



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



FACULTÉ DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE & BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

MÉMOIRE EN VUE D'OBTENTION DU MASTER

SPÉCIALITÉ: Biochimie

PRÉSENTÉ PAR: • ZITOUNI Adel
• OGAB Youcef

THEME :

**Extraction, purification et caractérisation des lectines
produites par des noyaux des dattes "Deglet noir".**

Membre du jury :

Président : NECIB Y

Pr Université des Frères Mentouri Constantine

Encadrant : BOULAHROUF Khaled

MCB Université des Frères Mentouri Constantine

Examineur : ZITOUNI Abdelbaki

MCB Université des Frères Mentouri Constantine

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Ce travail est le fruit de la combinaison d'efforts de plusieurs personnes.

Nous remercions tout d'abord le tout puissant qui, par sa grâce nous a permis d'arriver au bout de nos efforts en nous donnant la santé, la force, le courage et en nous faisant entourer des merveilleuses personnes dont on tient à remercier.

Nos remerciements s'adressent à notre encadrant DOCTEUR **BOULAHROUF Khaled**, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, ses compétences et sa clairvoyance nous ont été d'une aide inestimable.

On tient à remercier également les membres du jury **Pr NECIB.Y** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et **Dr ZITOUNI Abdelbaki** pour sa contribution à l'évaluation et l'examen de notre mémoire .

On adresse également nos remerciements au responsable du laboratoire de microbiologie appliquée monsieur **BOULAHROUF Abderrahmane** de nous avoir chaleureusement accueilli au sein du laboratoire de microbiologie appliquée et nous lui souhaitons un prompt rétablissement.

Tous les enseignants de faculté de science de la nature et de la vie et plus précisément les enseignants du département de biochimie & biologie cellulaire et moléculaire, pour leurs enseignements de qualité et leurs conseils qui nous ont permis de poursuivre notre itinéraire académique jusqu'à présent

Dédicace

On dédie ce modeste travail à mes défunts **parents**, source de vie, d'inspiration et
d'amour.

A ma très chère sœur **Zitouni Affef**, source de joie et de bonheur.

A toute ma famille, source d'espoir et de confiance

Spécialement mon cher cousin **Bourioune Abdelmouiz** qui nous a prêté son aide
pour la réalisation de ce mémoire.

Par ailleurs, je remercie aussi docteur **TORECH Imen** et monsieur **BOUDERSSA
Nabil** responsable de laboratoire de biochimie de l'université Mentouri de
Constantine.

A tous mes **amis** qui m'ont soutenu.

Adel.



Dédicace

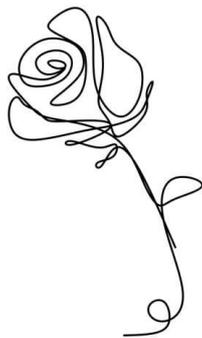
C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail à :

L'être le plus cher de ma vie, ma mère

Celui qui ma fait de moi un homme, mon père

Aux cinq étoiles qui brillent dans mon ciel, mes sœurs

Youcef.



Liste des abréviations

BSA: *Bovine sérum albumine.*

CMI : concentration inhibitrice minimale.

pH: potentiel hydrogène.

ml: Millilitre.

mg/ml: Milligramme par millilitre.

PBS: Phosphate di-sodique.

Zn: Zinc.

Cu: Cuivre.

Mn: Manganèse.

Ca: Calcium.

P: Phosphore.

K: Potassium.

Fe: Fer.

CRD: *Carbohydrate recognition domain.*

ConA: Concavaline A lectine.

HPLC: *High performance liquid chromatography .*

Liste des figures

Figure 1. Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire; Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.	5
Figure 2. Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de <i>canavalia ensiformis</i> en complexe avec le tri mannoside (Lenka, 2006).	7
Figure 3. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka <i>et al</i> , 2006).	8
Figure 4. Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i> (Lenka, 2006).	8
Figure 5. L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-IIL (Gianluca, 2006). (2)	10
Figure 6. La classification structurale des lectines des plantes (Van Damme <i>et al</i> ; 1998).	12
Figure 7. Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier (Munier, 1973).	17
Figure 8. Schéma d'extraction des lectines à partir de poudre de noyaux de dattes deglet noir.	21
Figure 9. Déplacement des molécules dans les diverses parties d'un gel de filtration selon leur taille et forme.	24
Figure 11. Chromatographie sur colonne gel de filtration (Séphadex G-50).	30
Figure 12. Observation de l'activité hémagglutinante en fonction de la T° (....	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Historique des découvertes des lectines et leurs propriétés (Renato et col, 1991).....	6
Tableau 2. Exemples des Lectines et leur distribution dans le monde vivant.	15
Tableau 3. Domaine de fractionnement du gel Séphadex G-50 (Dextran).	23
Tableau 4: Limite de l'activité hémagglutinante des extraits des noyaux de dattes.	29
Tableau 5. Les résultats des tests d'ihnhibition d'hémagglutination par les saccharides.	31
Tableau 6. Le résultat du test d'ihnhibition d'hémagglutination par la BSA	31
Tableau 7. Les résultats des tests d'ihnhibition d'hémagglutination par les métaux.	32
Tableau 8. Les concentrations minimales inhibitrices de l'hémagglutination.	33
Tableau 9. La limite de l'activité hémagglutinante en fonction de la température.....	35
Tableau 10. La limite de l'activité hémagglutinante en fonction du pH.....	35

Liste des photos

Photo 1. Colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Séphadex G-50.....	23
Photo 2. L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de noyaux de dattes.....	28
Photo 3. Observation des résultats de la limite d'hémagglutination à l'œil nu.....	28
Photo 4. Test d'hémagglutination des cinq tubes récoltés.....	30
Photo 5. Test d'inhibition de l'hémagglutination par les sucres placés par ordre respectif du tableau.....	32
Photo 6. Test d'inhibition de l'hémagglutination par la BSA.....	32
Photo 7. Test d'inhibition de l'hémagglutination par les métaux placés par ordre respectif du tableau.	32
Photo 8. Test limite d'inhibition de l'hémagglutination par les sucres, les métaux et la protéine par ordre respectif du tableau.....	33
Photo 9. Observation de l'activité hémagglutinante en fonction de la T° (40 et 60°C).....	34
Photo 10. Observation de l'activité hémagglutinante en fonction de la T° (80,100 et 120°C).	34

Résumé

Le but de cette étude est la détection d'une lectine en quantité appréciable, et la détermination de ses propriétés physicochimiques. Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires à activité biologique. Nos expérimentations ont été réalisées sur les noyaux de dattes Deglet nour pour mettre en évidence la lectine recherchée. Après séchage, broyage et extraction dans une solution tampon PBS (0.01M pH7.2) et macération durant 24 heures, la détection et la quantification de lectines est réalisée par agglutination par le sang de lapin et en double dilution dans des microplaques à titration en forme U. L'activité agglutinante de l'extrait des noyaux de dattes est présente jusqu'au septième puits (sixième dilution ; 1/128). Le dosage de protéines de l'extrait brut a donné 0.454mg de protéines/ml. La séparation par la chromatographie d'exclusion démontre cinq pics, dont les trois derniers donnent l'activité hémagglutinante. Les fractions récoltées à partir de ces pics nous fournissent l'extrait purifié d'une concentration de 0.16mg de protéines/ml. Un test d'inhibition avec différents sucres, métaux et une protéine montre que les lectines des noyaux de dattes sont spécifiquement inhibées par le Glucosamine HCl, le Saccharine sodique, le Chlorure d'aluminium et la BSA, donc notre lectine éprouve une affinité pour ces éléments. Le traitement thermique de 40 jusqu'à 120°C n'a pas affectée l'activité agglutinante de la lectine (donc ; thermorésistante), et stable dans la gamme de pH (3 à 9).

***Mots clés :** Lectines, glycoprotéines, noyaux de dattes, hémagglutination, PBS, chromatographie d'exclusion.

الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن كمية معتبرة من الليكتينات ، وتحديد خواصها الفيزيائية و الكيميائية. الليكتينات هي عبارة عن بروتينات سكرية ذات نشاط بيولوجي واسعة الانتشار. تجارينا أجريت على الليكتينات المستخرجة من نواة دقلة نور. بعد التجفيف والطحن نقوم بنقع الناتج في محلول (0.01M pH7.2) PBS لمدة 24 ساعة، ثم يتم الكشف عن الليكتينات و حساب كميتها بعد تراصها مع كريات دم الأرنب ثم اجراء تخفيف مزدوج عليها في وعاء المعايرة الجزئية. يمكن ملاحظة التراص حتى البئر السابع (أي التخفيف السادس 1/128). معايرة البروتينات للمستخلص الخام تعطي 0.454مغ /مل. يظهر الفصل الكروماتوغرافي خمس ذروات، الثلاثة الأخيرة منها تعطي نشاطا للتراص الدموي، باستخدام الأجزاء المتحصل عليها المشار إليها بثلاث ذروات الأخيرة نتحصل على المستخلص المنقى بتركيز 0.16 مغ/مل. ويبين اختبار التثبيط مع السكريات والمعادن المختلفة والبروتين أن الليكتينات يتم تثبيطها بصفة خاصة من قبل غلوكوزامين HCl، صوديوم ساكارين، كلوريد الألمونيوم، و BSA، وبالتالي فإن الليكتينات لديها تكامل مع هذه العناصر. عند القيام بمعالجة حرارية (من 40 إلى 120°م)، نلاحظ إستقرار الليكتينات و يتجلى ذلك من خلال استمرارية نشاطها التراصي ومنه نستنتج أن الليكتينات مقاومة للحرارة، كما نلاحظ استقرارها بين pH (3 إلى 9).

*الكلمات الرئيسية : الليكتينات، البروتينات السكرية، نواة التمر، التراص الدموي، PBS، كروماتوغرافية الفصل .

Abstract

The purpose of this study is to examine a significant amount of lectins, and determine its physical and chemical features. Lectins are glycoproteins with such wide spread biological activity. Our experiments were done on lectins extracted from deglat nour grains. After drying and grinding we soak the resulting in a solution PBS (0.01 pH7.2) for 24hours, then we examine the lectins and measure its amount after it agglutinates with the rabbit blood cells, then we do a double dilution in microplate. We can observe agglutination till the seven well (ie; sixth dilution 1/128). Protein dosage of the crude extract gives 0.454mg of proteins/mg. The chromatographic separation on Sephadex G-50 gel shows five peaks. The rest three peaks give hemagglutination activity. Using the obtained parts indicated with three last peaks, we get the purified extract with the concentration of 0.16mg/ml. The inhibition test with the saccharides and different types of metal and protein shows that the lectins are being inhibited in particular way by the Glucosamin HCl, Sodium saccharin, BSA and Aluminium chloride. Thus the lectins have complementarity with these elements. When we do thermo-treatment (from 40 to 120°C), we can observe that the lectins stabilizes and that occurs from the continuity of its agglutination activity, there for we deduce that the lectins are thermo resistants. We can also observe its stabilization between pH (3 to 9).

***Key words:** Lectins, Glycoproteins, Dates grain, Hemagglutination, PBS, Chromatography of exclusion.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES PHOTOS

RÉSUMÉ

INTRODUCTION.....2

I CHAPITRE1 : GENERALITES SUR LES LECTINES5

I.1 DEFINITION5

I.2 HISTORIQUE6

II LA STRUCTURE DES LECTINES7

II.1.1 LES LECTINES SIMPLES.....7

II.1.2 LES LECTINES EN MOSAÏQUES.....7

II.1.3 LES ASSEMBLAGES MACROMOLECULAIRES.....8

II.1.4 LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE.....8

II.2 LE ROLE BIOLOGIQUE DES LECTINES.....9

II.3 LA SPECIFICITE ET AFFINITE DES LECTINES.....10

II.4 CLASSIFICATION DES LECTINES11

II.4.1 CHEZ LES ANIMAUX.....11

II.4.1.1 Les lectines extracellulaires11

II.4.1.2 Les lectines intracellulaires.....11

II.4.2 CHEZ LES VEGETAUX.....11

II.4.2.1 Les mérolectines11

II.4.2.2 Les hololectines.....11

II.4.2.3 Les chimérolectines.....11

II.4.2.4 Les superlectines.....11

II.5 PROPRIETES DES LECTINES.....12

II.5.1 PROPRIETES BIOLOGIQUES.....12

II.5.1.1 L'interaction lectine-glucide12

II.5.1.2 L'agglutination des cellules.....12

II.5.1.3 L'activité mitogène.....12

II.5.1.4 Effets mimétiques des hormones13

II.5.2 LES PROPRIETES MEDICINALES DES LECTINES13

II.5.3 INHIBITION DE LA CROISSANCE DES CELLULES CANCEREUSES.....13

II.5.4 PROPRIETES ANTIVIRALES13

II.6 L'INTERET DES LECTINES13

II.6.1 EN BIOCHIMIE ET PROTEOMIQUE.....13

II.6.2	DANS LE DOMAINE BIOMEDICAL.....	14
II.6.2.1	Hématologie.....	14
II.6.2.2	Immunologie.....	14
II.6.2.3	Biologie cellulaire	14
II.6.2.4	Cancérologie	14
II.6.3	DANS LE DOMAINE AGRONOMIQUE	14
II.7	LA DISTRIBUTION DES LECTINES DANS LE MONDE VIVANT	14
II.7.1	LES LECTINES DES MICROORGANISMES.....	15
II.7.1.1	Les lectines bactériennes.....	15
II.7.1.2	Les lectines viral	15
II.7.1.3	Les lectines des champignons.....	15
II.7.2	LES LECTINES ANIMALES	15
II.7.3	LES LECTINES VEGETALES	16
III	MATERIEL VEGETAL.....	17
III.1	DATTES.....	17
III.1.1	ASPECT BOTANIQUE	17
III.1.2	CLASSIFICATION DES DATTES.....	17
III.1.3	LES DIFFERENTES VARIETES DE DATTES.....	18
III.1.4	USAGE MEDICINAL DES DATTES	18
III.2	NOYAUX DE DATTES	18
III.2.1	LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES NOYAUX DE DATTES.....	18
III.2.2	ACTIONS PHARMACOLOGIQUES.....	19
III.2.2.1	Fonction antiseptique.....	19
III.2.2.2	Fonction cosmétologique	19
III.2.2.3	L'activité antivirale	19
IV	MATERIEL ET METHODES	21
IV.1	PREPARATION DES NOYAUX DE DATTES	21
IV.2	EXTRACTION DES LECTINES PAR LA SOLUTION TAMPON.....	21
IV.3	TEST D'HEMAGGLUTINATION ET MISE EN EVIDENCE DES LECTINES	22
IV.4	DOSAGE DES PROTEINES.....	22
IV.5	EXTRACTION DES LECTINES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	23
IV.6	TEST D'INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION PAR DES SACCAHRIDES ET METAUX ET PROTEINES	25
IV.7	TEST DE LA LIMITE D'INHIBITION D'AGGLUTINATION PAR LES SACCHARIDES, METAUX ET PROTEINES.....	25
IV.8	EFFET DE LA TEMPERATURE ET DU PH SUR L'HEMAGGLUTINATION	25
V	RESULTATS ET INTERPRETATION.....	28
V.1	TEST D'HEMAGGLUTINATION.....	28
V.2	DOSAGE DES PROTEINES DE L'EXTRAIT BRUT.....	29
V.3	EXTRACTION DES LECTINES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	29
V.4	3. DOSAGE DES PROTEINES	31
V.5	TEST D'INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION PAR DES SACCAHRIDES ET METAUX ET PROTEINES	31

V.6	TEST DE LA LIMITE D'INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION PAR LES SACCHARIDES, METAUX ET PROTEINES	33
V.7	L'EFFET DE LA TEMPERATURE ET DU PH SUR L'HEMAGGLUTINATION	34
V.7.1	TEMPERATURE.....	34
V.7.2	PH	35

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ANNEXES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ***Introduction***

Introduction

Les lectines forment un groupe de protéines où glycoprotéines d'origine non-immune, qui se lient de façon **spécifique** et **réversible** pour former des liaisons **non-covalentes** avec des saccharides et ne montrent **aucune activité enzymatique** envers leurs substrats ; la notion lectine est basée sur la reconnaissance spécifique de la protéine d'un motif saccharidique porté par la membrane d'une cellule (sanguine où non), et c'est comparable à une réaction **Ac-Ag**.

La structure des lectines leur apporte la capacité d'**agglutiner** des cellules portant sur leur membrane externe des fractions saccharidiques appropriés, l'agglutination des hématies où hémagglutination aboutit à la formation de petits amas visibles à l'œil nu. Cette caractéristique est typique des lectines, et classiquement utilisée pour la **détection**, **l'isolation** et la **caractérisation** d'oligosaccharides.

Les lectines sont des molécules ubiquitaires (omniprésentes), car elles se trouvent dans quasiment toutes les classes d'organisme, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et animaux. Elles possèdent plusieurs propriétés biologiques, notamment : l'activité mitogène (stimulation lymphocytaire), l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antivirales et effets immunologiques.

Les lectines sont largement distribuées dans le monde végétal et sont des anti-nutriments (protègent les végétaux contre la germination précoce et contribuent à éloigner leurs prédateurs). Lorsqu'elles sont consommées et en grande quantité, elles peuvent devenir problématique ; dont leur capacité de survivre à la digestion humaine et d'irriter les parois digestives entraînant l'hyperperméabilité intestinale, et également entraver l'assimilation des nutriments utiles.

L'objectif spécifique vise à évaluer l'activité agglutinante des lectines sur des hématies de lapin, extraites à partir de noyaux de dattes (Deglet Nour) venus tout droit du Sahara algérien. Etudier l'effet du traitement thermique et du pH sur la fermeté de ces lectines, investiguer la spécificité de ces lectines par le test d'inhibition avec des glucides et ensuite procéder la chromatographie sur colonne sur gel Séphadex G-50, afin d'améliorer l'activité d'hémagglutination de l'extrait brut.

Notre travail sera divisée en deux sections : la première section est une étude bibliographique comprend deux chapitre, dont le premier chapitre est consacré à une revue sur les lectines, en particulier une généralité, historique, classification, spécificité, distribution et leur application dans différents domaines, et le deuxième comprend le matériel végétal, nous avons présenté les dattes et leur aspect botanique, leurs noyaux, leurs compositions biochimiques et utilités pharmacologiques.

Introduction

La seconde section est sur le matériel et les méthodes, elle contient trois parties, dont la première partie nous avons décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du notre travail expérimental, la deuxième est sur l'étude biologique qui se manifeste dans plusieurs tests. Dans cette partie nous avons récupéré des substances à partir d'une poudre à l'aide d'une solution tampon, l'extrait brut que nous avons obtenu est d'abord testé sur les hématies pour la mise en évidence de leur activités hémagglutinante, puis nous avons effectuées des tests biologiques sur elles. Pour une troisième étape nous avons procédé la chromatographie sur colonne en utilisant le gel Séphadex G50. Concernant cette dernière section, elle aborde les résultats et la discussion respectivement.

- ***Étude
bibliographique***

I CHAPITRE1 : Généralités sur les lectines

I.1 Définition

Cette classe de protéine est dénommée par Boyd en 1954 sous le nom de 'lectines' dérivé du mot latin 'lectus' qui est le participe passé du verbe 'légère' qui veut à son tour dire 'sélectionner' (Liener *et al.*, 1986).

Les lectines sont des protéines où glycoprotéines présentes dans toutes les branches du règne vivant, non-synthétisées par un système immunitaire et dépourvues d'activité enzymatique, elles ont la capacité de reconnaître spécifiquement les glucides simples où oligosaccharides plus complexes (leur affinité est en général plus forte pour les oligosaccharides) sans pour autant les modifier (Goldstein *et al.*, 1980).

Les lectines sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués, cette caractéristique capitale des lectines est due au fait que ces protéines sont multivalentes ; elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui éclaircit leur pouvoir de précipiter des polysaccharides, glycoprotéines, où des glycolipides et entrainer l'agglutination des cellules diverses (Liener *et al.*, 1986).

Les interactions protéine-glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. Le site de liaison d'une lectine est formé par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie que peu après la liaison du ligand. Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lieent (Gabijs, 1985). La Figure 1 donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.

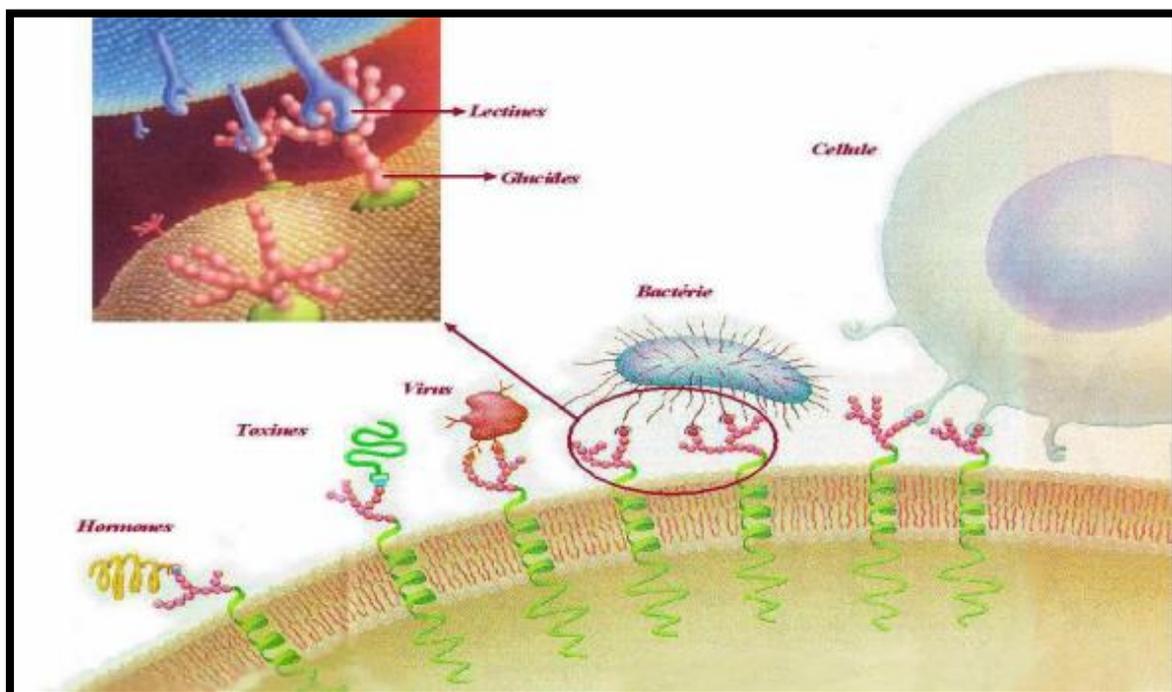


Figure 1. Rôle de glycoconjugés situés sur la surface cellulaire; Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.

I.2 Historique

L'étude des lectines a été introduite par **P. H Stillmark** en **1888**, qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que les extraits des graines de ricin (*Ricinus Communis*) contenant des molécules capables d'agglutiner les érythrocytes (**Sharon et Lis, 2004**). Ces molécules ont ainsi nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines (**Aragao, 2009 ; Poiroux, 2011**). Ensuite **P. Ehrliche** a découvert la même activité dans l'extrait d'*Abrus Precatorius* (poids rouge). A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes (**Poiroux, 2011**).

En **1919**, **J. B. Sumner** a réalisé la purification et la caractérisation de la concanavoline A ou Con A (*Concavalia Ensiformis*), cette phytoagglutinine pouvait également précipiter le glycogène en solution et agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (par exemple comme les levures et les bactéries) (**Liener et al., 1986**). (**Tableau 1**) montre l'historique de découverte des lectines.

Tableau 1. Historique des découvertes des lectines et leurs propriétés (Renato et col, 1991).

Années	Auteurs	Découvertes
1884	Warden & Addel/Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus Precatorius</i> .
1886	Dixon	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i> .
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus Communis</i> , Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A (Con A)
1926	MarcussonBegun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1949	Jaffé	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
1960	Nowell	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

II La structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

II.1.1 Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (identiques ou non), 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 2).

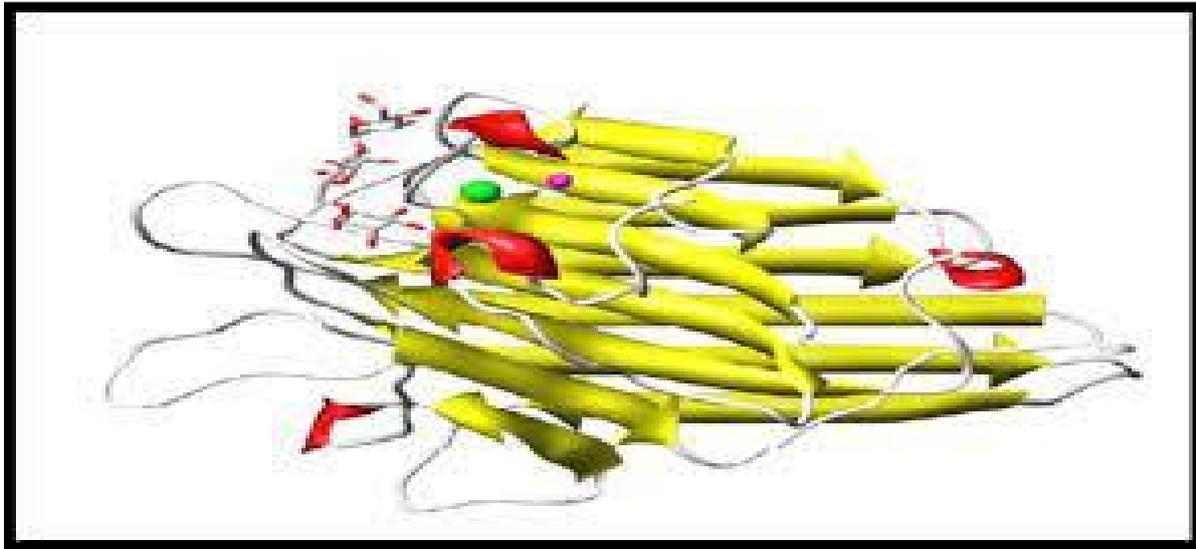


Figure 2. Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le tri mannoïde (Lenka, 2006).

- ✓ **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).

II.1.2 Les lectines en mosaïques

Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animales, virus) il s'agit de molécules complexes composées de plusieurs type de domaines où modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al*, 2006) (Figure 3).

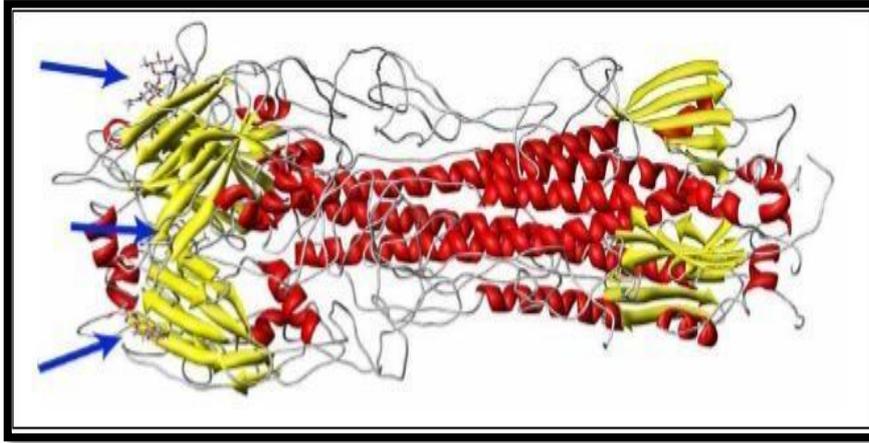


Figure 3. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al, 2006).

II.1.3 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), (Figure4).

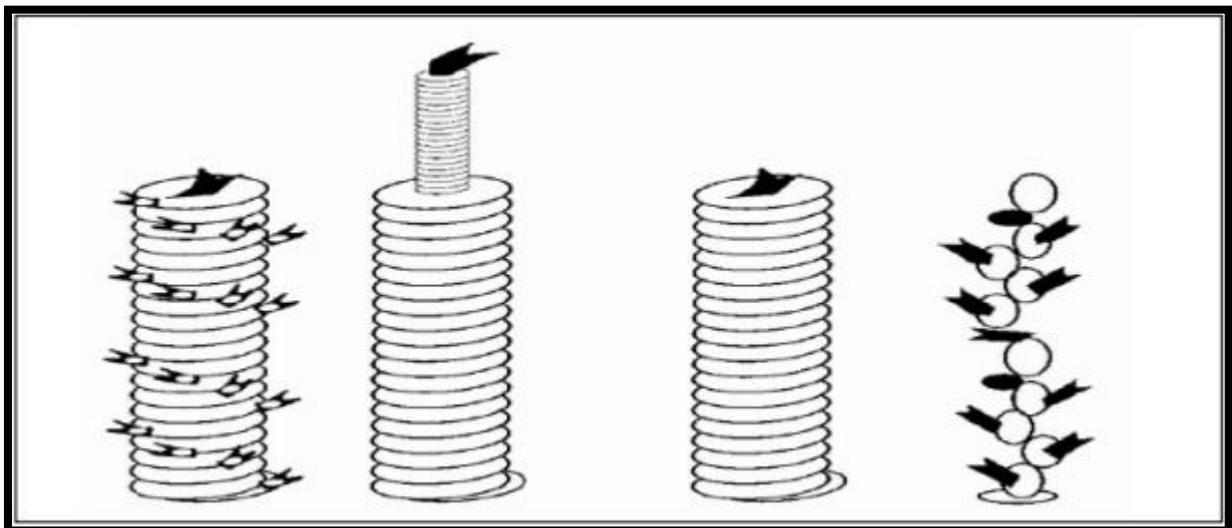


Figure 4. Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli (Lenka, 2006).

II.1.4 La structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle des lectines est composée des feuilles β contactés par un nœud qui forment des chaînes antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon et Lis, 1990). Le site de liaison avec les hydrates de carbone peut regrouper jusqu'à trois régions chevauchantes, la

région centrale constituée par les résidus d'interaction et des ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) qui sont primordiales pour l'interaction, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction lectine-hydrates de carbone (**Sharon et Lis, 1990 ; Young et Oomen, 1992**).

II.2 Le rôle biologique des lectines

En utilisant leur capacité unique de « lire » l'information biologique, qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des glucides (**Wiley et Skehel, 1987**). Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et des fonctions dans ces organismes vivants (voir **Figure1**). Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans les processus biologiques ainsi que dans les processus pathologiques (**Lis et Sharon, 1998**).

- ✓ Les lectines situées à la surface des bactéries, des virus ou des parasites intestinaux reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection (**Rudiger et Gabius, 2001**).

- ✓ Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours un mystère. Une hypothèse très probable est le rôle de défense du végétal contre les phytopathogènes ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante (**Rudiger et Gabius, 2001**).

- ✓ Les lectines jouent un rôle très important dans le système immunitaire, dont elles reconnaissent les carbohydrates qui se fixent exclusivement sur les agents pathogènes ou celle qui sont inaccessible dans les cellules hôtes (**Renata et al., 2015**).
- ✓ 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**).
- ✓ Pendant les processus de fertilisation, la reconnaissance s'effectue par l'interaction entre une lectine du spermatozoïde (spermadhésine) et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes (**Topfer-Petersen et al., 1998**). Des exemples des lectines et leurs rôles dans les organismes vivants (**Gianluca, 2006**).

- **Bactéries**

Exemple : Lectines fimbriales, lectines solubles et toxines: servent à l'Adhésion, l'infection et la formation de biofilm.

- **Virus**

Exemple : Influenza hémagglutinine : adhésion, infection

- **Plantes**

Rôle de défense, exemple : la symbiose avec les bactéries fixant l'azote chez les légumineuses.

- **Animaux**

Exemple : Calnexine et L-type : Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines.

II.3 La spécificité et affinité des lectines

La **spécificité des lectines** est définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés agglutinantes où de précipitation (**Robert, 2008**). Dans la plupart des lectines, elles sont spécifiques pour un petit nombre de sucres ; ces sucres sont présents sur la surface des cellules sous la forme de glycoconjugués dans la majorité des cas.

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides (**Sharon, 2003**). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes selon le glucide pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose (Gal), N-acetylgalactosamine (Gal NAc), N-acetylglucosamine (Glc NAc), le Fucose (Fuc) et l'acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc) (Spécificité primaire) (**Lis et Sharon, 1998**). C'est ces monosaccharides et leurs dérivés qui sont le plus présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires.

L'**affinité des lectines** est généralement plus forte pour certains oligosaccharides ; leur constante de dissociation pour les oligosaccharides est d'ordre micro-molaire (μM), par contre pour les monosaccharides elle est de l'ordre milli-molaire (mM) (**Dam et Brewer, 2002**).

Les lectines spécifiques pour les monosaccharides leurs sites de liaison sont des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand ; semblable à l'interaction Enzyme-Substrat (**Gianluca, 2006**), (**Figure 5**).

La lectine interagit de manière forte et directionnelle avec un ligand par un réseau de liaisons hydrogènes, hydrophobes et van der Waals, ce qui permet d'atteindre une bonne **affinité et spécificité** (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).

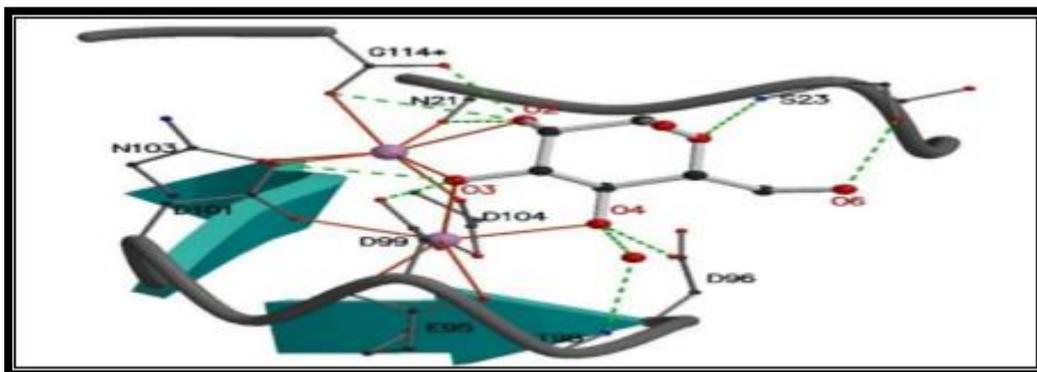


Figure 5. L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-III (Gianluca, 2006). (2)

II.4 Classification des lectines

II.4.1 Chez les animaux

II.4.1.1 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**).

II.4.1.2 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**).

II.4.2 Chez les végétaux

Les études en biochimie structurale ont mis en évidence l'oligomérisation des lectines. Certaines sous-unités sont responsables de la reconnaissance glycanique et d'autres ont une activité catalytique cytotoxique, alors selon la structure on peut distinguer quatre types de lectine (**Figure6**) (**Van Damme et al., 1998**).

II.4.2.1 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, dites 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**).

II.4.2.2 Les hololectines

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

II.4.2.3 Les chimérolectines

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

II.4.2.4 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**).

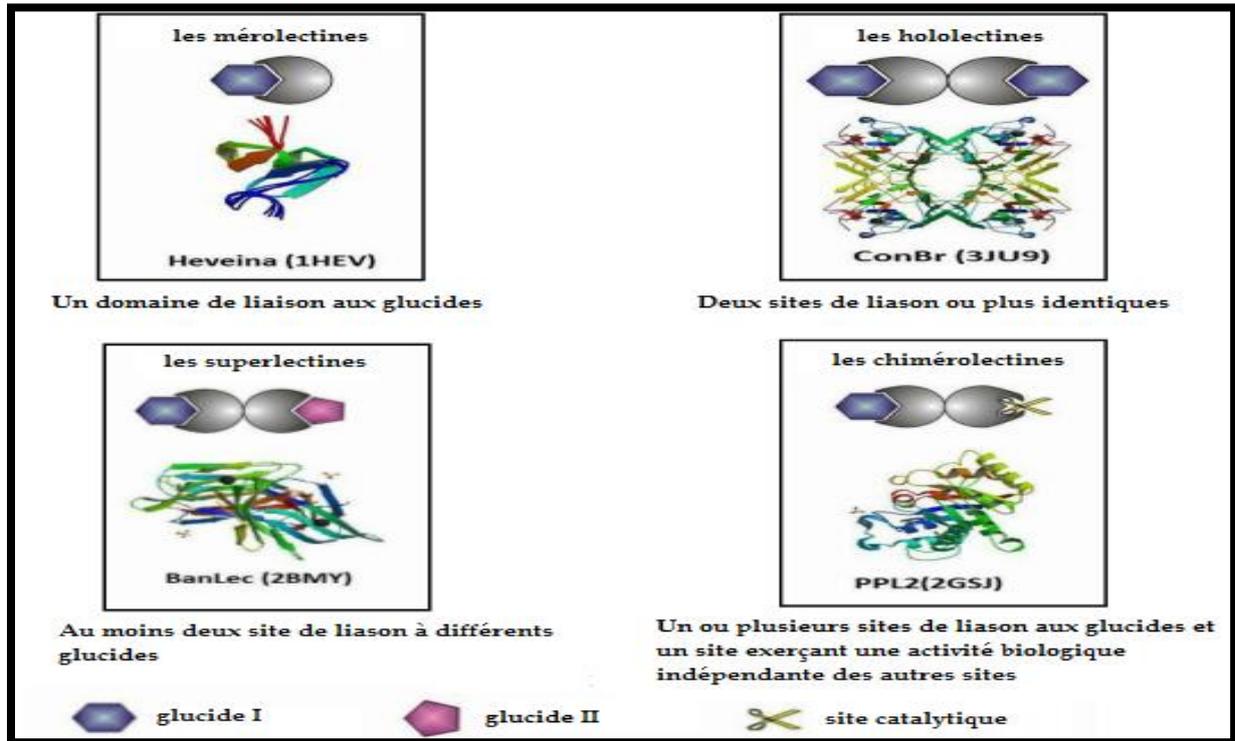


Figure 6. La classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al ; 1998).

II.5 Propriétés des lectines

II.5.1 Propriétés biologiques

II.5.1.1 L'interaction lectine-glucide

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

II.5.1.2 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 les saccharides de surface des cellules animales où autres (bactéries, virus, champignons) (**Peumans et Van Damme, 1995 ; Wang et Ng, 1998**).

II.5.1.3 L'activité mitogène

Parmi les propriétés les plus étonnantes des lectines ; leur pouvoir de transformer les petites 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 (**Babosa, 2001 ; Falasca, 1989 ; Nachbar et Oppenheim, 1980**).

II.5.1.4 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 d'haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (**Greer et coll ; 1985**).

II.5.2 Les propriétés médicinales des lectines

II.5.3 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Les travaux dirigés par **Valentier et coll, 2003**, démontrent que les lectines consommées dans l'alimentation pourraient inhiber la croissance cellulaire du cancer au sein de l'être humain in vitro.

Les lectines injectées dans la circulation sanguine et à des doses non-toxiques pour l'organisme, peuvent causer spécifiquement la mort des cellules cancéreuses par apoptose, autophagie où en activant les défenses anticancéreuses (**Poiroux, 2011**), et ils inhibent leur migration d'un organe à l'autre (**Banwell, 1983**).

II.5.4 Propriétés antivirales

Dans les infections virales, les lectines fixent et inhibent la réplication du virus (**Xu et al., 2014**). Elles sont aussi impliquées dans la détection des glucides spécifiques de certains agents infectieux pathogènes associées au virus (**Kawamura et al ; 2014**). On donne l'exemple des lectines mannose-spécifiques ; isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne. qui ont la capacité de bloquer l'infection du VIH-1 par inhibition de l'enzyme rétro-transcriptase du virus (**Tanaka et al ; 2009, Hamid et al ; 2013**).

II.6 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.

II.6.1 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 fluorochrome ou une enzyme..). Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique, peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (**Dole.A.et Lindeberg . S. ,2005**)

II.6.2 Dans le domaine biomédical

II.6.2.1 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.

II.6.2.2 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**).

II.6.2.3 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**).

II.6.2.4 Cancérologie

Les 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 transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

II.6.3 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**).

II.7 La distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se trouvent dans tous les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plants, les insectes et les animaux (**Van Damme et al., 1998**). Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines (**Aragao, 2009**).

La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont six d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, cinq familles d'origine virale, huit d'origine fongique et 1 famille d'algues, (**Tableau 2**).

Tableau 2. Exemples des Lectines et leur distribution dans le monde vivant.

Origine	Exemples de Lectines
Plantes	ConA Ricine
Bactéries	PA-IL de Pseudomonas Toxine de cholera
Animaux	E-selectin Helix pomatia agglutinin
Virus	Hemagglutinin de virus Capside de rotavirus
Champignons	Lectine de mousseron
Algues	Griffithsin

II.7.1 Les lectines des microorganismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasite eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les glycanes présents sur la surface des cellules hôte.

II.7.1.1 Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol, elles jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules hôtes (**Sharon, 1996**). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles: les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles (**Imberty et al., 2005**).

II.7.1.2 Les lectines viral

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, qui est l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique) (**Weis et al., 1990**).

II.7.1.3 Les lectines des champignons

L'abondance des lectines dans les champignons est tout à fait remarquable. Elles 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**).

II.7.2 Les lectines animales

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont :

- 1) Les lectines de type C, elles sont soit circulants dans le plasma, ou attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire (**Somers et al., 2000**), dont l'interaction glucide-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (**Drickamer, 1999**).
- 2) La famille des galectines, elle regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le β -Gal, et sont caractérisées par la présence d'un domaine bien conservé appelé S-type carbohydrate recognition domain (S-CRD) (**Leffler et al., 2004**).

- 3) Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (**Crocker, 2002**). 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**).

II.7.3 Les lectines végétales

Dans les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermaphytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (**Grant, 1991 ; Renkonen, 1948**). La famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales, telle que la ConA se retrouve dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de subir une attaque par des organismes étrangers (**Nachbar et Oppenheim, 1980**). Les lectines répartis dans tout l'appareille végétative car elles sont présentes dans les racines, les tiges et les graines. Dans ces derniers elles présentent de 1-10% des protéines totales et dans certaines d'elles jusqu'à 50 %, dans les tissus végétatives les lectines forment de 1-20% de leur contenu en protéines totales (**Peumans et Van Damme, 1995**). Les lectines des plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Macedo et al., 2015**).

III Matériel végétal

III.1 Dattes

En Algérie ; le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas, seulement une superficie de 120830 hectares (**Messaïd, 2008**). La palmeraie algérienne héberge un matériel génétique très riche, et diversifié avec 940 cultivars recensés (**Hannachi et al., 1998**).

III.1.1 Aspect botanique

La datte (**Figure7**), fruit du palmier dattier est une baie généralement de forme allongée, oblongue où arrondie (**Espiard, 2002**), avec des dimensions très variables de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes ; selon les variétés (**Djerbi, 1994**).

La datte renferme un seul grain appelé noyau, sa partie comestible dite, chair est constitué d'un :

- Péricarpe où enveloppe cellulosique fine (peau).
- Mésocarpe (charnu), de consistance variable selon sa teneur en sucre.
- Endocarpe, de teinte plus claire et texture fibreuse ; parfois réduit a une membrane parcheminée entourant le noyau (**Espiard, 2002**).

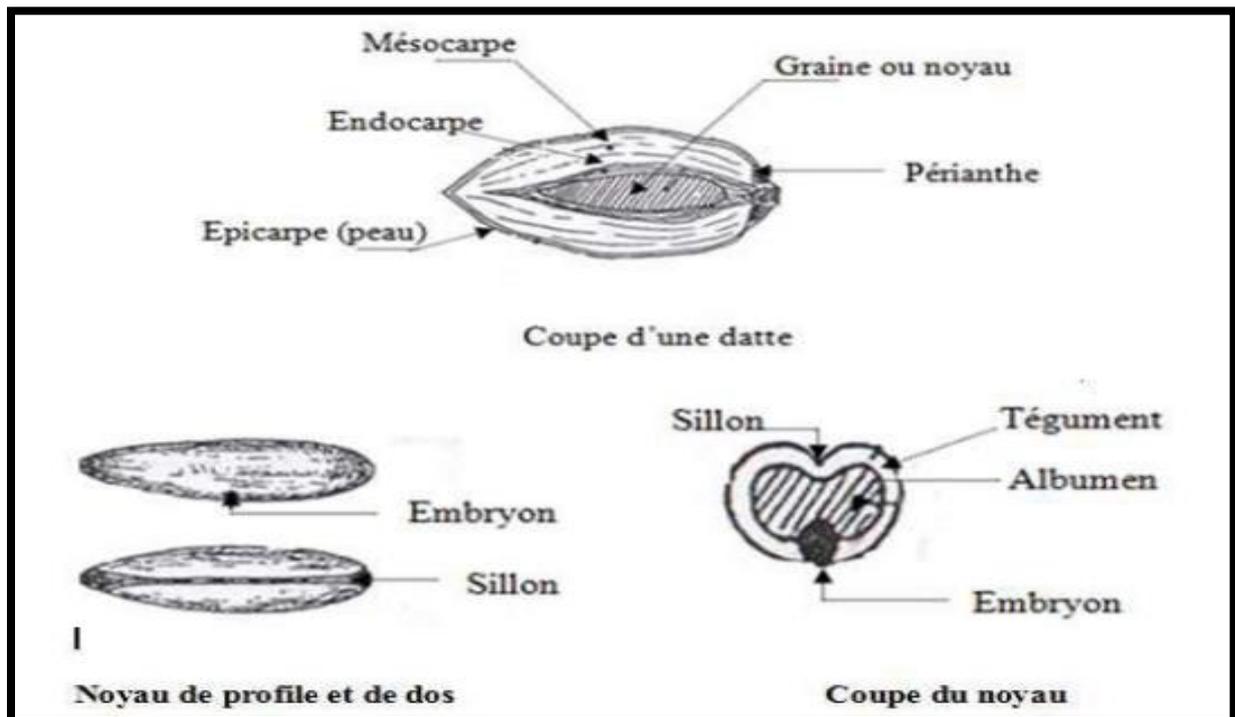


Figure 7. Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier (Munier, 1973).

III.1.2 Classification des dattes

D'après **Espiard** en **2002**, la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique les dattes sont réparties en trois catégories : **Les dattes molles, semi-molles** et **sèches** de consistance dure.

III.1.3 Les différentes variétés de dattes

Les dattes sont nombreuses et se différencient par leurs saveurs, consistances, formes, couleurs, poids et dimensions (**Belguedj, 2001**) ; les principales variétés cultivées sont :

-**Variété d'excellence** (Deglet Nour) qui est semi-molle, à maturité la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe plissé et brillant, le mésocarpe présentant une texture fine légèrement fibreuse.

-**Variétés communes**, d'une importance moindre par rapport à Deglet Nour ; les plus répandues sont : Ghars, Degla-beida et Mesh-degla.

III.1.4 Usage médicinal des dattes

Riches en fibres, elles facilitent le transit intestinal et préviennent les cancers colorectaux, appendicites, les varices et hémorroïdes.

Elles sont aussi utilisées pour les maladies nerveuses et les affections broncho-pulmonaires, traitement des rhumes, en gargarisme elles soignent les maux de gorge (**Bencheleh et Maka, 2008**).

Elles ont également un effet hypocholestérolémiant (**Albert, 1998 ; Jaccot et Campillo, 2003**). Energétique et riche en minéraux, le fruit permet de lutter contre l'anémie et les déminéralisations. Les dattes pilées dans de l'eau soignent les hémorroïdes, constipations et aussi l'ictère (jaunisse). Calmantes sous forme de sirop très concentré, le robb, cette préparation apaise et endort les enfants.

III.2 Noyaux de dattes

Les noyaux constituent un sous-produit intéressant, ils s'étendent entre 13% et 15% du poids de la datte. Le noyau de datte est riche en sucre, en minéraux, en particulier le fer et en lipides.

Entouré d'un endocarpe parcheminé, il est de forme allongé, avec un sillon ventral ; l'embryon est dorsal, sa consistance est dure et cornée (**Figure7**) (**Dammak et al., 2007**).

Le noyau possède un albumen (endosperme) dur et corné dont l'embryon dorsal est toujours très petit par rapport à l'albumen (2 à 3mm) (**Darleen et al., 1985**).

III.2.1 La composition biochimique des noyaux de dattes

Des données analytiques sur la composition chimique des noyaux de dattes montrent qu'ils renferment plusieurs acides gras avec une proportion plus importante d'acides oléiques et lauriques (**DEVSHONY et al., 1992**).

Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux de certaines variétés de datte d'Arabie Saoudite ont démontré la présence de protéines, de glucides, de lipides, et de minéraux (K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu) (**BEN ABES, 2011; BESBES et al., 2005**).

III.2.2 Actions pharmacologiques

III.2.2.1 Fonction antiseptique

Selon **Al-Qarawi *et al.*; 2005**, les extraits des noyaux de dattes ont l'aptitude de reconstituer les fonctions normales des foies empoisonnés ; ils les protègent également contre les hépato-toxicités (**Jassim et Naji, 2010**).

III.2.2.2 Fonction cosmétologique

Selon **Bouza *et al.*, 2007**, cités par **Chaira *et al.*, 2007**, l'extrait du noyau de dattes abaisserait clairement et rapidement les rides du visage.

III.2.2.3 L'activité antivirale

L'utilisation du noyau de différents fruits est connue depuis l'antiquité comme un complément alternatif dans la médecine. Les études réalisées par **Jassim et Naji en 2007**, montrent qu'une faible concentration d'un extrait acétonique (100-1000µg/ml) du noyau de dattes est capable d'inhiber les états infectieux.

- ***Matériel et méthodes***

IV Matériel et méthodes

IV.1 Préparation des noyaux de dattes

Les noyaux de dattes sont d'abord rincés à l'eau et séchés à l'air pendant 7 jours, ensuite broyés dans un mortier afin d'obtenir une poudre homogène conservée au sec.

IV.2 Extraction des lectines par la solution tampon

Principe

L'opération est réalisée pour récupérer des substances hydrosolubles à partir d'une poudre de noyaux de dattes, en procédant à l'aide d'un tampon phosphate di-sodique (PBS).

Technique

L'extraction des lectines a été réalisée selon la méthode suivante : 100ml de tampon PBS (0.01M, pH7.2) a été rajouté à 10g de poudre obtenue des noyaux de dattes, l'ensemble soumis à agitation pendant 24h à 4°C, ensuite passé à la centrifugation à 4000 tours/min pendant 20min, le surnageant dans chaque tube est récupéré (**Figure8**), filtré avec filtre en seringue (membrane 0.22 μ m) et conservé au frais, soumis à un test d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence des lectines. Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes.

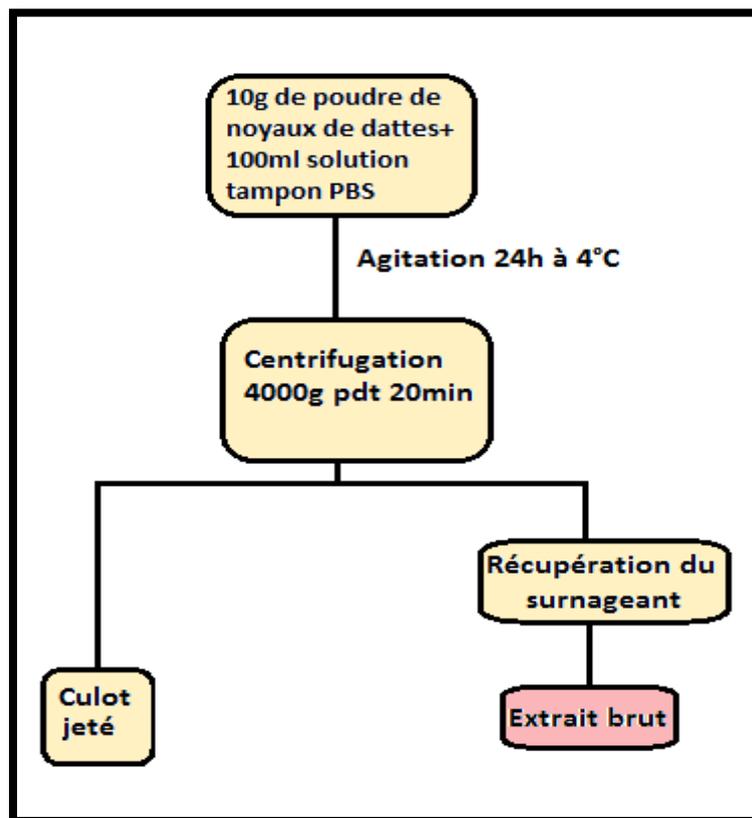


Figure 8. Schéma d'extraction des lectines à partir de poudre de noyaux de dattes deglet noir.

IV.3 Test d'hémagglutination et mise en évidence des lectines

Principe

La mesure de l'activité hémagglutinante est le test le plus largement utilisé pour mettre en évidence la présence des lectines (**Goldstein *et al.*, 1980 ; Rüdiger, 1993**). Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes, et repose sur l'observation visible à l'œil nu de l'agglutination.

Technique

Dans chaque puits d'une microplaque de titration, 50µl de PBS sont mis, puis 50µl de l'extrait brut sont ajoutés dans le premier puits et une double dilution en série est réalisée, ensuite 50µl de sang de lapin sont ajoutés et mélangés à chaque puits. La lecture est faite après 30min d'incubation à 37°C.

IV.4 Dosage des protéines

Principe d'une gamme étalon

On utilise trois types de solution :

- 1) **L'extrait** dont on veut déterminer la concentration.
- 2) une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration. Cette **protéine de référence** est la **BSA** (albumine de sérum bovin) à 1 mg/ml.
- 3) Une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines ; **solution de Bradford**.

+3ml de Bradford	{	1000µl de BSA
		800µl de BSA + 200µl de PBS
		600µl de BSA + 400µl de PBS
		400µl de BSA + 600µl de PBS
		200µl de BSA + 800µl de PBS
		1000µl de PBS (Blanc)

- ✓ On effectue 3 répétitions pour chaque tube ; sauf pour le **blanc**.
- ✓ On laisse 15 min à l'obscurité.

L'**absorbance** de tous les tubes est ensuite mesurée ; Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite étalon: **absorbance = f (quantité)** (**Annexe5**).

Calcul de la concentration de protéines en mesurant l'absorbance de 3 répétitions de 100µl l'extrait avec 2ml le réactif de Bradford ; pour **l'extrait brut** et **extrait purifié** (après chromatographie).

IV.5 Extraction des lectines par chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion, encore appelée chromatographie filtration sur gel Séphadex G-50 (**Tableau3**). Cette technique est apparue en **1959**, s'applique bien aux espèces de masse moléculaire élevée. Le matériel servant de base est un gel, composé de petites particules très régulières. La structure du gel résulte de la liaison de macromolécules assemblées les unes aux autres (billes ou perles de gel) de manière à former un ensemble régulièrement réticulé.

Tableau 3. Domaine de fractionnement du gel Séphadex G-50 (Dextran).

Nom	Type	Intervalle de fractionnement KDa
Sephadex G-50	Dextran	1-30



Photo 1. Colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Séphadex G-50.

Principe

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est donc solide (les billes) et la phase mobile est liquide. La porosité du gel permet de séparer les molécules en fonction de leur **poinds moléculaire**. L'éluant entraîne, en premier lieu, les grosses molécules qui restent dans le liquide extra-granulaire, alors que les petites, diffusent et se répartissent entre les phases intra et extra-granulaire, piégées dans les grains du gel et sont ralenties. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. (**Figure9**)

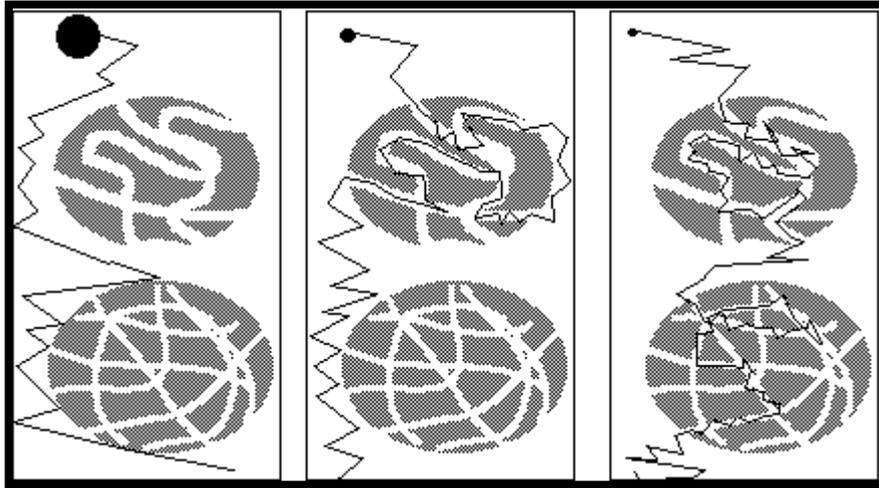


Figure 9. Déplacement des molécules dans les diverses parties d'un gel de filtration selon leur taille et forme.

Technique

1) Préparation de la colonne

Le gel séphadex G-50 qui forme la **phase stationnaire** de la séparation, a été activé dans la solution tampon PBS (0,1 M pH 7,4) pendant 48h à 4°C à raison de 4 g de gel pour 100 ml de PBS afin d'obtenir un gel 4 %.

A l'aide d'un coton cardé placé au fond de la colonne placée sur un support (25ml) on laisse couler le gel. La colonne doit être homogène et dépourvue des bulles d'air.

PS : On laisse le gel de la colonne toujours humide.

2) Séparation des lectines à partir des extraits bruts

Après la stabilisation et lavage du gel avec le tampon (PBS à 0,01 M pH 7,4), l'extrait brut a été versé **lentement** et en petites quantités dans la colonne, puis il a été recueilli par l'élution avec le tampon.

Dans 90 tubes secs placés respectivement dans un portoir, des fractions de séparation de 2 ml par tube ont été récupérées.

3) Spectrophotométrie à UV

L'absorbance des fractions récupérées à partir de la chromatographie d'exclusion a été mesurée dans le spectrophotomètre à UV dont la longueur d'onde est de 280 nm. Puis on a tracé l'absorbance en fonction des 90 tubes récoltés (**Annexe3**).

IV.6 Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et métaux et protéines

Principe

Ce test permet de cribler les ligands potentiels de la lectine. La spécificité des lectines aux glucides où métaux où protéines a été étudiée par la capacité d'une série de ces trois derniers à inhiber l'agglutination des hématies de lapin.

Technique

Dans chaque puits d'une microplaque, 25 µl d'extrait est déposé, tout en ajoutant 25µl de solution de saccharide (Cellulose, Glucose, Lactose, Fructose, Mannose, Maltose, Sucrose, Arabinose, Galactose, Xylose, Ribose, Mannitol, Glucosamine HCL, Sorbitol, Saccharine sodique). 50µl d'hématies de lapin, incubation pendant 1h à température ambiante pour ensuite procéder à la lecture des résultats à l'œil nu.

On procède de la même méthode pour les métaux (Chlorure d'Etain II, Chlorure de baryum, Chlorure potassium, Chlorure aluminium, Chlorure sodium, Chlorure cuivre II, Aluminium sulfate, Chlorure de cobalt) et la protéine (BSA), et effectuer la lecture à l'œil nu après incubation pendant 1h à température ambiante.

IV.7 Test de la limite d'inhibition d'agglutination par les saccharides, métaux et protéines

Principe

Ce test a été effectué pour les sucres, métaux et protéines qui inhibent l'hémgglutination, et a pour but de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'hémagglutination.

Technique

25µl de PBS sont déposés dans chaque puits de la plaque, puis 25µl de sucre sont ajoutés au premier puits et une double dilution en série est réalisée dans les puits qui suivent. 25µl d'extrait et 50µl d'hématies de lapin sont ajoutés à chaque puits, le mélange est incubé pendant 1h à température ambiante et prêt pour la lecture à l'œil nu.

Pour les métaux et la protéine (BSA) on procède par la même technique, et effectuer la lecture à l'œil nu après incubation pendant 1h à température ambiante.

IV.8 Effet de la température et du pH sur l'hémagglutination

L'effet de la **température** est déterminé en incubant les aliquotes de l'extrait à différentes températures (40, 60, 80, 100, 120) respectivement pendant 1h au bain marie,

Matériel et méthodes

les échantillons sont ensuite refroidis. L'activité hémagglutinante est testée et comparée avec un échantillon témoin de lectines.

L'effet du **pH** sur l'activité hémagglutinante est déterminé en mettant notre poudre de noyaux de dattes dans une série de tubes avec des solutions tampons à différents pH allant

de 1 jusqu'à 12. Effectuer une agitation et incubation pendant 24h à 4°C ; pour ensuite tester l'activité agglutinante sur le surnageant.

- ***Résultats et
Interprétation***

V Résultats et discussion

V.1 Test d'hémagglutination

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec des globules rouges. Si une solution des hématies est placée dans un puits, la sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'ajout d'une lectine, permet la formation d'un réseau entre les hématies et les lectines, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène, ceci correspond au phénomène d'hémagglutination.

Nos résultats qui concernent l'agglutination des hématies du lapin avec l'extrait de noyaux de dattes (**Photo 2**).

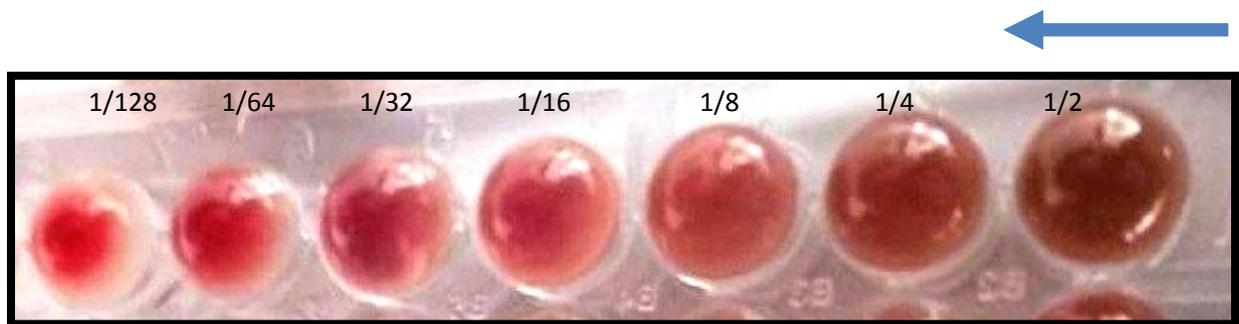


Photo 2. L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de noyaux de dattes.

- L'activité hémagglutinante testée sur notre extrait de noyaux de dattes en présence des hématies de lapin a donné un résultat **positif** ; ce qui indique la présence de substances agglutinantes avec les hématies.
- **2. Test de limite d'hémagglutination**
- La limite d'hémagglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination. Les résultats sont ci-dessous (**Photo3**) (**Tableau4**) :



Photo 3. Observation des résultats de la limite d'hémagglutination à l'œil nu.

Tableau 4: Limite de l'activité hémagglutinante des extraits des noyaux de dattes.

Dilution	1 /2	1 /4	1 /8	1 /16	1/32	1/64	1 /128	1/256	1 /512	1 /1024	1 /2048	1 /4096
Extrait	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-

On observe que l'activité hémagglutinante est présente dans les premiers puits jusqu'au septième puits (1/128), avec une diminution remarquable dès le huitième puits (1/256) jusqu'à disparition de l'activité d'hémagglutination dans le reste des puits successivement ; ce qui est due à la dilution effectuée.

L'activité hémagglutinante est limitée à une concentration minimale de **3.5µg/ml**.

V.2 Dosage des protéines de l'extrait brut

Calcul de la concentration de l'extrait brut

100µl de l'extrait brut + 2ml de réactif de Bradford et laissé à l'obscurité pendant 15min, ensuite procéder à la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 280nm pour 3 répétition et calcul de leur moyenne, afin de déterminer la concentration de notre extrait brut en protéine à partir de la droite étalon.

La D.O de notre **EB** est de **0.729**.

$$y=1.461x+0.066$$

$$0.729=1.461x+0.066$$

$$x=0.729-0.066/1.461$$

$$x=\mathbf{0.454mg/ml}$$

➤ La concentration de l'EB en protéines = **0.454mg/ml**

V.3 Extraction des lectines par chromatographie d'exclusion

Les résultats de l'absorbance des 90 fractions récoltés lors de la chromatographie d'exclusion (**Annexe3**).

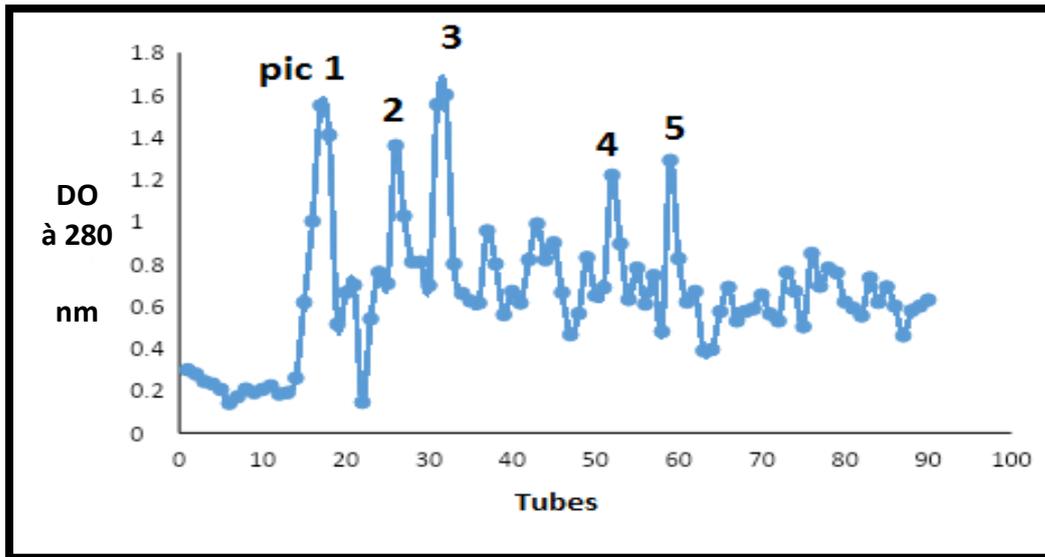


Figure 10. Chromatographie sur colonne gel de filtration (Séphadex G-50).

A partir du graphe, on observe la présence de **cinq pics**, correspondent:

- Premier pic : de la fraction 14 à 21.
- Deuxième pic : de la fraction 25 à 28.
- Troisième pic : de la fraction 30 à 34.
- Quatrième pic : de la fraction 51 à 54.
- Cinquième pic : de la fraction 58 à 61.

On fusionne l'ensemble des fractions correspondant à chaque pic dans un tube → **cinq tubes**. Afin de confirmer la présence des lectines au niveau des cinq tubes récoltés précédemment, un test d'hémagglutination est effectué pour chaque tube (**Photo4**).

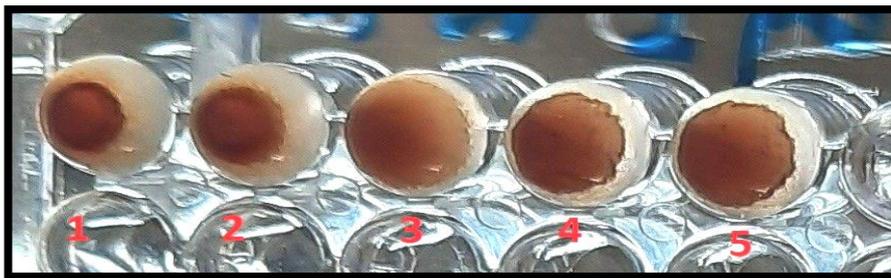


Photo 4. Test d'hémagglutination des cinq tubes récoltés.

Les résultats ci-dessus montrent une activité hémagglutinante dans les trois derniers tubes **3,4 et 5**, contrairement au tube **1 et 2** qui n'éprouvent aucune activité hémagglutinante.

- Ce qui confirme la présence des lectines dans les tubes **3,4 et 5**.

Ces **trois** tubes contenant notre lectine sont donc fusionnés → **l'extrait purifié**.

V.4 3. Dosage des protéines

Calcul de la concentration de l'extrait purifié (après chromatographie)

La D.O de notre EP est de **0.300**.

$$y=1.461x+0.066$$

$$0.300=1.461x+0.066$$

$$x=0.300-0.066/1.461$$

$$x=0.160\text{mg/ml}$$

➤ La concentration de l'EP en protéines = **0.160mg/ml**.

V.5 Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et métaux et protéines

Tableau 5. Les résultats des tests d'ihnibition d'hémagglutination par les saccharides.

Sucres	Résultats
Cellulose	-
Glucose	-
Lactose	-
Fructose	-
Mannose	-
Maltose	-
Sucrose	-
Arabinose	-
Galactose	-
Xylose	-
Ribose	-
Mannitol	-
Glucosamine Hcl	+
Sorbitol	-
Saccharine sodique	+

Tableau 6. Le résultat du test d'ihnibition d'hémagglutination par la BSA

Protéine	Résultat
BSA	+

Tableau 7. Les résultats des tests d'inhibition d'hémagglutination par les métaux.

Métaux	Résultats
Chlorure d'Etain II	-
Chlorure de baryum	-
Chlorure de potassium	-
Chlorure d'aluminium	+
Chlorure de sodium	-
Chlorure de cuivre II	-
Aluminium sulfate	-
Chlorure de cobalt	-

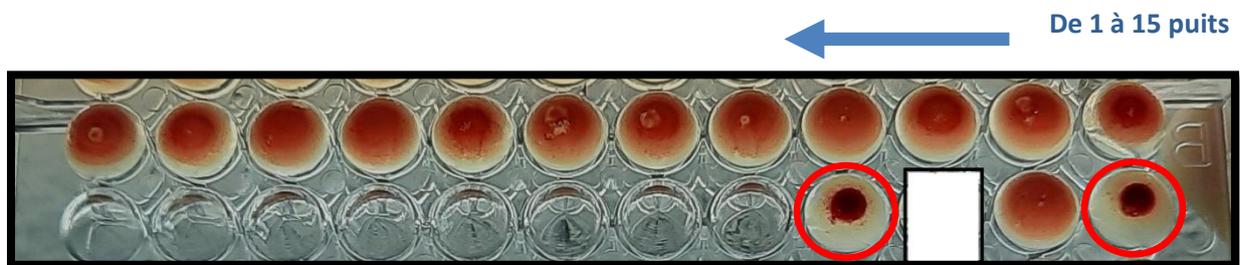


Photo 5. Test d'inhibition de l'hémagglutination par les sucres placés par ordre respectif du tableau.

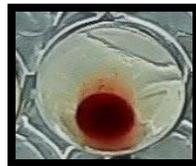


Photo 6. Test d'inhibition de l'hémagglutination par la BSA.

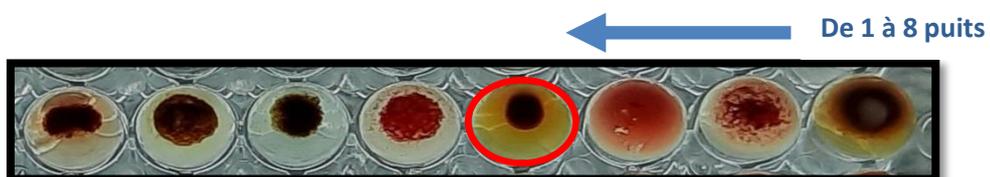


Photo 7. Test d'inhibition de l'hémagglutination par les métaux placés par ordre respectif du tableau.

D'après les résultats ci-dessus, on a remarqué une précipitation dans certains puits, cela explique la présence d'affinité entre la lectine et le ligand présent dans ces puits; la liaison lectine-ligand empêche le sang de se lier aux lectines par manque de liaisons libres.

- Pour les sucres : Notre lectine a été inhibée par : Glucosamine HCl, Saccharine sodique (**Photo4**).

- Pour la protéine : Notre lectine a été inhibée par : BSA (**Photo5**).
- Pour les métaux : La lectine a montrée une affinité pour un seul métal parmi les métaux utilisés : Chlorure d'aluminium (**Photo6**).

V.6 Test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides, métaux et protéines

Après résultats du test d'inhibition d'hémagglutination par les sucres, protéine, et métaux, on effectue des doubles dilutions en série pour les éléments adéquats avec notre lectine. Les résultats sont montrés ci-dessous (**Photo 8**) et (**Tableau8**)

Tableau 8. Les concentrations minimales inhibitrices de l'hémagglutination.

Dilution	1 / 2	1 / 4	1 / 8	1 / 16	1 / 32	1 / 64	1 / 128	1 / 256	1 / 512	1 / 1024	1 / 2048	1 / 4096
Chlorure d'aluminium	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharine Sodique	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Glutamine Hcl	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

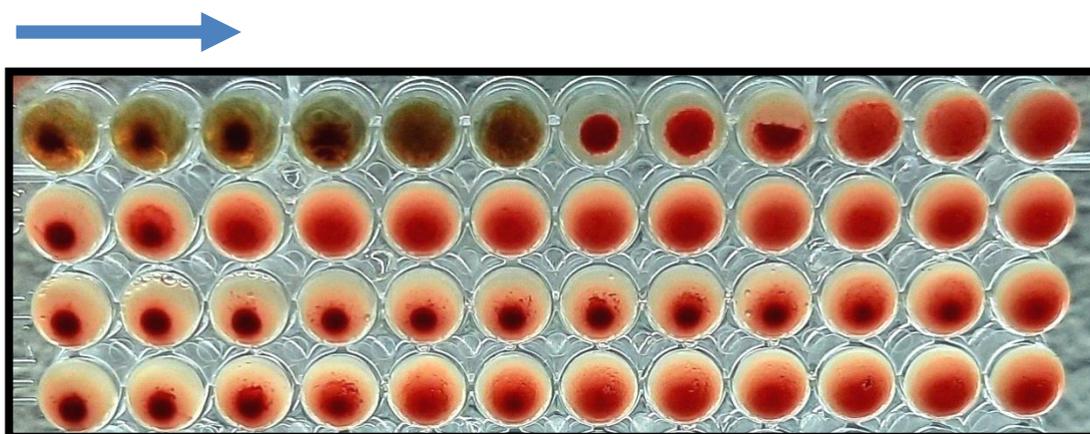


Photo 8. Test limite d'inhibition de l'hémagglutination par les sucres, les métaux et la protéine par ordre respectif du tableau.

Résultats et interprétation

- La concentration minimale inhibitrice du Saccharine sodique capable d'inhiber l'activité hémagglutinante est de $0.8 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$, en utilisant une concentration initiale de $1.6 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$.
- La concentration minimale inhibitrice du Glucosamine HCl capable d'inhiber l'activité hémagglutinante est de $0.22 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$, en utilisant une concentration initiale de $1.8 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$.
- L'inhibition de l'activité hémagglutinante par la BSA est plus forte, la CMI de la BSA est de $0.97 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$, en utilisant une concentration initiale de 1mg/ml .

V.7 L'effet de la température et du pH sur l'hémagglutination

V.7.1 Température

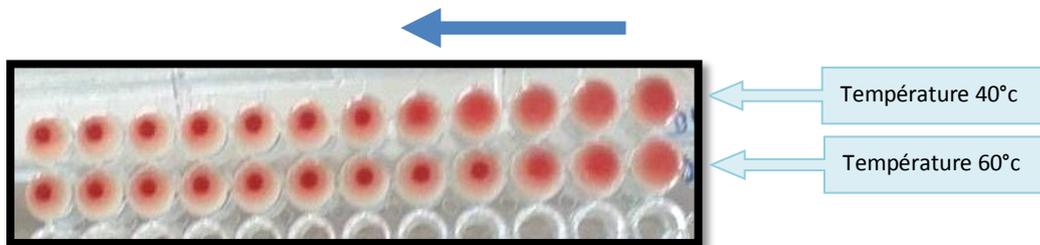


Photo 9. Observation de l'activité hémagglutinante en fonction de la T° (40 et 60°C).

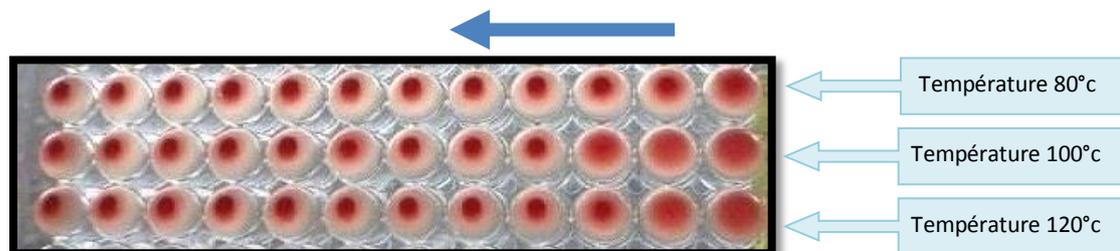


Photo 10. Observation de l'activité hémagglutinante en fonction de la T° (80, 100 et 120°C).

Tableau 9. La limite de l'activité hémagglutinante en fonction de la température.

Double dilution	température 40°C	température 60°C	température 80°C	température 100°C	température 120°C
1/2	+	+	+	+	+
1/4	+	+	+	+	+
1/8	+	+	-	+	-
1/16	+	-	-	-	-
1/32	+	-	-	-	-
1/64	-	-	-	-	-
1/128	-	-	-	-	-
1/256	-	-	-	-	-
1/512	-	-	-	-	-
1/1024	-	-	-	-	-
1/2084	-	-	-	-	-
1/4096	-	-	-	-	-

- Le traitement thermique de notre extrait de noyaux de dattes à différentes températures [40, 60, 80, 100, 120] °C, n'a pas inactivé totalement l'activité hémagglutinante dans de fortes concentrations.
- Ces résultats (**Photo9, 10**) (**Tableau10**) indiquent que nos hémagglutinines sont très résistantes à haute température (lectine thermorésistante). Cela s'explique par l'emplacement géographique de notre source de lectines (noyaux de dattes présents dans le Sahara algérien où les températures sont très élevées).

V.7.2 pH

Tableau 10. La limite de l'activité hémagglutinante en fonction du pH

pH	Activité
2	+++
3	10+
4	10+
5	10+
6	10+
8	10+
9	9+
10	+++
11	+++
12	-

+ : Hémagglutination positive pour un 1 puits.
 - : Hémagglutination négative.

Résultats et interprétation

Les résultats ci-dessus (**Tableau11**) ont démontré que notre lectine a exprimé une forte activité hémagglutinante dans la gamme de pH de 3 à 9, et une faible activité à pH2, 10 et 11, et une perte totale d'activité à pH12.

- Cela signifie que notre lectine est stable dans une large gamme de pH (de 3 à 9) dont l'activité est optimale.

- ***Conclusion et perspectives***

Conclusion

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont misés sur les composés biologiquement actifs isolés des extraits des végétaux, considérés comme de véritables usines chimiques dont il faut tirer un maximum de profit.

Au cours de ce travail, une étude d'extraction de nouvelles lectines des noyaux de dattes a été réalisée. La recherche des lectines à partir de nos grains a conduit à une activité agglutinante.

Les lectines de noyaux de dattes sont thermorésistantes, et stables dans une large gamme de pH. Ils ont montré une spécificité pour deux sucres testés : Glucosamine HCl et Saccharine sodique, une protéine : BSA, et un métal : Chlorure d'aluminium.

La chromatographie d'exclusion sur colonne Séphadex G-50 a donné trois pics indiquant la présence des lectines, dont on a prouvé la présence par test d'héماغglutination.

Perspectives

Ce travail peut être une première dans la découverte des lectines à partir des noyaux de dattes, sujet élaboré pour la première fois en Algérie.

Les résultats obtenus encourageant la poursuite des études par :

- La purification des lectines par chromatographie d'affinité, *HPLC*.
- La détermination des poids moléculaires des lectines par électrophorèse et leur séquençage
- Des tests de l'activité antivirale.
- Des tests de l'activité anticancéreuse.

Annexes

1. Tampon PBS 0.01 pH7.2:

Pour 1L d'eau distillée :

NaCl ; 8g

KCl ; 0.2g

Na₂HPO₄; 1.15g

KH₂PO₄; 0.2g

2. Réactif de Bradford:

Bleu de Coomassie ; 10mg

Ethanol ; 5ml

Acide phosphorique ; 10ml

Compléter à 100 ml d'eau distillée, conservation à 4°C à l'obscurité.

3. Résultats de l'absorbance des 90 fractions récoltés après chromatographie d'exclusion sur colonne de gel séphadex G-50:

Tableau. Résultats de l'absorbance des 90 fractions récoltés après chromatographie.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO	0,299	0,279	0,244	0,232	0,206	0,14	0,171	0,208	0,191	0,206
Tube	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
DO	0,223	0,184	0,191	0,26	0,618	1,002	1,55	1,41	0,515	0,664
Tube	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
DO	0,7	0,145	0,54	0,76	0,707	1,36	1,027	0,81	0,809	0,698
Tube	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
DO	1,555	1,6	0,8	0,66	0,624	0,615	0,957	0,8	0,56	0,67
Tube	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
DO	0,615	0,82	0,99	0,82	0,9	0,665	0,465	0,565	0,83	0,65
Tube	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
DO	0,688	1,22	0,895	0,635	0,78	0,61	0,745	0,48	1,29	0,825
Tube	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
DO	0,62	0,67	0,389	0,395	0,575	0,689	0,53	0,575	0,588	0,653
Tube	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
DO	0,563	0,53	0,76	0,67	0,703	0,85	0,694	0,78	0,758	0,62
Tube	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
DO	0,59	0,554	0,734	0,618	0,691	0,6	0,46	0,579	0,6	0,62

4. Préparation de la gamme des tampons pH (2-12):

En commençant par le tampon PBS pH7.2, et à l'aide d'un pH mètre ;

- En ajustant avec NaOH pour la gamme alcaline 8→12.
- En ajustant avec HCl pour la gamme acide 6→2.

5. Courbe d'étalonnage :

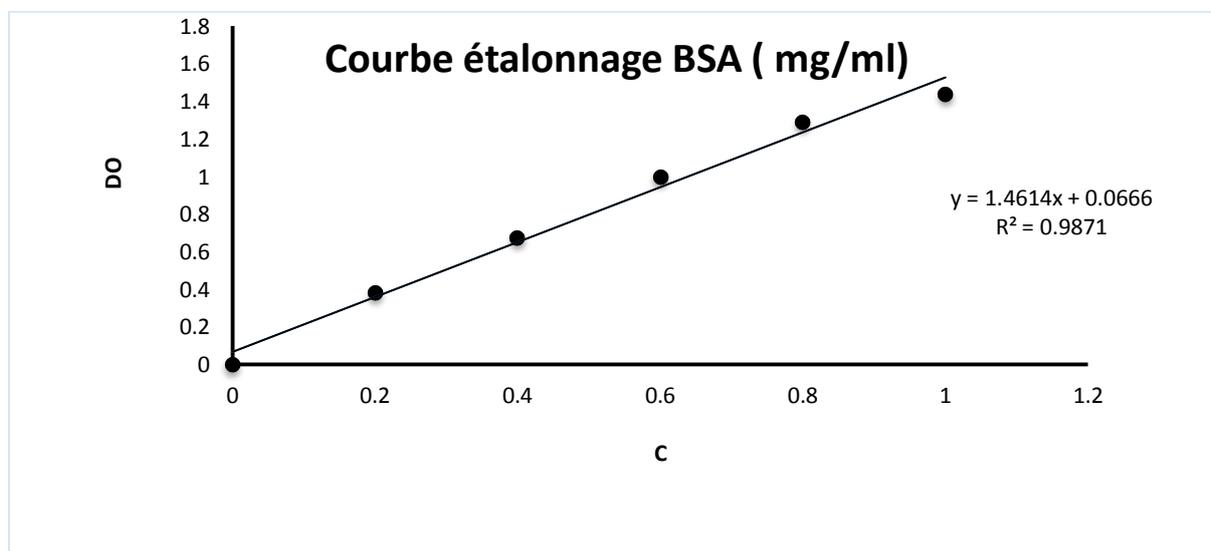
En faisant la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 280nm des trois tubes de chaque gamme de concentration de notre protéine de référence (BSA), et on calcule la moyenne.

Tableau. L'absorbance de la gamme d'étalonnage.

C	Moyenne D.O
0	0
0.2	0.383
0.4	0.676
0.6	0.998
0.8	1.289
1	1.438

Blanc : -0.827

On trace la courbe d'étalonnage BSA : $DO=f(C)$.



Courbe. Courbe d'étalonnage de la BSA.

Références bibliographiques

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

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.

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

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

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

Belguedj M (2002). Les ressources génétique du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du sud –Est algérien .Revue annuelle de l'INRAA N 1.28-289.

Belguedj M., (2010) : « Préservation des espèces oasiennes et stratégie à mettre en oeuvre. Cas du palmier– dattier (*Phoenix dactylifera*.L). Atelier tenu à l'INRAA, les 13 et 14/12/2010. 22 diapos.

Belguedj, M. (1996). Caractéristiques des cultivars de dattiers du Sud-Est du Sahara algérien. Vol I.– Conception et réalisation : Filière "Cultures pérennes" de l'ITDAS, pp : 67.

Boucherit.H, Chromatographie d'exclusion, chapitre2 : Méthodes de fractionnement, cours, université de Mila.

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

CHABROL. E., FIESCHI. F., GIRARD. E. caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langérine. Chimie et sciences du vivant. Université de grenoble, **2012**. Pp: 63-64

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

DAM. T. K., BREWER. C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev*, 2002. 102: 387-429.

Dammak, I., Ben Abdallah, F., Boudaya, S., Besbes, S., Keskes, L., EL Gaied, A., Turki H., Attia, H. & Hentati, B. (2007). Date seed oil limit oxidative injuries induced by hydrogen peroxide in human skin organ., *Bio Factors* (29): 137-145.

Darleen, A., Demason, R., Sexton, M., Gor, M. A. N. & Reid, J. S. G. (1985). S structure and Biochemistry of Endosperm Breakdown in Date palm (*Phoenix dactylifera L*) Seeds., *Protoplasma* (126): 159-167.

Devshony, S., Eteshola, A. & Shani, A. (1992). Characteristics and some potential application of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) seeds and seed oil., *J. Am. Oil Chem. Soc* (69): 595–597.

Didier Gauthier, Chromatographie de filtration sur gel, Mis à jour le **10-05-1999.**

Djerbi M., (1994)- Précis de phoeniculteurs. FAO, 192 p

DOLE.A.et LINDEBERG . S. ,2005 agrarian diet and diseasesof affluence do evolutionary novel dietary lectin cause leptin resistance, *bio med central lid doi* .10.1186, 1472, 68235-10.

DRICKAMER. K. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **1999.** 9: 585-590.

Espiard E., (2002)- Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 360 p.

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

Gianluca CIOCI, ETUDE STRUCTURE-FONCTION DE GLYCOCONJUGUES ET DE LECTINES BACTERIENNES ET FONGIQUES, Thèse de doctorat, UNIVERSITE GRENOBLE I – JOSEPH FOURIER, ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT, Soutenue le **31-01-2006.**

GIANLUCA. C. Etude structure-fonction des glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. *Biomolécules.* Université de Joseph-Fourier - Grenoble I. France, 2006. Pp: 15-39.

GIANLUCA. C. Etude structure-fonction des glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. *Biomolécules.* Université de Joseph-Fourier - Grenoble I. France, 2006. Pp: 15-39

GOLDSTEIN. I. J., HUGHES. R. C., MONSIGNY. M., OSAWA. T., SHARON. N. What should be called a lectin?. *Nature*, 1980. 285: 66. **GOLDSTEIN. I. J., HAYES.C.E.** the lectincarbogydrat binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohchr. Chem. Biochem*, 1978. 35: 127-334.

GOLDSTEIN. I. J., PORETZ. R. D. isolation, physicochemical, caracterization and carbhydats-binding spificicity of lectins in **LIENER. I. E., SHARON. N., GOLDSTEIN. I. J.** *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, Orlando, **1986.** 35-229.

GOLDSTEIN. I. J., PORETZ. R. D. isolation, physicochemical, caracterization and carbhydats-binding spificicity of lectins in **LIENER. I. E., SHARON. N., GOLDSTEIN. I. J.** *The Lectins:*

Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, Orlando, **1986**. 35-229.

GRANT. G. Lectins. In toxic substances in crop plants.ed.by the royal Society oh Chemistry, **1991**. p: 339.

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

HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S. lectins : proteins with diverse application. J. Appl. Pharm Sci, 2013. 31:93-103.

Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa A.Et Brac De Perrière R. A (1998). Inventaire variétal du palmier algérien. Ed. Anep. Rouiba, Alger. 225p

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

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

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

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. Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. Biophys J, 2001. 80: 2912-2921.

Jassim S.A. A., Naji M.A.(2007).In vitro Evaluation of the Antiviral Activity of an Extract of Date Palm– (Phoenix dactylifera L.) Pits on a Pseudomonas Phage. General Authority for Health Services for the Emirate of Abu Dhabi.

JEYAPRAKASH. A. A., KATIYAR. S., SWAMINATHAN. C. P., SEKAR. K., SUROLIA. A. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. J Mol Biol, **2003**, 332: 217-228.

KAWAMURA. T., OGAWA. Y., AOKI. R., SHIMADA. S. Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. J. Dermatol. Sci, 2014. 75 : 159–166.

Khaled Boulehrouf, Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par des souches pures d'actinomyètes isolés à partir de la rhizosphère de Lactuca sativa, Vicia fabae, Prunus domestica et Pinus halepensis. Tests biologiques des lectines caractérisées, Thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine, Soutenue le **26-06-2016**.

LEFFLER. H., CARLSSON. S., HEDLUND. M., QIAN. Y., POIRIER. F. Introduction to galectins. Glycoconj. J, **2004**. 19: 433-440

LENKA. S., IMBERTY. A., JAROSLAVE. K. modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. Biologie cellulaire. Université de Grenoble I. France, **2006**. Pp 56- 58.

LIENER. I., SHARON. N., GOLDSTEIN. J. The lectins Properties. Functions and Applications in biology and medicine. Academic Press INC. London LID, **1986**. Pp 13-24.

LIS. H., SHARON. N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev, **1998**. 98: 637-674.

M.Benyamina, Dosage des protéines, TP, Université de Mila, Laboratoire d'aquaculture et de bioremédiation.

MACEDO. M. R. L., OLIVEIRA. C. F. R., OLIVEIRA. C. T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. Molecules, **2015**. 20: 2014-2033.

Messaid, H. & Benazzou, A. (2008). Optimisation du processus d'immersion -réhydratation du système datte sèche -jus d'orange. Mémoire de magister. En technologie alimentaire Université M'hamed Bougara-Boumerdes.

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

NACHBAR. M.S., OPPENHEIM. J. D. 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, **1980**. 33: 2238 -2345.

POIROUX. G. Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. Biologie cellulaire et Biochimie. Toulouse. Univ

POIROUX. G. Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. Biologie cellulaire et Biochimie. Toulouse.

RAMATA. N. Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de Abrus precatorius L. la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako, 2010. Pp: 8-24 ersité Toulouse III - Paul Sabatier, 2011.Pp: 35-50.

RENATA. O. D., LEANDRO. S. M., LUDOVICO. M., OCTAVIO. L. F. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. Molecules, **2015**. 20: 519-541

RENKONEN K. O. Studies on the hemagg1utinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki), **1948**. 26: 66

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

RUDIGER. H. Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), Lectins and Glycobiology. Springer, Berlin, **1993**. Pp: 31-46.

RUDIGER. H., GABIUS. H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. Glycoconj. J, **2001**. 18: 589-613.

Sabah A. A., Jassim A., Naji .(2007). In vitro Evaluation of the Antiviral Activity of an Extract of Date Palm (Phoenix dactylifera L.) Pits on a Pseudomonas Phage ; CAM , pp.1-6.

SHARON. N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. Adv. Exp. Med. Biol, 1996. 408: 1-8. SHARON. N., LIS. H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, **2004**. 14: 53-62.

SHARON. N. Lectin-Carbohydrate complexes of plants and animals: an anatomic view. Elsevier Science Publishers, **1993**. 93: 221-226.

SHE. Q. B., NG. T. B., LIU. W. K. A 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, **1998**. 247: 106-111.

SOMERS. W.S., TANG. J., SHAW. G. D., CAMPHAUSEN. R. T. 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, **2000**. 103: 467-479.

SZE. S. C. W., HO. J. C. K., LIU. W. K. *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. J. Cell. Biochem.y, **2004**. 92: 1193-1202

TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A., ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2009**. 106: 15633- 15638.

TOPFER- PETERSEN. E., ROMERO. E., VARELA. P. F., EKHLASI-HUNDRIESER. M., DOSTALOVA. Z., SANZ. L., CALVETE. J. J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. Andrologia, **1998**. 30: 217-224

Université Toulouse III - **Paul Sabatier**, **2011**.Pp: 35-50

VAN DAMME. E. J., PEUMANS. W. J., BARRE A., ROUGÉ. P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Critical Reviews in Plant Sciences, **1998**. 17(6): 575-692

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

WEIS. W. I., BRUNGER. A. T., SKEHEL. J. J., WILEY. D. C. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, **1990**. 212: 737-761.

WILEY. D. C., SKEHEL. J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza. *Annu. Rev. Biochem*, **1987**. 56: 365-394.

YOUNG. N. M., OOMEN. R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 924–934.

ZITOUNI Adel	Date de soutenance : 23/09/2021
OGAB Youcef	
Thème : Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par des noyaux des dattes "Deglet nour".	
Option : Biochimie	
Résumé :	
<p>Le but de cette étude est la détection d'une lectine en quantité appréciable, et la détermination de ses propriétés physicochimiques. Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires à activité biologique. Nos expérimentations ont été réalisées sur les noyaux de dattes Deglet nour pour mettre en évidence la lectine recherchée.</p> <p>Après séchage, broyage et extraction dans une solution tampon PBS (0.01M pH7.2) et macération durant 24 heures, la détection et la quantification de lectines est réalisée par agglutination par le sang de lapin et en double dilution dans des microplaques à titration en forme U.</p> <p>L'activité agglutinante de l'extrait des noyaux de dattes est présente jusqu'au septième puits (sixième dilution ; 1/128). Le dosage de protéines de l'extrait brut a donné 0.454mg de protéines/ml.</p> <p>La séparation par la chromatographie d'exclusion démontre cinq pics, dont les trois derniers donnent l'activité hémagglutinante. Les fractions récoltées à partir de ces pics nous fournissent l'extrait purifié d'une concentration de 0.16mg de protéines/ml.</p> <p>Un test d'inhibition avec différents sucres, métaux et une protéine montre que les lectines des noyaux de dattes sont spécifiquement inhibées par le Glucosamine HCl, le Saccharine sodique, le Chlorure d'aluminium et la BSA, donc notre lectine éprouve une affinité pour ces éléments.</p> <p>Le traitement thermique de 40 jusqu'à 120°C n'a pas affectée l'activité agglutinante de la lectine (donc ; thermorésistante), et stable dans la gamme de pH (3 à 9).</p>	
*Mots clés : Lectines, glycoprotéines, noyaux de dattes, hémagglutination, PBS, chromatographie d'exclusion.	
Laboratoires de recherche : laboratoire de microbiologie appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine.	
Laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine.	
Président : NECIB Y.	(Pr) Université des Frères Mentouri Constantine
Encadrant : BOULAHROUF Khaled.	(MCB) Université des Frères Mentouri Constantine
Examineur : ZITOUNI ABDELBAKI.	(MCB) Université des Frères Mentouri Constantine