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 .

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

Mioulane, Patrick. Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Londres : Bordas, 1996. ISBN 2-04-027239-9.

MukherjeeS , ZhengH , Derebe .M.G, CallenbergK M , PartchC L, RollinsD , Propheeter .D.C, Jiang .Q.X.(2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. Nature. 505, 103–107.

Murdock.L.L, Shade.R.E .(2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. J.Agric. food. Chem. 50 (22),6605-6611 .

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

Naturactive. Bien-être et santé, tout savoir sur les plantes et les huiles essentielles. 75009 Paris : Santecom S.A.S, 2014. 795282 - 03/2013.

Necib. Y., Bahi A ., Derri. N, Fateh Merouan. F, Bouadi. H.,Boulahrouf. K. Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**. 4(1):1707-1719

Necib Y, BahiA ,Merouane F , Bouadi H , Boulahrouf K.(2015). Immunomodulatory activity of lectines 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 .(2015). comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Rutagraveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1720-1733.

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

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

Peumans. W.J, Vandamme. J.M.(1995). lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol*. 109, 347-352.

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 *ani* **Prix**

RA, Liston A, Strauss. S.H (1998) Phylogénie et systématique de *Pinus*. Dans: Richardson DM (ed) *Ecologie et biogéographie de Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, pp. 49-68. **males: les galectines.** *Immunoanal. Biol. Spéc* 11, 297-305.

Ramata N. (2010). Etude de l'activité hématagglutinante 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.

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

RobertK,Marry .M.D,PhD.(2008). Les glycoprotéines in *Biochimie de Harper*. DEBOECK ,527.

Roberts.D.L, Weix.D.J , Dahms.N.M 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, Lillcrap 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.

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

Sharon N. (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

Singh J (2012) Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis* 25: 530–536

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 SLe^x and PSGL-1. *Cell*. 103, 467-479.

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 andtherapie. 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 Tlymphocytes by a calcium dependent pathway. J. Cell. Biochem.y. 92, 1193-1202.

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

Topfer-Petersen E , Romero A , Varela PF , Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L and Calvete JJ. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses andperspectives. 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., Zuñiga. P. C., Jose Gutierrez. S. J., Becerril. F. M. Purification, BiochemicalCharacterization, and Bioactive Properties of a LectinPurifiedfrom the Seeds of WhiteTepary Bean (PhaseolusAcutifoliusVarietyLatifolius) *.Molecules, 2011. 16: 2561-2582*

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

virmani O.P. & Datta S. C. (1967). Oil of *Eucalyptus citriodorap.* and E. O. R. Decembre, 851-858.

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

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

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 models. 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 *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocytaphagocytosis. Dev. Comp. Immunol. 2014. 44, 397–405 .

Yeh .K.W, Chen.J.C, Lin .M.I , Chen .Y.M , 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 .

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.

Liste des Annexes

Annexe 01 : Préparation du Tampon

Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH7,4) 5L

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

Annexe 02: Préparation des Monosaccharides et glycoprotéines .

•Préparation des monosacchari et desglycoprotéines .

Sucre/glycoprotéines	Na Cl
0,1 g	1 ml

Présenté par : Hichour Mohamed Ibrahim

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie Appliquée

Résumé :

Les lectines forment une famille de protéines et de glycoprotéines hétérogène ayant la capacité de se lier spécifiquement et de manière réversible aux hydrates de carbones.

Elles peuvent être d'origine animale , végétale , bactérienne , ou virale.

Notre objectif est de faire une extraction des lectines à partir de notre plante (*fredolia aretioides*) et de faire leur caractérisation .

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante , rendre compte de leur pHi , leur thermo-stabilité et leur interactions avec les sucres , une électrophorèse et un test de leur effet anti-inflammatoire .

Mots clés : Lectines, Extraction, Hémagglutination, Sucres, glycoprotéines

Laboratoire de recherche : BIOCHIME.

Jury d'évaluation :

Président du jury : <i>Necib Y</i>	(Pr - UFM Constantine),
Rapporteur : <i>Zitouni A</i>	(MCB - UFM Constantine),
Examineur : <i>Hafi A</i>	(MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 03/07/2018