



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
Université Des Frères
Mentouri
Constantine1



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
Université Des Frères
Mentouri
Constantine1

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**Faculté de sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et**

**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 :

***L'extraction des lectines des lentilles rouges et leurs
caractérisations***

Présenté par :

Le : 25/07/2021

Boumaraf Kounouz et Bounekir Rayane

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme BAHIA

(M.C.A,UFM Constantine 1)

Encadreur : Mr NECIB.Y

(Pr. ,UFM Constantine1)

Examinatrice : Mme DJEMAI ZOUGHLACHE. S

(M.A.A, UFM Constantine1)

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU pour nous avoir donné la santé, la force, la patience et le courage pour accomplir ce travail.

Notre travail de mémoire de Master est effectué au sein du laboratoire de Génie-Microbiologie et applications (GMA) faculté SNV, université des frères mentouri Constantine 1. Sous la direction du Professeur NECIB.Y a qui nous adressons chaleureusement nos remerciements pour sa grande rigueur scientifique, ses conseils fructueux, pour l'accueil au sein de son équipe et pour sa patience afin d'aboutir à ce travail.

Je tiens à remercier Mme BAHIA d'avoir accepté de présider et d'honorer ma soutenance par sa présence.

Mes remerciements s'adressent à Mme DJEMAI ZOUGHLACHE. S d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.

Nous exprimons également notre sincère gratitude aux doctorantes Mlle TORCHE.I et Mme BOUFEKER.S pour leur aide technique et leur orientation. Pour tous les conseils et l'attention qu'elles nous ont prodigué tout au long de la réalisation de ce travail. Pour leur gentillesse, simplicité et sympathie nous sommes très honorés que nous avons la chance de travailler avec elles.

A tous nos professeurs, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

Mlles BOUNEKIR R. et BOUMARAF K.

Dédicaces

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

À l'âme de mon cher **papa Bounekir Saïd**, qui a été toujours ma source de bonheur, de force et de courage. Tu m'as donné ta vie pour ma réussite et mon bien être.

Merci d'avoir été toujours là, pour moi.

À ma très belle **maman**, merci de me soutenir d'être avec moi et de m'offrir tous ce que t'as pour un seul but : ma réussite

À **mon frère « Hamza »** qui m'a toujours soutenu et cru en moi, qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de courage et de générosité.

À **mon frère « Mohamed »** et son fils aimable « **Adem** » que j'aime trop et sa femme.

À **mes très chères sœurs « Hanane, Meriem et Keltoum »**

À mes nièces **Mayar, Maram, Rimesse, Rahaf et mon neveu Ayham** .

À **ma chère cousine « Ibtissem Bedjaoui »** qui représente pour moi le Symbole de la bonté par excellence et la source de support.

À **mon cher ami « Abdelhak »** qui m'a toujours encouragé et poussé vers l'avant en supportant mes sauts

Dédicaces

En tout premier lieu et avant tout choses je remercie DIEU de m'avoir donné la force pour réaliser ce travail que je dédie :

*Un grand amour dans mon cœur vers mon très beau papa **Mohamed** rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère **Monira** qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance et courage. Je suis fière de votre présence à mes côtés.*

*Un immense merci à mon chat **Ninou** que j'aime trop.*

*A mes belles **Assma** et **Ahlem** et ses filles **Lina**. **Anfel**. **Jana** et **Rimasse** avec un merci particulier à mes adorables cousines **Khadidja**. **Yasmine**. **Marwa** et **Ikram**.*

*À ma grand-mère **Fatma**. Ainsi mes chers tantes **Rofia**. **Hayat**. **Malika** et **Zahia**.*

*En dernier. Je tiens à remercier tout particulièrement mon bras droit, **Amine**, qui a partagé les joies et les peines inhérentes à ce mémoire. Merci d'avoir été toujours là pour moi, de m'avoir motivé quand il le fallait. Sans ton aide, tes encouragements, tes conseils, ce travail n'aurait vu le jour.*

Kounouz

SOMMAIRE

Résumé

ملخص

Abstrat

La liste des abréviations

La liste des tableaux

La liste des figures

Introduction01

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ SUR LES LECTINES

1. Historique.....	03
2. Définition des lectines.....	07
3. La structure des lectines.....	09
3.1. Les lectines simples	10
3.2. Les lectines en mosaïques.....	10
3.3. Les assemblages macromoléculaires	11
4. Structure 3D des lectines et classification des lectines.....	12
4.1. Structure 3D des lectines	12
4.2. La Classification des lectines	12
5. Les sites de reconnaissance des lectines.....	14
6. La spécificité et L'affinité des lectines.....	16
7. Les bio-ressources des lectines	18
7.1. Les lectines de plante	20
7.2. Les lectines de microorganisme	25
8. Les propriétés des lectines.....	28
9. Les fonctions biologiques des lectines.....	30

9.1. Chez l'être humain.....	30
9.2. Chez les végétaux	31
10. Les domaines d'application des lectines.....	31
11. Le rôle des lectines dans le monde vivant.....	33

CHAPITRE II : Le système sanguin

1. Historique.....	36
2. La définition de groupe ABO.....	36

CHAPITRE III : Généralité sur l'espèce

1. La présentation de la lentille Rouge.....	38
1.1. L'étymologie	38
1.2. La systématique.....	39
1.3. L'usage des lentilles rouges.....	39

CHAPITRE VI : MATÉRIÉL ET MÉTHODES

1. Le matériel et méthodes des tests phytochimiques...	40
1.1. Le matériel	40
a) Le matériel végétale	40
b) Le matériel biologique.....	40
1.2. Les méthodes	40
a) La Préparation de poudre	40
b) Le principe et technique d'extraction.....	41
2. L'activité hémagglutinante de l'extrait	42
2.1. La préparation de suspension d'hématies à 3%	42
2.2. Le test d'héagglutination.....	42
3. L'étude des caractéristiques de l'extrait de lectine...	43

3.1. L'effet de la température sur l'activité agglutinante.....	43
3.2. L'effet du pH sur l'activité agglutinante	44
4. L'inhibition d'agglutination par des saccharides.....	44
4.1. Le test d'agglutination	44
4.2. Le test limite d'inhibition d'hémagglutination par les glucides... 45	
5. Le test d'agglutination sur les hématies humains ABO.	46
6. La chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G50....	46
6.1. La préparation de la colonne de Sephadex G50	46
6.2. Le test d'agglutination après chromathographie.....	47

CHAPITRE V : Résultats et Discussion

1. L'étude phytochimique.....	48
1.1. Le test d'hémagglutination	48
1.2. La limite agglutinante de l'extrait brut de lentille rouge... 49	
2. L'étude des caractéristiques de l'extrait de lectine..	50
2.1. L'effet de la température sur l'agglutination.....	50
2.2. L'effet du pH sur l'agglutination	52
3. L'effet d'inhibition sur l'activité agglutinante....	53
3.1. Les résultats du test d'inhibition par les saccharides... 54	

3.2. Les résultats du test de la limite d'inhibition par le maltose....	54
4. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO ...	55
5. Les résultats d'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de sephadex G50.....	56
5.1. Le test d'hémagglutination après chromatographie ...	58

Conclusion et perspectives59

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, polyvalentes et d'origine non immunitaire, qui se lient de manière réversible et spécifiquement aux hydrates de carbone. Elles sont souvent multivalentes et possèdent la capacité bien connue d'agglutiner les érythrocytes.

Dans ce travail on a choisis les *lentilles rouges* pour faire l'extraction des lectines qui est faites par broyage et macération par un tampon PBS (0,01M, pH 7,34) pendant 24H. La détection et la quantification des lectines d'extrait est réalisé par agglutination sur du sang de lapin (3%) et en doubles dilution dans des microplaques.

L'activité agglutinante de l'extrait de *lentille rouge* est 1/9 (512) et commence à disparaître au niveau de point de dilution 1/1024.

Les lectines de l'extrait de *lentilles rouge* n'ont pas de la spécificité vis-à-vis tous les groupes sanguins de système ABO (ont donné une forte sélectivité pour les hématies du groupe O).

Le test d'inhibition pour différents glucides a donné une inhibition par le maltose et une agglutination normal avec les autres saccharides.

Le traitement thermique de l'extrait de *lentille rouge* a stimulé l'activité agglutinante de l'extrait à (T=40°C), puis elle a réduit significativement, Mais la T= 120°C a été suffisante pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante de l'extrait.

La lectine de *lentille rouge* n'a aucune activité lectinique dans les milieux très acide et alcalin. Mais elle est maximale dans l'intervalle de pH compris entre 3 et 4.

L'application de la chromatographie sur colonne de Séphadex G 50 sur l'extrait de lentilles rouges a donné un seul pic d'activité qui il correspond aux protéines de haut poids moléculaire.

Mots Clés : Lectines ; Extraction ; Saccharide ; Inhibition ; Système ABO ; Affinité ; Agglutination.

الملخص

اللكتينات عبارة عن بروتينات منتشرة في كل مكان ومتعددة التكافؤ وغير مناعية ترتبط بشكل عكسي بالكربوهيدرات على وجه التحديد. غالبًا ما تكون متعددة التكافؤ ولديها قدرة معروفة على تكتل كريات الدم الحمراء

في هذا العمل اخترنا العدس الأحمر لاستخراج الليكتين عن طريق الطحن والنقع باستخدام محلول

PBS (0,01M, pH 7,34) مدة 24 ساعة

يتم إجراء الكشف والتقدير الكمي لمستخلص الليكتين عن طريق التراص على دم الأرانب (3%) بالتخفيف المزدوج.

نشاط ترصص مستخلص العدس الأحمر هو 9/1 (512) ويبدأ في الاختفاء عند مستوى نقطة التخفيف 1024/1

لا يملك مستخلص اللكتين خصوصية نحو كل أنواع الزمر أعطت انتقائية قوية لمجموعة خلايا الدم O. الحمراء من المجموعة

أعطى اختبار التثبيت للكربوهيدرات المختلفة تثبيطاً عن طريق المالتوز وترصص طبيعي مع . السكريات الأخرى

حفزت المعالجة الحرارية (C 40 ° T) ثم انخفض التراص بشكل كبير الى أن توقف كلياً عند نشاط التراص

(T= 120°C) .

لا يحتوي ليكتين العدس الأحمر على نشاط لكتيني في الأوساط شديدة الحموضة والقلوية. لكنها كبيرة في نطاق الأس الهيدروجيني 3-4

أعطى تطبيق كروماتوجرافيا على مستخلص العدس الأحمر ذروة نشاط واحدة تتوافق مع البروتينات ذات الوزن الجزيئي العالي

الكلمات المفتاحية: لكتين، استخلاص، تثبيط، نظام ABO، شراهة، التراص،

سكريات.

Abstract

Lectins are ubiquitous, polyvalent, non-immune proteins that bind reversibly and specifically to carbohydrates. They are often multivalent and have the well-known ability to clump erythrocytes.

In this work we chose the red lentils to extract the lectins which is done by grinding and maceration with a PBS tampon (0.01M, pH 7.34) for 24 hours. Detection and quantification of extract lectins is carried out by agglutination on rabbit blood (3%) and in double dilution in microplates

The agglutinating activity of red lentil extract is 1/9 (512) and begins to disappear at the 1/1024 dilution point level.

Lectins from red lentil extract lacked specificity for all ABO system blood groups (gave strong selectivity for group O red blood cells).

The inhibition test for different carbohydrates gave inhibition by maltose and normal agglutination with other saccharides

The heat treatment of the red lens extract stimulated the agglutinating activity of the extract to ($T = 40^{\circ} \text{C}$), then it significantly reduced, but the $T = 120^{\circ} \text{C}$ was sufficient to completely inactivate the hemagglutinating activity of the extract.

red lentil lectin has no lectinic activity in highly acidic and alkaline media. But it is highest in the pH range of 3-4.

The application of column chromatography of Sephadex G 50 on the extract of red lentils gave a single activity peak which corresponds to the high molecular weight proteins.

Keywords: Lectins; Extraction; Saccharide; Inhibition; ABO system; Affinity; Agglutination.

Liste des abréviations

ABS : Absorbance.

Con A : Concavoline A lectine.

ConM : Canavaliamaritima.

Fuc : Un Fucose.

Gal : Un Galactose.

GalNAc : N-acetylgalactosamine.

GlcNAc : N-acetylglucosamine.

Glu : Glucose.

Man: Mannose.

MBL: mannose binding lectin.

nm : Nanomètre.

PA-IIL: Pseudomonas aeruginosa lectin II.

PBS : Phosphate buffer saline.

pH : potentiel Hydro isoélectrique.

SDS-PAGE :Sodium deodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

D : début de la lecture de microplaque

µl: Microlitre

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Historique de la découverte des lectines (Renato et col, 1991)	05
Tableau 02 : Les lectines et leurs applications (Bothan et Weil, 2011)	09
Tableau 03 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (Caroline S.A, 2008)	13
Tableau 04 : Lectines spécifiques pour les monosaccharides (Sharon 2003).	17
Tableau 05 : Origine et distribution de quelques lectines et leurs propriétés biologiques	19
Tableau 06 : Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses	23
Tableau 07 : Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato et coll., 1991)	25
Tableau 08 : Lectines bactériennes solubles	27
Tableau 09 : Propriétés des lectines	28
Tableau 10 : Domaines d'application des lectines	32
Tableau 11 : Classification et rôles physiologiques des lectines dans les organismes vivants (Cioci et al., 2006)	34
Tableau 12 : Différentes groupes sanguins du système A, B, O (Bailly P.et al.,2015)	37
Tableau 13 : Systématique de lentille	39
Tableau 14 : Résultats du test d'hémagglutination de l'extrait brut	48
Tableau 15 : Tableau représentatif de l'effet de la température sur l'activité agglutinante	51
Tableau 16 : Effet du pH sur la limite d'hémagglutination d'extrait des lentilles rouges	52

Tableau 17 : Effet du pH sur les résultats d'agglutination d'extrait des lentilles rouges	52
Tableau 18 : Test d'inhibition d'extrait des lentilles rouges par différents glucides	53
Tableau 19 : Limite inhibitrice d'agglutination par le maltose sur l'extrait des lentilles rouges	55
Tableau 20 : Test d'agglutination avec les érythrocytes humains	55
Tableau 21 : Résultats d'extraction de 80 fractions des lentilles rouges obtenus après chromatographie sur colonne de G50	56

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Sharonet Lis, 1993)	08
Figure 02 : Représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de <i>canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006)	10
Figure 03 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en Complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al, 2006)	11
Figure 04 : Schéma Représentative de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia Coli</i> (Lenka, 2006)	11
Figure 05 : Structure du complexe PA-IIL-fucose avec représentation en bâtonnet des ions fucose et calcium comme modèles de remplissage (Lamblin et al.,2001)	15
Figure 06 : Interactions de PA-IIL avec les ions calcium et le fucose (N. Garber et al, 1987)	15
Figure 07 : Similarités structurales entre monosaccharides	18
Figure 08 : Les classes de lectines selon le nombre de chaîne polypeptidiques	21
Figure 09 : Classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al. 1998)	21
Figure 10 : Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavalia maritima</i> complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre, et al., 2006)	22
Figure 11 : Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharid GBO4 gauche PDB 1J8R).et une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (droite PDB 109W)	26
Figure 12 : Test d'agglutination pour la détection de lection (A) et l'inhibition d'agglutination provoquée par la présence de lectine et leur spécificité avec les glucides (B) (Santos A. F. S. et al.,2014)	31
Figure 13 : Rôle des lectines chez les microorganismes pathogènes pour reconnaître et adhérer aux glycoconjugués de la cellule hôte (Imberty and Varrot, 2008)	33
Figure 14 : Les parties de la plante de Lentille (graine, fleur et fruit) (Baba Aissa, 2000)	38
Figure 15 : Lentille rouge	39
Figure 16 : Photographie de lentille rouge	40

Figure 17 : Poudre de lentille rouge après le broyage	40
Figure 18 : Schéma d'extraction de lectine à partir de lentille rouge	41
Figure 19 : Limite d'agglutination de l'extrait brut de lentille rouge	49
Figure 20 : Limite agglutinante des lectines d'extrait bruts des lentilles rouges chauffés à différentes températures pendant 60min	50
Figure 21 : Présentation microscopique d'activité agglutinante à T (40°C)	51
Figure 22 : Limite inhibitrice d'agglutination par le maltose sur l'extrait des lentilles rouges	54
Figure 23 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction du volume d'élution des différentes fractions protéiques	57
Figure 24 : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les 80 fractions obtenues après purification des protéines	58

Introduction

Les lectines constituent un groupe de protéines ou de glycoprotéines d'origine non-immunitaire, qui se lient de façon réversible aux hydrates de carbone et le plus souvent agglutinent les cellules ou précipitent les polysaccharides et des glycoconjugués. (**Goldstein et al,1980**).

Les lectines ont été redéfinies par Peumans & Van Damme en 1995 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**).

Le contenu de lectine varie selon l'organisme d'origine, la recherche d'une lectine avec un bon rendement protéique facilite la production des masses des lectines (**Lam, S.K.et Ng T.B.,2011**).

La présente étude a été réalisée afin d'étudier la présence des lectines dans les lentilles rouges. Toutes les extractions des lectines sont réalisées en milieu aqueux (Tampon PBS) après une macération de 24 heures.

Notre travail se répartit en :

- ⇒ Une étude bibliographique sur les lectines.
- ⇒ Le matériel et méthodes utilisés lors du travail expérimental.
- ⇒ Les résultats et les discussions.

Dans cette étude nous avons fixés les objectifs suivants :

- Étude de la présence des lectines par le test d'hémagglutination avec le sang de lapin.
- Étude de l'effet de température et le pH sur l'activité de ces lectines.
- Étude de l'affinité de ces lectines vers les glucides et les glycoprotéines par le test d'inhibition d'une part et vers les globules rouges de l'être humain par le test ABO d'autre part.
- Purification par chromatographie sur colonne.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉ SUR LES LECTINES

1. Historique

A l'origine, le terme lectine dérivé du mot latin légère (qui veut dire « sélectionner »), faisait référence à la propriété de certaines protéines d'agglutiner sélectivement les hématies humaines (**Boyd et Shapleigh 1954**).

L'étude des lectines a été introduite par P.H. Stillmark en 1888. Celui-ci a dans un premier temps mis en évidence l'existence de molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ces molécules ont ainsi été nommées hémagglutinines ou phyto-agglutinines (**Sharon N, Lis H., 2004**). La première de ces molécules a été extraite du ricin (*Ricinus communis*) et a été appelée Ricine.

La même activité a ensuite été découverte dans les extraits du pois rouge (*Abrus precatorius*) par P. Ehrlich : cette molécule a été nommée Abrine. Par la suite, il a été constaté qu'en plus de leur capacité hémagglutinante, ces deux molécules avaient une activité toxique. La découverte de ces molécules végétales a permis de faire les premières observations concernant la spécificité du système immunitaire. En effet, après immunisation de souris par des injections sous-cutanées répétées à des doses non létales de Ricine ou d'Abrine, P. Ehrlich a constaté que le sérum issu de l'immunisation par la ricine protégeait les animaux contre les effets toxiques d'injections de ricine mais pas d'abrine et vice-versa.

En 1919, **J.B. Sumner** a purifié la concanavaline A ou ConA (*Conavalia ensiformis*) et a mis en évidence, en 1936 avec S.F. Howell, que cette phytoagglutinine pouvait également agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (comme par exemple les levures) et précipiter le glycogène en solution. Par la suite, il a été observé que l'hémagglutination induite par la ConA peut être inhibée par une solution de sucrose. Ces études ont permis d'introduire la notion de spécificité de reconnaissance des sucres par les phytoagglutinines. En parallèle, après les avancées de K. Landsteiner concernant les différences d'activité des phytoagglutinines selon les types cellulaires (**Lefrere JJ et Berche P ,2010**).

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

En 1957, **O. Mäkelä** a réalisé une étude sur des extraits de graines de 743 espèces de légumineuses différentes (**O M ,1957**). Il a mis en évidence qu'un peu plus d'un tiers de ces extraits possèdent une activité hémagglutinante et qu'environ un dixième d'entre eux révèlent une spécificité envers les groupes sanguins A, B ou O.

Ces découvertes ont joué un rôle essentiel dans les études structurales des déterminants antigéniques de groupes sanguins. Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes ont été purifiées et caractérisées, elles sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes. Actuellement, certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour le typage du sang, principalement en raison de l'indisponibilité d'anticorps anti -O (H) naturels et en raison du fait que certaines d'entre elles distinguent les sous-groupes A1 et A2 (**Liener, 1976**).

Le nombre des lectines isolées a augmenté avec l'introduction des purifications sur chromatographie d'affinité. Ainsi, environ 300 lectines de plantes ont été isolées et caractérisées (**Van Damme et al, 1998**). L'intérêt de purifier un très grand nombre de lectines est dû à leur utilisation comme outil de détection, d'isolement et de caractérisation des glycoconjugués présents dans les cellules vivantes (**Peumans et Van Damme, 1998**). Le Tableau 01 présente historique de la découverte des lectines.

Tableau 01 : Historique de la découverte des lectines (renato et col, 1991)

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dix Alerte de sécurité son	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de Ricinus communis Toxicité de la graine de Croton triglium
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine de Abrus Precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non Toxiques
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum

1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-7	MarcussonBegun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a Hémagglutinines
1949	Liener	Inactivation Thermique des hemagglutinines de Phaseolus vulgaris
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolusvulgaris
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 Phaseolus vulgaris
1965	Agrawal &Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purificationdes lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle Osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

2. Définition des lectines

Les lectines sont des protéines hydrosolubles retrouvées surtout dans les graines des légumineuses (**Etzer, 1994**), elles sont ubiquitaires d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible.

L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire (**Karoline Saboia Aragão, 2008**).

Les lectines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon, 1998**), elles sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD. Et habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopskins et Evrard, 2003**). On les trouve dans la plupart des tissus, et en particulier dans les graines où elles peuvent représenter une grande proportion des protéines totales (5% du poids sec des haricots et 6,5% de celui des graines de soja).

Le fait que celles-ci soient retrouvées dans l'alimentation commune (tomates, lentilles, haricots, ...) indique qu'à des doses raisonnables la majorité des lectines ne sont pas toxiques pour l'organisme (**Ryder SD et al, 1998**). Ceci leur donne la capacité de pénétrer dans la circulation sanguine en conservant leur activité biologique (**Woodley JF, 2001 & Wang Q et al, 1998**).

Les lectines sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (**Liener et al., 1986**).

Des études ont montré que la concentration en lectine peut augmenter en réponse à une infection par des pathogènes (**Babosha AV ,2008**) et que certaines d'entre elles sont détectables dans le noyau et le cytoplasme uniquement en réponse à un stress (**Van Damme EJ et al ,2004**), ce qui peut provoquer 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**), parce qu'elles sont des substances thermolabiles, responsables de la toxicité de certaines plantes : ricin, jéquirity, haricot ... (**Bruneton, 1993**) Bien qu'il existe des lectines thermorésistantes (**Guillaume, 1993**).

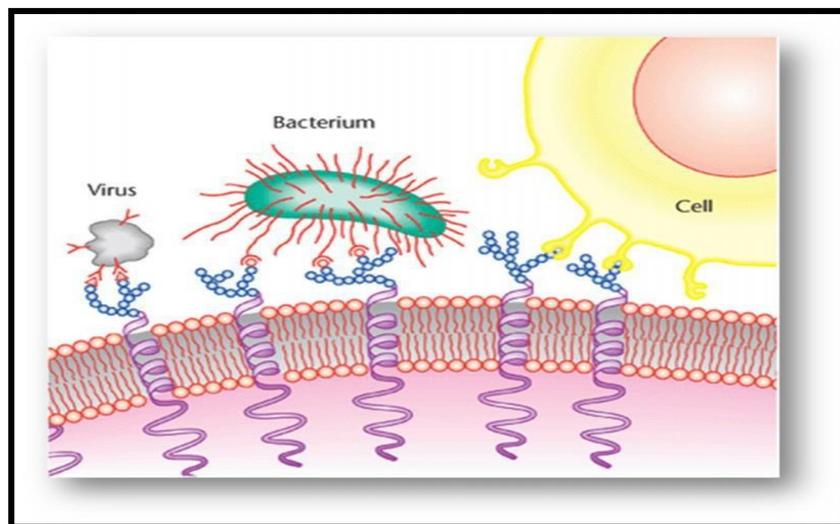
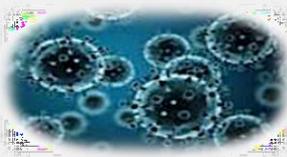
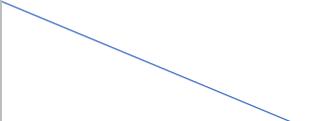


Figure 01 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (**Sharonet Lis, 1993**)

- Quelques lectines importantes sont énumérées dans le tableau **02**:

Tableau 02 : Les lectines et leurs applications (Bothan et Weil, 2011)

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

3. La structure des lectines

Il existe une grande variété de lectines avec une très grande diversité structurale. La première structure cristalline d'une lectine à être déterminée par diffraction des rayons X fut sur la concanavaline A (Edelman 1972 ; Hardman 1972). Les lectines se subdivisent en 3 classes. Selon la base de leurs structures :

3.1. Les lectines simples

Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose), Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 40KDa. (Lenka,2006) (Figure 02).

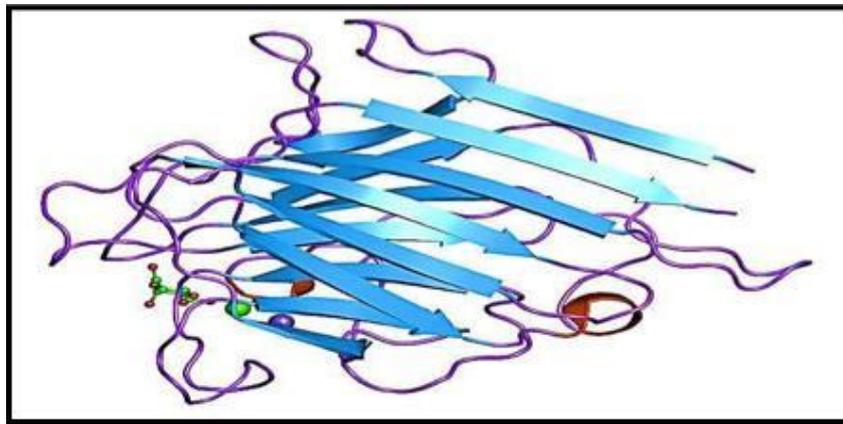


Figure 02 : Représentation graphique d'un monomère de concavaline A de canavalia ensiformis en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006)

- La protéine est représenté par :
 - Un ruban rouge pour les hélices α .
 - Un ruban bleu 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

Il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs types de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al*, 2006). (Figure 03), cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus).

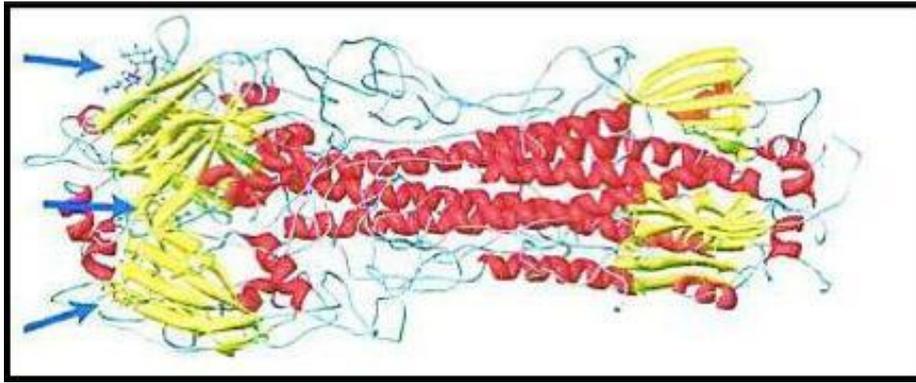


Figure 03 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en Complexe avec de l'acide sialique (**Lenka et al, 2006**)

3.3. Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont beaucoup plus 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 polymérisation d'une unité prédominante forme la plus grande partie d'un filament fimbrial, 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**) (**Figure 04**).



Figure 04 : Schéma Représentative de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia Coli (**Lenka, 2006**)

4. La structure 3D des lectines et classification des lectines

4.1. Structure 3D des lectines

La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes, on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines. (**ZUI FUJIMOTO, 2014**).

La structure tridimensionnelle des lectines est constituée de feuilles β reliés par un nœud et formant des chaînes antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (**Sharon & Lis, 1990**).

Les progrès récents de la biologie structurale ont élucidé les structures tridimensionnelles et les mécanismes de liaison aux glucides de la plupart des familles de lectines Qui sont classées en 48 familles dans une banque de lectines en fonction de leurs structures tridimensionnelles dont 6 d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 familles d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1 famille d'algue.

4.2. La classification des lectines

La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes, car le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance.

Tableau 03 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines

(Caroline S.A, 2008)

Origine	Exemple de Lectines	Native	Complexé	Total
Plantes	ConA	106	201	307
	Ricine			
Bactéries	PA-IL de Pseudomonas			116
	Toxine de cholera	37	79	
Animaux	E-selectin			232
	Helix pomatia agglutinin	80	152	
Virus	Hemagglutinin de virus	43	25	68
	Capside de rotavirus			
Champignon	Lectine de mousseron	17	23	40
Algue	Griffithsin	2	7	9
Total		285	487	772

5. Les sites de reconnaissance des lectines

Toutes les informations disponibles sur les modes de reconnaissance ont été établies sur la base de l'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre.

- Dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides : les sites de liaison sont généralement 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 qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (**Gianluca, 2006**).
- Les liaisons hydrogènes entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et très directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).
- Dans les lectine de type C un atome de calcium est coordonné par les chaînes latérales des acides aminés dans les sites de liaison est par deux des hydroxyles 2-OH, 3-OH et 4-OH du sucre, qui est généralement un fucose, un mannose, ou moins fréquemment un galactose (**Drickamer 1996**). La lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* adopte un repliement protéique différent des lectines de type C mais elle reconnaît le galactose par une interaction très similaire. Une nouvelle classe de protéines présentant une grande affinité pour le fucose/mannose a été trouvée chez certaines bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum* et *Ralstonia solanacearum*. Ces lectines montrent la présence exceptionnelle de deux atomes de calcium dans le site de liaison.

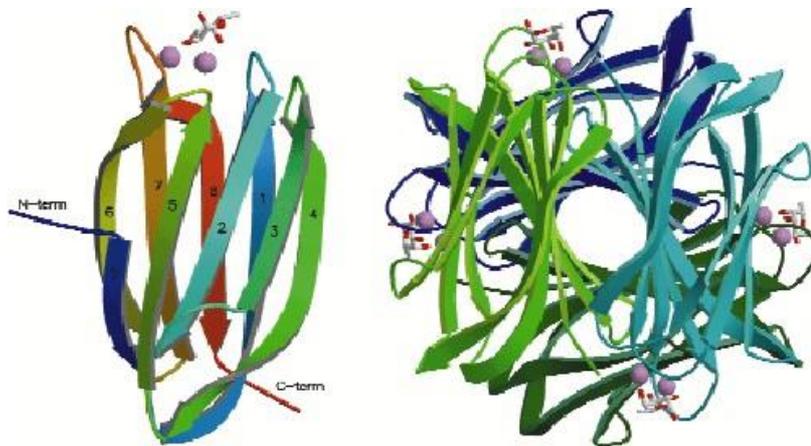


Figure 05 : Structure du complexe PA-III-fucose avec représentation en bâtonnet des ions fucose et calcium comme modèles de remplissage
Lamblin et al, (2001)

- **À gauche** : Monomère avec numérotation des brins β en accord avec le motif grec-clé(1 à 5)
- **À droite** : Le tétramère constituant l'unité asymétrique.

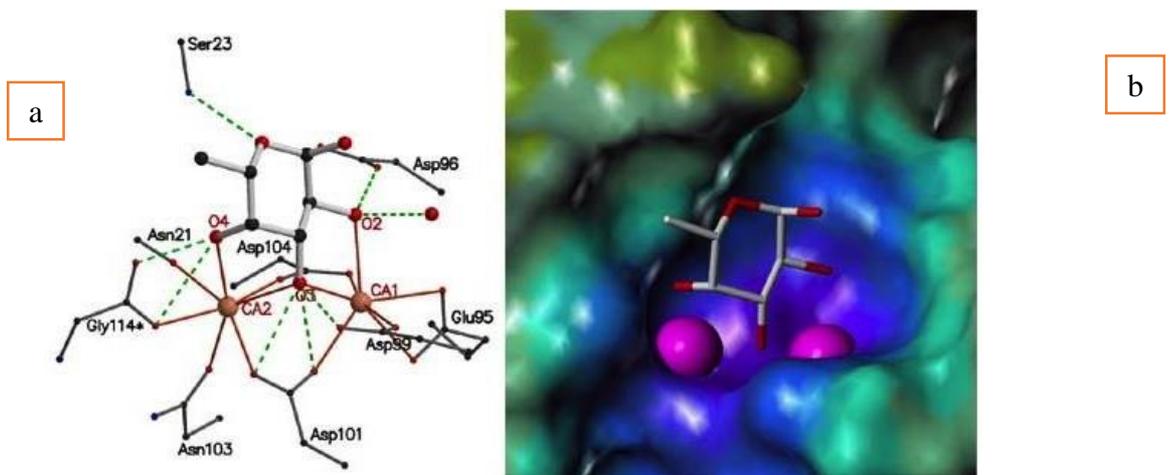


Figure 06 : Interactions de PA-III avec les ions calcium et le fucose.
(N.Garber et al, (1987))

(a) : Représentation en bâtonnet des acides aminés impliqués dans la liaison.

- 1) Les liaisons de coordination Ca^{2+} sont représentées par des lignes orange pleines.
- 2) Les liaisons hydrogène sous forme de lignes vertes en pointillés.

• **Code couleur :**

- Rouge : oxygène
- Bleu : azote
- Noir : Carbone
- Rose : Ca^{2+} .

(b) : Représentation de surface électrostatique du site de liaison PA-III avec Ca^{2+} comme de « grandes sphères roses » et du fucose comme un modèle de « bâton ».

6. La spécificité et l'affinité des lectines

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. 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-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (Lis and Sharon 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines

Tableau 04 : Lectines spécifiques pour les monosaccharides (Sharon 2003)

Monosaccharide	Lectine
Man	<i>Allium sativum</i> ; <i>Canavalia ensiformis</i> ; <i>Crocus sativus</i> ; <i>Dioclea grandiflora</i> ; <i>E.Coli</i> type 1 fimbriae ; ERGIC-53 ; <i>Galanthus nivalis</i> ; MBLs of animals ; <i>Pisum sativum</i> ; <i>Vicia faba</i>
Fuc	<i>Aleuria aurantia</i> ; <i>Anguilla anguilla</i> ; <i>Lotus tetragonolobus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin II ; <i>Ulex europaeus</i> lectin I ; <i>Ulva lactuca</i> ; <u><i>Chromobacterium violaceum</i> lectin</u>
Gal/GalNAc	<i>Arachis hypogaea</i> ; <i>Coprinus cinereus</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Erythrina corallodendron</i> ; <i>Dolichos biflorus</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I ; <i>helix pomatia</i> ; <i>Hygrophorus hypothejus</i> ; <i>Phaseolus limensis</i> ; <i>Moluccella laevis</i> ; <i>Polyandrocarya misakiensis</i> ; <i>Ptilota filicina</i> ; <i>Ricinus communis</i> ; <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin I</u>
GlcNAc	<i>Conglutinin</i> ; <i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II ; Tachylectin-2 ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Ulex europaeus</i> lectin II ; <u><i>Psathyrella velutina</i></u>
NeuNAc	<i>Achatina fulica</i> ; <i>Cancer antennarius</i> ; <i>Hericium arinaceum</i> ; <i>Homarus americanus</i> lectin I ; <i>Limax flavus</i> ; <i>Scylla serrata</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Psathyrella velutina</i>

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. Certaines lectines peuvent reconnaître le mannose et le fucose telles que DC-SIGN de mammifère (van Liempt, et al. 2006), Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 des monosaccharides tels que l' α -methyl-galactoside et le β -methyl-galactoside.

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (Park, et al. 2008). Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (EnzymeLinked Lectin Assay) et de test « Glycans array » (glycochips avec différents mono et oligosaccharides) la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel. Deux exemples d'interactions non-spécifiques sont la lectine bactérienne de *Chromobacterium violaceum* (spécificité: fucose/mannose) et la lectine de champignon *Psathyrella velutina* (spécificité: GlcNAc/NeuNAc) (Gianluca Cioci, 2006).

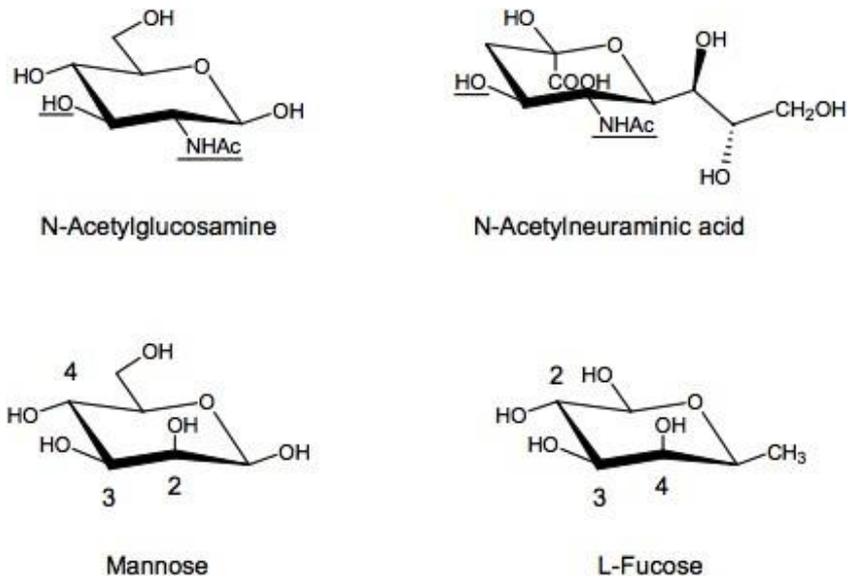


Figure 07 : Similarités structurales entre monosaccharides

7. Les bio-ressources des lectines

Initialement décrites dans le règne végétal où elles sont particulièrement abondantes, notamment chez les légumineuses et les graminées. Elles sont en effet très répandues dans le monde vivant puisque l'on en rencontre même chez les vertébrés, les racines, les virus et les bactéries... Des lectines sont également décrites chez les protozoaires tels que *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar*, on en rencontre même chez les animaux supérieurs, notamment chez l'homme où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (**Bouchara et Trouchin, 2003**).

Les lectines existent en faible quantité dans les organes jeunes. Leur présence est généralement limitée aux premières stades de développement de la plantule (**Miège J., 2016**).

Elles comportent plusieurs structures, origines et des sites de reconnaissance très diversifiés. Cette large répartition ne peut être fortuite mais laisse présager qu'elles ont des rôles importants dans la physiologie des organismes.

Tableau 05 : Origine et distribution de quelques lectines et leurs propriétés biologiques

Origine	Distribution	Structure	Inhibition par les sucres	Références
Végétale				
Concanavaline A (Con A) de Canavalia ensiformis	Fève d'haricot	Homotétramère (ss unité 23.5KDa)	D-mannose et au D-glucose.	MinW.et al.,1992
Phaseolus vulgaris (PHA)	Graines	Homodimère (ssunité 30KDa)	Glucosamine	Chan Y.et al.,2015
Psophocarpus spalustris	Graines	Hétérodimère (ss unités 4,5KDa et 2,7KDa)	D-mannose,Dgalactose	KukuA. et al., 2005
Phaseolus acutifolius	Graines	Monomère (28 ou 31KDa)	N-glycane	Valadez-Vega etal., 2011
Animale				
Escargot Helix pomatia «Agglutinin » (HPA)	le système reproducteur	Trimère (ss-unité 13 KDa)	O-GalNAc	Hammarstrom S. et al.,1977
Cinachyrella aapion	l'éponge marine	Octamère de 124 kDa(ssunité15,5KDa)	lactose	Rabelo L. et al.,2011
Amibe Dictyostelium discoideum	Surface Cellulaire	28.258 (DiscI) 28.575 (DiscII)	Gal/GalNAc	Sabóia Aragão K. 2008.Thèse Univ.J.F., Grenoble, 125p.
Microbienne				
Saccharomyces suvarum	associée à la paroi cellulaire.	40 kDa	D-Mannose-6 phosphate P α Nitrophenylmannopyranoside D-Mannosamine	Javadekar V.S. et al.,2000

7.1. Les lectines de plantes

Chez 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**), 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**).

La classification de **Peumans et Van Damme (1995)**, trois types majeurs de lectines sont présents chez les plantes :

a) Les mérolectines :

- Petits peptides.
- Formées d'une seule chaîne polypeptidique.
- Ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides.
- Incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.

b) Les hololectines :

- Possède deux domaines (ou plus) de liaisons aux glucides quasi- identiques ou du moins très homologues.
- Peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules.
- Représente La majorité des lectines de plantes connues.

c) Les chimérolectines :

- Possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie.

- Agissant indépendamment du site de liaison.

Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme :

⇒ Les **mérolectines** (exemple : chitinase classe I).

⇒ Les **hololectines** (exemple : type 2-Rip Ribosom Inactivating Proteine : Protéine Inactivantes Ribosomes comme la ricine Il existe une autre classe de lectines c'est la classe des« **superlectines** » qui possède également au moins deux domaines de liaison aux glucides, mais diffèrent des hololectines par le fait que leurs emplacements peuvent reconnaître des sucres structurellement indépendants.

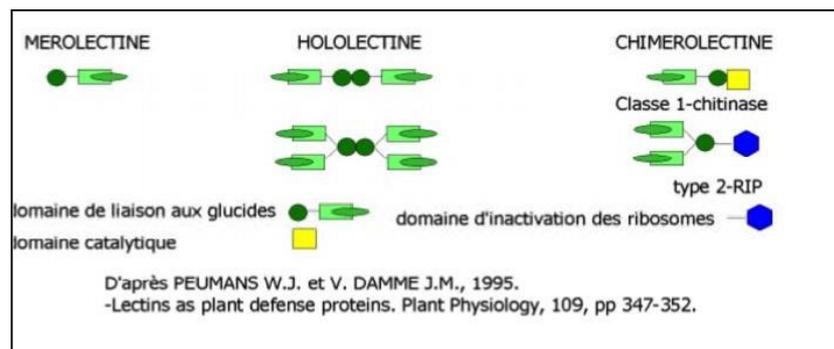


Figure 08 : Les classes de lectines selon le nombre de chaîne polypeptidiques

Les mérolectines	Les hololectines	les chimérolectines	les superlectines
Heveína (1HEV)	ConBr (3JU9)	PPL2 (2GSJ)	Banana lectin (2BMY)

Figure 09 : Classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al. 1998)

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g., les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Certains lectines de cette catégorie ayant des activités insecticides et impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, (**Chrispeels and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius , 2001**). (Tableau 06).

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (**Edelman et al, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**) (Figure 10).

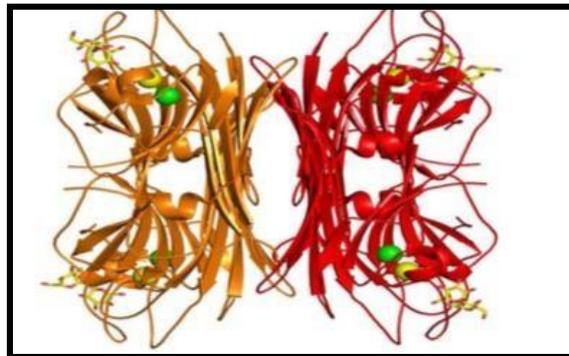


Figure 10 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (**Delatorre, et al., 2006**)

- γ Les cations sont représentés par des sphères.
- γ Le Calcium en jaune.
- γ Le Manganèse en vert.
- γ Les ligands par des bâtonnets.

Tableau 06 : Exemples d'activités biologiques décrites pour les lectines extraites de légumineuses

Lectine	Rôle	Référence
- Dgui (<i>Dioclea guianensis</i>)	Activité antifongique	Araujo-Filho et al., 2010
<ul style="list-style-type: none"> • ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>) • CFL (<i>Cratyla floribunada</i>), • Dgui, DGL (<i>D.grandiflora</i>), • Dvir (<i>D.virgata</i>) 	Effet toxique sur les mollusques.	Santos et al., 2010
- CGL (<i>Canavalia gladiata</i>)	Activité anti-inflammatoire et analgésique.	Nunes et al., 2009
- ConBol (<i>Canavalia boliavana</i>)	Activité antioceptive.	Figueiredo et al., 2009
- ConBr, CGL, ConM (<i>Canavalia maritima</i>)	Effet vasodilateur.	Assreuy et al., 2009
- ConM	Relaxation de l'aorte et libération d'oxyde nitrique.	Gadelha et al., 2005
- ConBr, DGL, DVL (<i>Dioclea violacea</i>)	Activation des lymphocytes.	Barbosa et al., 2001

Le lectine est présent dans :

La famille des Monocotylédones : comprend des lectines spécifiques pour le mannose (**Wright, C.S.and Hester ,1996**).

La famille de Moraceae : 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 -3GalNAc (**Transue et al., 1997**).

La spécificité osidique :

Selon La classification de **Goldstein et Poretz** basée sur la spécificité de reconnaissance, les lectines végétales sont classées en **6 groupes** :

Lectines spécifiques au :

- D-mannose/D-glucose.
- N-acétylglucosamine.
- Galactose.
- N-acétylgalactosamine.
- L-fucose et enfin à l'acide sialique (**Wu, 1988**).

Cette classification permet de définir les propriétés des lectines, mais elle ne fournit aucun renseignement sur leur structure moléculaire

Tableau 07 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato et coll., 1991)

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

7.2. Les lectines des microorganismes

Pour la reconnaissance des sucres présents sur la surface des cellules hôtes. Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines.

Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (Imberty and Varrot, 2008 ; Sharon, 1996). L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes.

Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymère hydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (Imberty, 2011). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriales (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (Imberty *et al.*, 2005) *Entamoeba histolytica* est un parasite entérique qui peut tuer les cellules hôtes via un mécanisme dépendant du contact.

- **Les andésines**

Les bactéries sont armées d'organelles de surface appelés les fimbriales, qui présentent différentes fonctions, tels que l'adhésion sur plusieurs surfaces et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes et la reconnaissance des glycanes de l'hôte. Ces derniers sont liés à la surface des cellules bactériennes.

Il existe trois différents types d'adhésine (Type 1, type P et le type IV), ont une organisation structurale semblable (Soto and Hultgren, 1999).

Les fimbriales ont des structures cristallines appartiennent aux pili de type 1 et de type P. Les lectines de cette famille a une structure allongée de type β -Sandwich et un repliement similaire. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un côté du domaine lectine. (Figure 11).

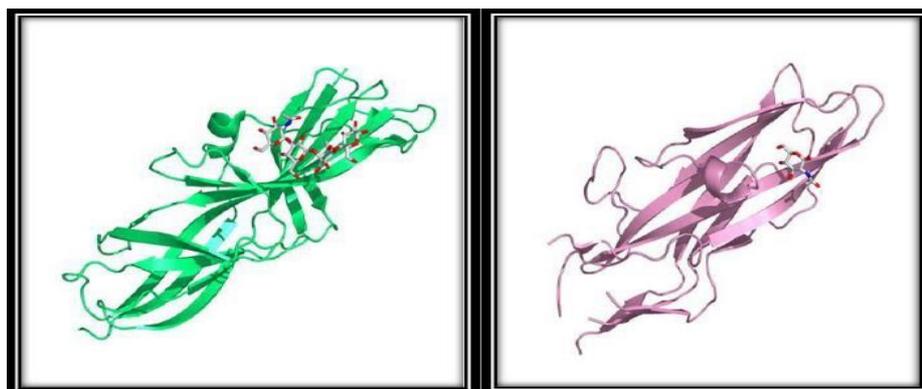


Figure 11 : Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 gauche (PDB 1J8R). et une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (droite PDB 109W)

- (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R).
- (b) FimH complexé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF).
- (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W).

- **Les lectines solubles**

Elles regroupent toutes les protéines solubles exprimées par des bactéries qui ont une affinité pour les sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique (**Kostlanova, 2005**)

Tableau 08 : Lectines bactériennes solubles

Nom	Type	Spécificité	Caractéristique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAIL	Pathogène humain	Galactose	Lectine cytotoxique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAIL	Pathogène humain	Fructose/Mannose	Très haute affinité vers le fucose
<i>Cromobacterium violaceum</i> CVIIL	Pathogène humain	Fructose/Mannose	Très haute homologie avec PAIIL
<i>Burkholderia cenocepacia</i> BCLx	Pathogène humain	fucose/mannose	Gènes identifiés homologues à PAIIL
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS-IIL	Pathogène Végétal	mannose/fucose	Très haute homologie avec PAIIL
<i>Ralstonia solanacearum</i> RSL	Pathogène Végétal	Fucose	Similaire à « <i>Aleuria aurantia</i> lectin », une lectine de champignon

8. Les propriétés des lectines

Elles sont multiples et variées : (voir **Tableau 09 : Propriétés des lectines**)

Propriété biologique	Propriété médicinale
<p>Interaction lectine-glucide :</p> <p>Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (Murdock, L. L. and Shade, 2002). (Myoshimet <i>et al.</i>, 1982). (Figure 15).</p> <p>Sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique (Jain <i>et al.</i>, 2001), ces glycanes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectines (Jeyaprakashet <i>et al.</i>, 2003).</p>	<p>L'inhibition de la croissance des cellules cancéreuse :</p> <p>Les lectines alimentaires pourraient freiner la croissance cellulaire des cellules cancéreuses de l'homme in vitro (Valentier <i>et coll.</i> 2003).</p> <p>A des doses non toxiques pour l'organisme, peuvent injecter dans la circulation sanguine pour faire la mort des cellules tumorales soit par apoptose, soit par l'autophagie ou bien par l'activation des défenses immunes anticancéreuses (Poiroux, 2011).</p>
<p>Activité mitogène :</p> <p>Une des effets les plus étonnantes des lectines.</p> <p>Permet de transformer le petit lymphocyte du sang en cellule blastique, cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général, Elle n'exerce que sur les lymphocyte T (Nachbar <i>et Oppenheim</i>, 1980. Babosa, 2001 ; Falasca, 1989).</p> <p>Elle possède la capacité d'activer diverse lymphocyte (Widmer, 1996).</p>	<p>Propriété antibactérienne :</p> <p>Les lectines sont des régulateurs d'adhésion et de la migration des cellules bactériennes d'où leurs activités anti bactérienne (Tanne <i>et Neyrolle</i>, 2010).</p> <p>Les lectines réceptrices des kinases (LecRKs) sont des lectines animale impliquées dans la résistance aux bactéries (Singh <i>et al.</i>, 2012).</p> <p>Concernent les lectines humain de type L (LTLs) qui ont la capacité d'agglutinées les différentes bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de micro-organismes (Zhang <i>et al.</i>, 2012 ; Huang <i>et al.</i>, 2014 ; Xu <i>et al.</i>, 2014).</p>
<p>L'agglutination cellulaire :</p>	<p>Propriété anti fongique :</p>

<p>C'est l'affirmation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (Peumans and Vandamme,1995 ; Wangh and NG, 1998).</p> <p>Elle signifie d'un point opérationnel que la lectines est au moins divalente (au moins 2sites de fixations) cette propriété est utilisée pour la détection et la quantification de l'activité des lectines (makila, 1957 ; krupe, 1956). (Wright, C. S, 1980). (Figure 12).</p>	<p>Les lectine de <i>Phaselousvulgaris cv</i> ont une activité fongicide contre <i>Valsa mali</i> (Lam et Ng, 2010). La même propriété est présentée par les lectines de <i>Tinosporatomentosa</i> qui inhibes la croissance du champignon <i>Aspergillus niger</i> (Reponet al., 2014).</p> <p>L'activité anti fongicide est présentée seulement par quelques lectines qui possèdent un domaine catalytique. Ces lectines appartiennent généralement à la classe I des chitinases (Andrew et al, 2014).</p>
	<p>Propriété immuno-modulatrice :</p> <p>Lors de première interaction avec les glycanes présentent à la surface des cellules immunitaires, nombreuses lectines exercent une activité immuno-modulatrice (Abdeljalil et al, 2014).</p> <p>Propriété antivirale :</p> <p>Les lectines sont impliquées dans la détection des molécules pathogènes (PAMPs) associées au virus (Kawamura et al, 2014).</p> <p>Elles sont responsables au blocage del'infection du VIH-1 par inhibition de l'enzyme : rétro-transcriptase du virus (Tanaka et al ,2009. Hamid et al ,2013).</p>

9. Les fonctions biologiques des lectines

Les fonctions cellulaires des lectines sont associées directement à leur interaction avec les glycanes. En effet, tous les lectines comportent d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité, permet de faire une interaction plus spécifique avec quelques glyco-conjugués que d'autre (**Jain D et al.,2001**).

9.1. Chez l'être humain

Parmi les fonctions des lectines chez l'être humain on a :

- La Distinction de type du sang (A, B, O).
- Agent coagulant ou agglutinant (figure13).
- L'Inhibition de la croissance des cellules cancéreuse.
- Le traitement du cancer (**Voet et Voet, 2005**).
- Fonction Anti inflammatoire (**Alencar et al, 2005 ; Gomes et al, 2012**).
- Le Transport des protéines, des peptides et des médicaments natifs (**Sutapa et Gopa, 2013**) en contrôlant les niveaux des protéines dans le sang.
- L'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**).
- Les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour La reconnaissance spécifique des antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Shapleigh, 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.
- Assure l'adhésion de certaines bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte (**Sharon and Ofek, 2000**)

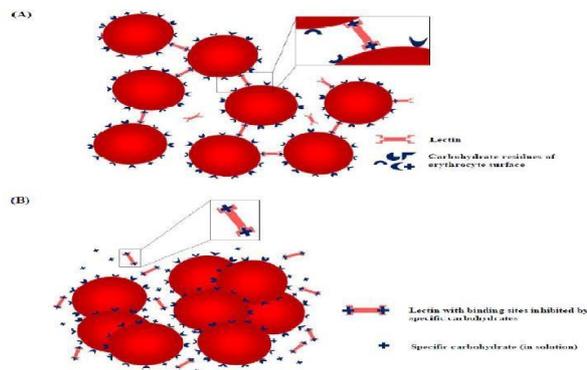


Figure 12 : Test d'agglutination pour la détection de lectine (A) et l'inhibition d'agglutination provoquée par la présence de lectine et leur spécificité avec les glucides (B) (Santos A. F. S. et al.,2014)

9.2. Chez les végétaux

Les lectines sont retrouvées dans la majorité des tissus, et en particulier dans les grains où elles peuvent représenter une grande proportion des protéines totales ; ces lectines ont la capacité de : (Etzler, 1986 ; Kaminski et al.,1987).

- Contrôler la division cellulaire (mitogénicité) et de la germination.
- Intervention dans les processus de reconnaissance de cellule-cellule.
- Intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines.
- Une fonction de cofacteurs enzymatiques agissant avec es enzymes glycoprotéiques.
- Et dans l'élongation des parois cellulaires.
- Le mécanisme de défense contre les phyto-pathogènes (Peumans WJ, van Damme EJ, 1995) (Sharon N., 2008).

10. Les domaines d'application des lectines

Les lectines peuvent être utilisées pour dans divers domaines. À titre d'exemples certaines applications sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Domaines d'application des lectine

Domaine	Application	Référence
Agronomique	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 les cultures.	(Murdock et Shade, 2002).
Biochimique	Étudier la nature des structures et la dynamique des membranes cellulaires possédant des résidus saccharidiques.	Alencar et al., 2005).
Protéomique	Marqueurs tumoraux. Enquêtes épidémiologique.	Pillai K.R. et al., 1996 ; Schaller W.D. et al., (2012)
Biomédicale	<p>Hématologie : Identification des groupes sanguins, Séparation des leucocytes, Isolement des macromolécules contenant des résidus saccharidiques (Antigène des groupes sanguins).</p> <p>Cancérologie : Marqueurs histochimiques puisque quelques maladies tel que le cancer sont associées à une modification des glycanes présentes sur les cellules. Transporteurs pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.</p> <p>Immunologie : Activités immuno-modulatrice par leur interaction avec les glycanes, tel que la transduction de signal, les réponses contre les tumeurs ou les infections microbiennes. Juger des effets de diverses manipulations immunosuppressive et immuno-thérapeutiques, étudier les sensibilités dues aux maladies infectieuses et Reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises.</p>	<p>Miége J. .2016</p> <p>Guillot et al., 2004</p> <p>Kenoth et al ,2001</p> <p>Teixeira C.R et al., 2006 ;</p> <p>Coltri K.C et al., 2008 ;</p> <p>Stojanovic M.M et al., (2009).</p> <p>Jaffe., 1980</p>

11. Le rôle des lectines dans l'organisme vivant

Les lectines sont des récepteurs spécifiques pour les interactions protéines-glucides qui jouent des rôles clés dans plusieurs processus de signalisation cellulaire et de la reconnaissance moléculaire (Wiley and Skehel, 1987).

⇒ Exemple :

L'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (Wiley and Skehel, 1987). De la même façon, les lectines situées sur 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 (Figure 14).

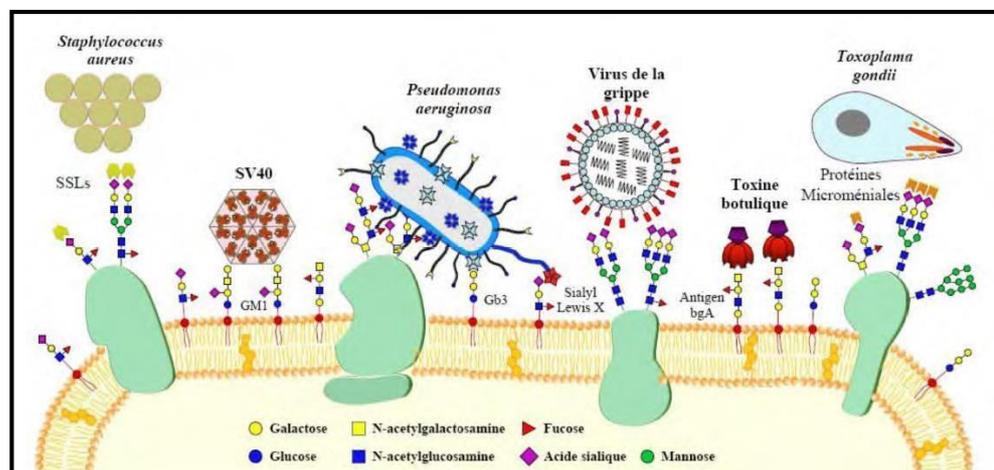


Figure 13 : Rôle des lectines chez les microorganismes pathogènes pour reconnaître et adhérer aux glycoconjugués de la cellule hôte (Imberty and Varrot, 2008)

Le tableau ci-dessous résume les différents rôles des lectines chez les bactéries, les virus, les toxines et les plantes

Tableau 11 : Classification et rôles physiologiques des lectines dans les organismes vivants (Cioci et al., 2006)

Lectines	Types	Rôles
Bactéries	Lectines fimbriales	Adhésion, infection
	Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines		Adhesion, infection
Virus	Influenza hémagglutinine	Adhésion, infection
<i>Amoeba</i>	Lectines de surface	Adhésion
Plante	Légumineuses	Defense, symbioses avec les bactéries fixant l'azote
	Autres	Défense

Animaux	Calnexine	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines.
	M-type	Dégradation des protéines dans le RE.
	L-type	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
	P-type	Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose, régulation du cycle cellulaire, modulation des interactions cellule-cellule et cellule-substrat.
	C-type	Adhésion cellulaire (selectines), Clairance des glycoprotéines, Réponse immunitaire (collectines).
	Galectine	Reconnaissance des glycannes dans la matrice extracellulaire.
	I-type	Adhésion cellulaire dans le CNS (siglecs).
	R-type	Ciblage des enzymes, régulation du turnover des Hormones

CHAPITRE II
LE SYSTÈME SANGUIN

1. Historique

En 1901, Autrichien **Karl Landsteiner** démontre que les sangs humains ne sont pas tous semblables ni tous compatibles entre eux. Il découvre le système ABO, suivant lequel le sang se partage en trois groupes sanguins qu'il nomme A, B et C (qui deviendront A, B et O à l'avenir). Selon les antigènes que l'on trouve associés aux globules rouges des personnes (**Boucher, 2008, Danic et Lefrère, 2011**).

En 1902, un quatrième groupe sanguin, le groupe AB, est découvert par **A. Decastrello** et **A. Sturli**.

En 1924, **Bernstein** montre que les groupes constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de **Mendel**.

En 1939, les travaux de **Philip Levine** pour mettre en évidence une incompatibilité entre donneur et receveur de même groupe sanguin.

2. Définition du groupe ABO

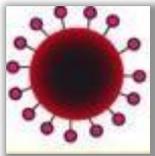
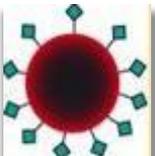
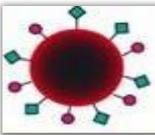
Les groupes sanguins ABO sont des groupes d'antigènes, situés sur la membrane cellulaire, codés par des allèles à différents locus sur les molécules chromosomiques et classés dans des groupes sanguins, A, B, O, qui dépend de deux antigènes (A et B antigènes) (**Pramanik T. et Pramanik S., 2000**). Les individus du groupe O expriment l'antigène H, l'ABO, par conséquent, est le type de sang, alors que A, B, H, se réfèrent aux antigènes. (**Reid M.E. Lomas-Francis C. et Olsson M.L., 2012**).

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

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

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

Tableau 12 : Différentes groupes sanguins du système A, B, O
(Bailly P.etal.,2015)

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	 Antigène A	 Antigène B	 Antigène A et B	Pas d' Antigène

CHAPITRE III
GÉNÉRALITÉ SUR L'ÉSPÈCE

1. La présentation de lentille rouge

1.1. L'étymologie

Lens culinaris ou *Lens esculenta* plante annuelle, de 45 cm de hauteur, porte des feuilles composées de six paire de folioles oblongues, les folioles supérieures étant transformées en vrilles, ses fleurs de pois bleu pâle sont suivies de gousses renflées contenant deux graines.

Ce genre compte six espèces de légumineuses annuelles, originaires de la méditerranée, de l'ouest de l'Inde et d'Afrique (Geoff Burnie et al., 2006).

La lentille est l'une de nos plus anciennes plantes alimentaires cultivées. Ses feuilles, à stipules lancéolées, terminées par une longue vrille simple, présentent 5 à 7 paires de folioles. Les fleurs, petites et de couleur bleuâtre, sont groupées par 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles. Les gousses, courtes, planes et tronquées, contiennent 2 graines aplaties riches en protéines (25% de matière fraîche) illustré en Figure 14 (Mazoyar, 2002).

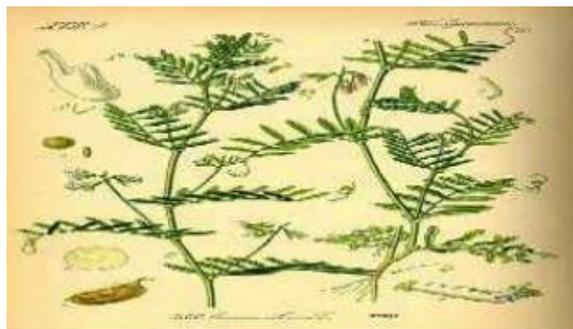


Figure 14 : Les parties de la plante de Lentille (graine, fleur et fruit) (BabaAissa, 2000)

Parmi les types des lentilles qui sont classifiés selon la couleur on va étudié **la lentille rouge** ou « la lentille corail », qui est un aliment riche en couleur et en goût, cette lentille cassée de couleur orange foncé (**Figure 15**), aussi appelée lentille égyptienne ou masoor dahal est la variété la plus répandue. Bien que la lentille soit assez dure même lorsqu'elle est fraîche, contrairement aux autres légumes secs (**FAO, 2016**).



Figure 15 : Lentille rouge

1.2. La systématique : (Medik,1787)

Tableau 13 : Systématique de lentille

Règne :	<i>Plantea</i>
Sous Règne :	<i>Tracheobionta</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous Classe :	<i>Rosidea</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Fabaceae</i>
Genre :	<i>Lens</i>
Espèce :	<i>Lens culinaris</i>

1.3. L'usage de lentille rouge

- Meilleur contrôle du diabète.
- Limiter le risque de cancer du côlon.
- Sensation de satiété rapide et donc un bon allié minceur.
- Riche en minéraux : fer, le phosphore, le potassium, le magnésium et les vitamines B.
- Riche en anti-oxydants (lutter contre le vieillissement des cellules).
- Abaisse taux de cholestérol et le risque d'accident cardio-vasculaire.
- Facile à digérer.

CHAPITRE VI
MATÉRIÉL ET MÉTHODES

1. Le matériel et méthodes des tests phytochimiques

1.1. Le matériel

a) Le matériel végétal :

Notre étude a été réalisée sur les lentilles rouges. Ont été achetés à partir de zone CHELGHOUM LAID, Mila.

- **Lentille rouge :**

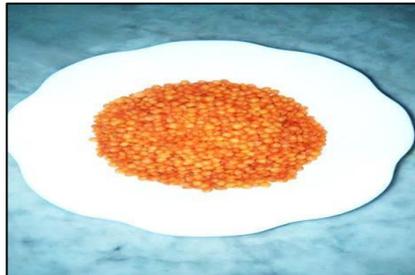


Figure 16 : Photographie de lentille rouge

b) Le matériel biologique :

Notre étude a porté sur les hématies humains prélevées chez des donneurs de sang et sur les hématies animales prélevées du lapin.

1.2. Méthodes :

a) La préparation du poudre :

- **Broyage :** les grains ont été broyés dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre



Figure 17 : Poudre de lentille rouge après le broyage

b) Le principe et technique d'extraction

- **Le principe :**

C'est une opération vise à faire une macération pour récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de plantes à l'aide d'une solution tampon PBS (0,1M pH 7,34).

- **La technique d'extraction :**

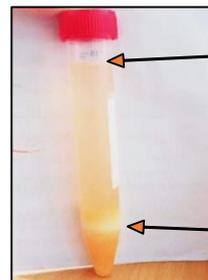


Lentille rouge

Broyage



3g de poudre obtenue à partir de lentille rouge a été mise dans un tube à fond conique contenant chaque'un 10ml du solution tampon PBS (0,1M; pH=7,34) pendant 24h.



Surnageant

Culot

Centrifugation à 5000 tr /min (10 min)

L'extrait brut

Figure 18 : Schéma d'extraction de lectine à partir de lentille rouge

2. L'activité hémagglutinante de l'extrait

2.1. La préparation de suspension d'hématies à 3%

- **Le lavage des hématies :** Le tube contenant une quantité de sang (1,5ml) a été centrifugé à 3000tr/min pendant 5min. Le surnageant résultant est versé et une solution de NaCl 0.9% est ajoutée au culot. Après avoir bien mélangé, le tube est soumis à nouveau à une centrifugation (l'opération a été répétée 3 fois ou plus jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair).
- **La dilution des hématies :** Après avoir terminé le lavage le culot contenant les globules rouges est dilué par une solution saline d'eau physiologique sachant que 1,5ml des hématies dans 48,5ml de NaCl 0.9% afin d'obtenir des hématies à 3%.

2.2. Le test d'hémagglutination

Ce test a été porté sur les hématies du lapin et permet d'affirmer la présence des lectines dans l'extrait. Il se repose sur la capacité des lectines à former un réseau (visible à l'œil nu) avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de surface. En absence d'activité hémagglutinine, les hématies sédimentent par gravité au fond des puits dans chaque puit d'une microplaque.

a) La technique d'hémagglutination :

Dans chaque puit d'une microplaque, 50µl d'extrait brut de lentille rouge a été déposé tout en ajoutant 50µl des hématies du lapin. Après 1h, l'agglutination est observée à l'œil nu.

b) Le test de la limite d'hémagglutination :

- À l'aide d'une micropipette réglée à 50µl, on a déposé un volume de 50µl du tampon phosphate dans chaque puit suivis de 50µl de l'extrait brute qui lui est placé uniquement au niveau du premier puit.
- Le commencement d'une double dilution sérielle (chaque dilution en série réduit la concentration de l'extrait de moitié).
- L'ajout de 50µl des hématies du sang de lapin à 3 % dans tous les puits.

L'observation d'activité hémagglutinante des lectines est déterminée après l'estimation visuelle de l'hémagglutination après 30 à 45min d'incubation à une température ambiante(25C°).

3. L'étude des caractéristiques de l'extrait de lectine

3.1. L'effet de la température sur l'activité agglutinante

a) Le principe :

Dans 5 tubes à essai, contenant chacun une aliquote de 100µl de l'extrait brut de lectines ont été incubés à des températures différentes (40,60,80,90,120°C) dans un bain marie pendant 1h. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à la température ambiante, enfin le test d'hémagglutination a été fait sur les extraits soumis aux différentes températures pour évaluer l'état de l'activité de lectines traités.

b) L'effet de la température sur la limite d'hémagglutination

On implique la méthode de double dilution pour un volume de 50µl du tampon PBS (0,1M pH :7,34) puis 50µl de l'extrait soumis au bain marie et enfin on ajoute 50µl de sang du lapin dans chaque puit.

La lecture est effectuée après 1h d'incubation à température ambiante.

3.2. L'effet du pH sur l'activité agglutinante

a) Le principe :

Dans 9 tubes à essai on verse 0.25g de poudre de lentille corail avec 1ml de tampon PBS à différentes valeurs de pH en allant de (1,36 ; 2 ; 3 ; 4 ; 8,11 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12) avec une macération pendant 24h puis agitation par un vortex, les tubes sont soumis à une centrifugation de 5000tours/min pendant 5min.

b) L'effet de pH sur la limite d'hémagglutination :

Le test est réalisé selon les étapes suivantes :

- Le dépôt d'un volume de 50µl de tampon PBS (0,1M. avec différentes valeurs de ph de PBS) dans tous les puits de la microplaque et pas uniquement au premier.
- L'ajout de 50µl du mélange dans chaque premier puit de la microplaque. Puis, une cascade de double dilution sont effectuées dans les puits suivants (ont respectant les mêmes volumes).
- Enfin, 50µl d'hématies du lapin sont rajoutées à tous les puits.
- La lecture a été effectuée à l'œil nu après 1h d'incubation.

4. L'inhibition d'agglutination par des saccharides

4.1. Le test d'agglutination

Le test d'inhibition de l'hémagglutination (**Goldstein and Poretz, 1986**) est un test rapide et simple. Sert à démontrer la capacité de la lectine d'extrait brut des lentilles à se lier aux différents sucres qui ont la capacité d'inhiber l'agglutination des hématies du lapin.

Pour ce test nous avons utilisé un tampon PBS à pH =7.34 et 8 sucres préparés dans le même tampon (**5 monosaccharides** : Glucose. Galactose. Mannose. Arabinose. Glucosamine HCL et **3 disaccharides** : Maltose. Lactose. Cellebiose).

- Chaque ligne de microplaque contienne un sucre dont le premier puit contient 25µl de solution de saccharides (0,1g/1ml de NaCl 0,9%) (**Annexe01**) (l'étiquetage est nécessaire avant de commencer le travail).
- Faire une cascade de double dilution (on a jeté 25µl de dernier puit pour garder la même concentration).
- L'addition d'un volume de 25µl d'extrait dans tous les puits.
- Une incubation pendant 30min (ce temps permet au lectine de reconnaître le sucre) puis l'ajout de 50µl des hématies du lapin à 3%.

La lecture d'inhibition de l'hémagglutination est lue après 1h du temps à l'œil nu.

Notre témoin négatif été réalisé comme suit : 25µl de PBS +25µl de sucre + 25µl de sang du lapin à 3%.

4.2. Le test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par Les glucides

Ce test permet de connaître le facteur de dilution qui correspond au sucre. Il a été réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination.

- Notre fraction active est diluée dans du tampon phosphate de façon à obtenir la concentration minimale inhibitrice qui correspond au sucre.
- Les solutions saccharides ont été préparés à une concentration initiale de 400mM et de 1mg/ml respectivement dans le tampon PBS.
- 25µl des inhibiteurs sont rajoutés aux premiers puits seulement, puis une gamme des concentrations est réalisée par dilutions.
- Ensuite. Un volume de 25µl de la fraction active est déposé dans chaque puits de la microplaque. Le mélange est incubé pendant une demi-heure à température ambiante.
- Finalement, 50µl d'une suspension d'érythrocytes du lapin à 3% sont ajoutés à chaque puits.

L'observation est faite après une heure à l'œil nu.

5. Le test d'agglutination sur les hématies humains ABO

L'étude a été effectuée sur les antigènes des hématies humains appartenant au système des groupes sanguins ABO pour déduire la spécificité de l'extrait aux groupes sanguins.

a) Le mode opératoire :

Avant de commencer le test on a étiqueté chaque ligne de microplaque par le groupement qui lui correspond puis on a :

- Déposer 50µl de tampon phosphate dans chaque puits suivis de 50µl de l'extrait brut (lentille rouge) qui lui est placé uniquement au niveau du premier puit.
- Commencer une double dilution sérielle à l'aide d'une micropipette réglée à 50µl (chaque dilution en série réduit la concentration de l'extrait de moitié).
- L'ajout de 50µl des hématies de premier groupe du sang humain préparés au part avant.

Après on continue par le même processus de travail les autres groupes sanguins et après 1h on fait l'observation à l'œil nu.

6. La chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G50

6.1. La préparation de la colonne de Sephadex G50 :

- On met 4g de Sephadex en suspension dans un volume bien définie de tampon phosphate (0.1M pH=7.34).
- Le mélange est laissé pendant 48h à température ambiante pour se gonfler, puis il a été coulé dans une colonne.
- Un lavage de gel avec un tampon pH=7.34. Ensuite, 1.5ml du surnageant

d'extrait brut de notre plante a été versé lentement dans la colonne Sephadex G50.

- Les fractions ont été recueillies dans des tubes en verre (4ml dans chaque tube).
- Les fractions ont été lues avec un spectromètre à UV afin de mesurer l'absorbance à 280nm. Puis on a tracé la courbe d'absorbance en fonction des tubes.
- L'extrait récupéré a été testé sur les hématies du lapin pour s'assurer de la présence de l'activité hémagglutinante.

6.2.Le test d'hémagglutination après chromatographie :

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les tubes choisis en raison de la présence des protéines.

Le test est fait comme ça :

Les deux puits de la microplaque contiennent respectivement 50µl d'extrait de la fraction (du 7^{ème} tube puis du 5^{ème} tube) avec 50µl du sang fixé.

La lecture a été effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

CHAPITRE V
RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'étude phytochimique

1.1. Le test d'hémagglutination

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec des globules rouges. Si une solution des hématies est placée dans un puit, la sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puit. 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.

Afin de tester l'activité lectinique de lentille rouge, une activité d'hémagglutination sur des érythrocytes du lapin ont été réalisées.

Tableau 14 : Résultats du test d'hémagglutination de l'extrait brut

	Extrait brut	T (-)
D		
Lecture	++++	---

(+++): Très forte agglutination

T (-): Témoin négatif

La lettre **D** marqué le début de la microplaque de titration.

Les résultats obtenus montrent clairement la présence des lectines glycosylées ayant une activité hémagglutinante sur les hématies du lapin dans l'extrait brut soumis au test.

Au vu de la présence de lectine dans l'extrait brut de lentille rouge, nous allons tester la limite agglutinante pour continuer la suite du travail.

1.2. La limite agglutinante de l'extrait brut de lentille rouge

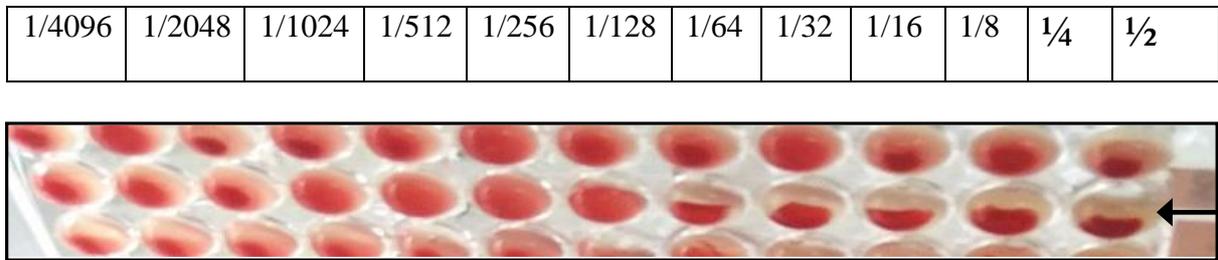


Figure 19 : Limite d'agglutination de l'extrait brut de lentille rouge

Le test de la limite d'hémagglutination a prouvé que l'extrait brut de lentille rouge possède une activité agglutinante performante et assez importante car son limite d'agglutination est à la dilution 1/1024, l'activité hémagglutinante disparaît au niveau du 10ème puits à cause des dilutions effectuées sur l'extrait brut qui a fait l'absence des lectines dans le diluât.

Conclusion : les lentilles rouges possèdent une forte et stable activité lectinique avec les érythrocytes.

2. L'étude des caractéristiques de l'extrait de lectine

2.1. L'effet de la température

Les lectines de lentille rouge ont été subit à un traitement thermique de 40°C à 120°C pendant 1h.

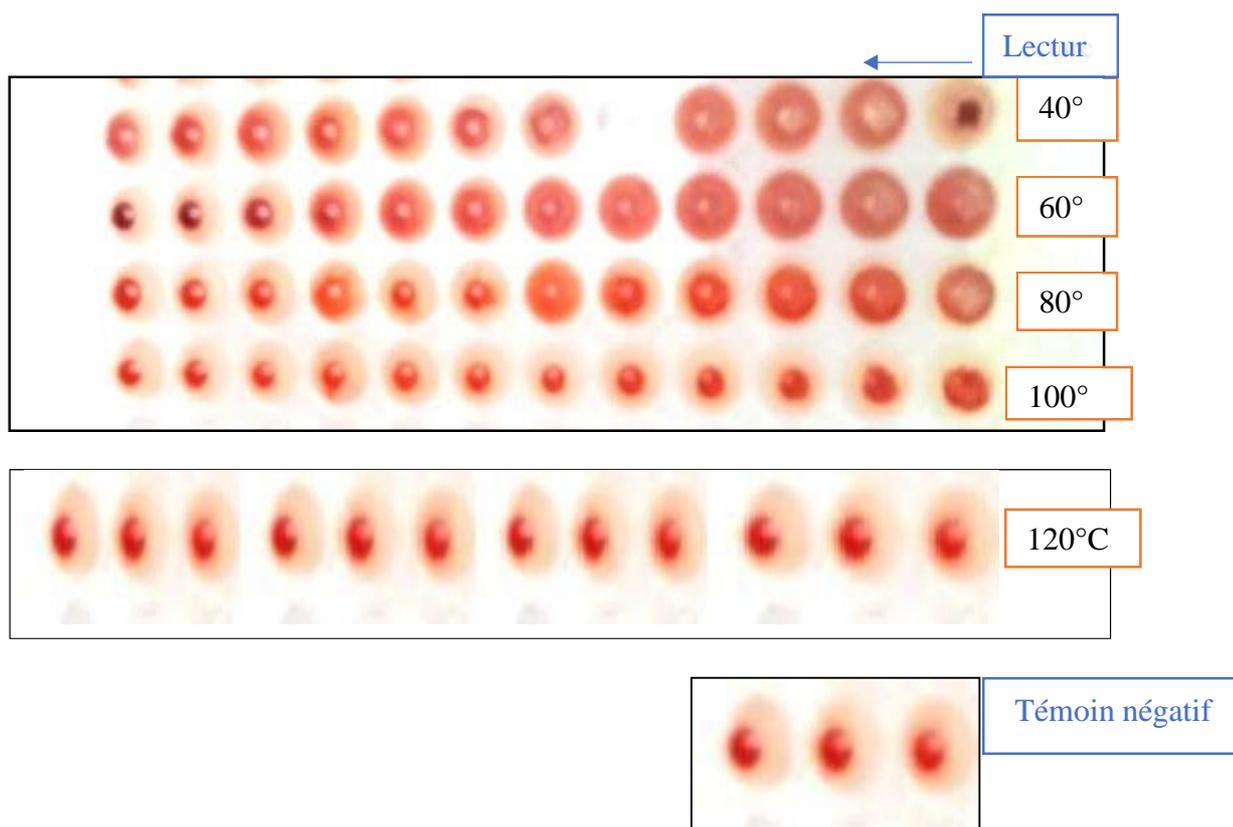


Figure 20 : Limite agglutinante des lectines d'extrait brut des lentilles rouges chauffés à différentes températures pendant 60min

La lectine de lentille rouge stimulé par la température (40°C) atteint une activité maximale d'hémagglutination (**Figure 20**). Elle se maintien jusqu'au neuvième puit. À partir de 60°C Jusqu'à 100°C la température augmente et l'agglutination diminue (commencement de la perte de l'activité hémagglutinante). Au-delà de 100°C la précipitation totale et donc l'absence d'activité hémagglutinante dans l'extrait brut de lentille rouge. (**Tableau 15 et Figure 20**).

Tableau 15 : Tableau représentatif de l'effet de la température sur l'activité agglutinante

Température °C	40	60	80	100	120
Activité agglutinante	++++	+++	++	+	-

++++ : Très forte agglutination

+++ : Forte agglutination

++ : Faible agglutination

+ : Très faible agglutination

- : Précipitation totale

Par une micropipette, on a déposé 3 gouttes du mélange de même puit (du T40°C) sur une lamelle. Le résultat est comme suivant :

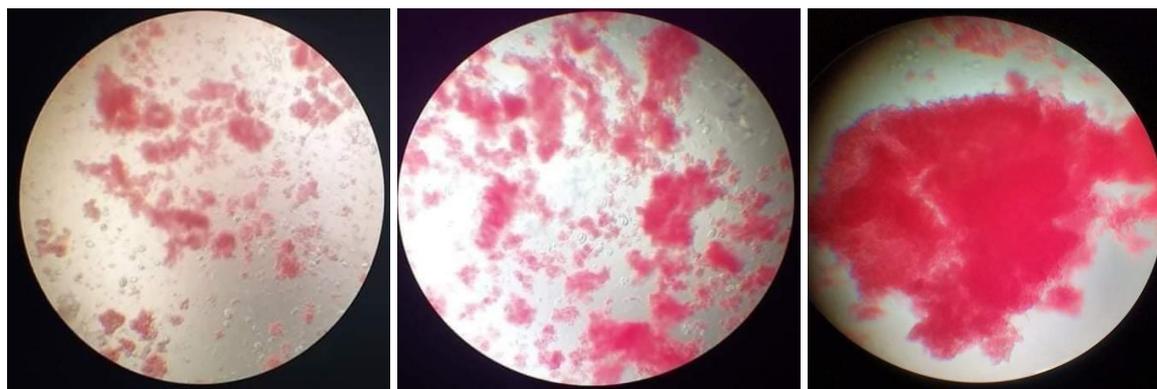


Figure 21 : Présentation microscopique d'activité agglutinante à T (40°C)

Conclusion : la température 40°C est la température optimale pour que la lectine de lentille rouge atteigne son activité maximale. La température 120°C inactive totalement l'activité agglutinante des lectines de lentille. Les lectines sont thermorésistantes car la T100°C n'a été pas capable d'inactiver totalement leur activité agglutinante.

2.2. L'effet du pH sur l'agglutination

Tableau 16 : Effet du pH sur la limite d'hémagglutination d'extrait des lentilles rouges

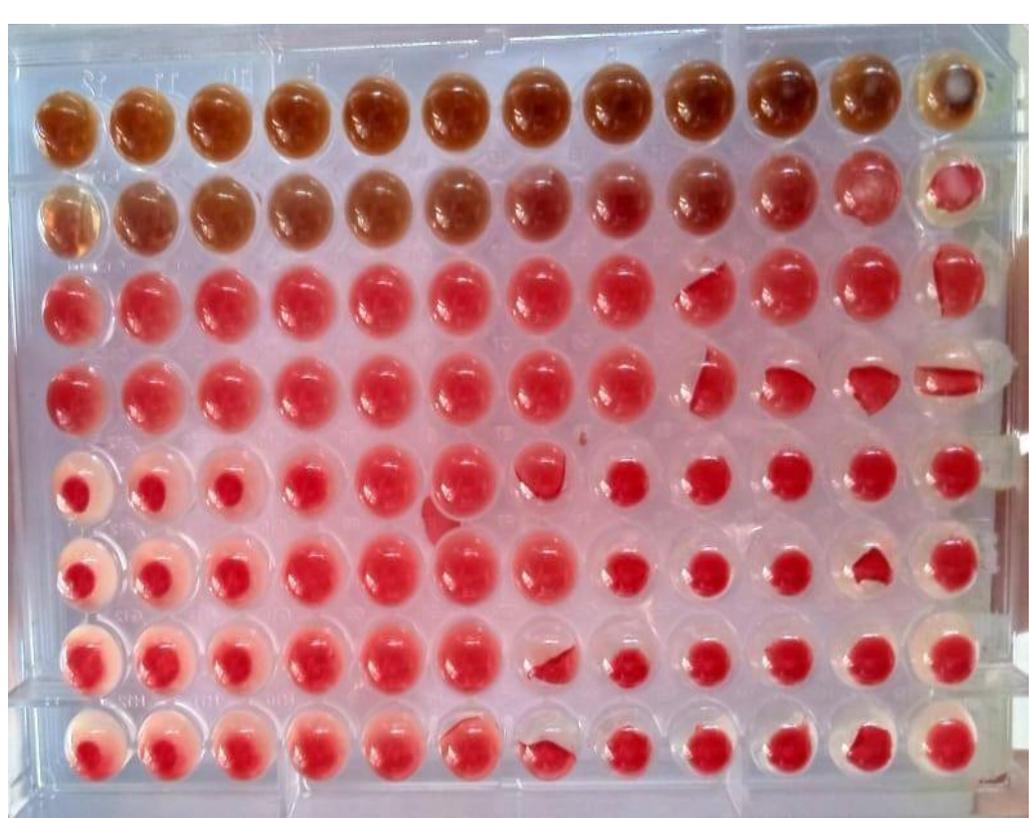
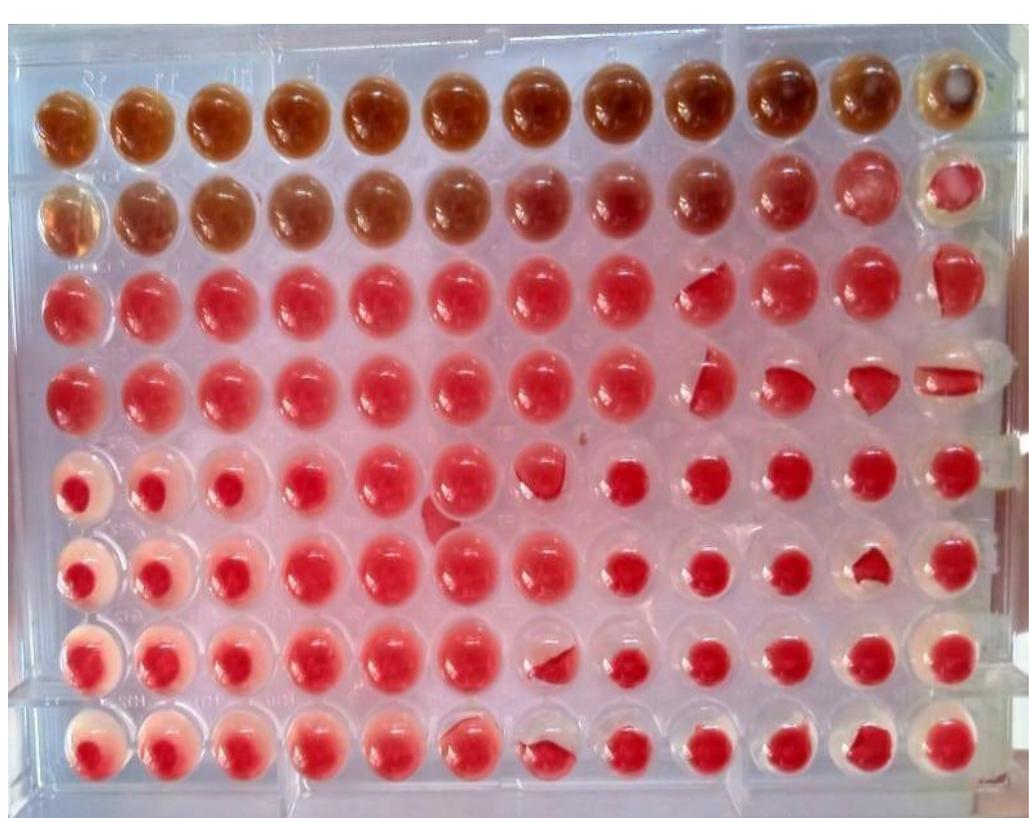
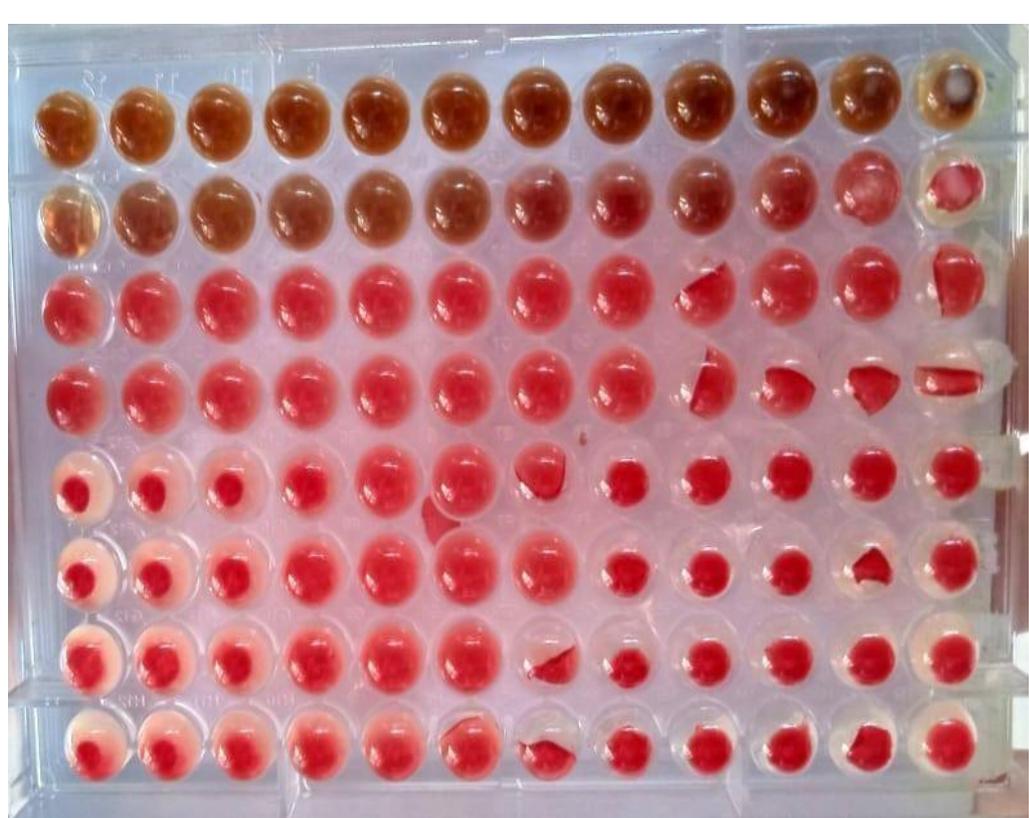
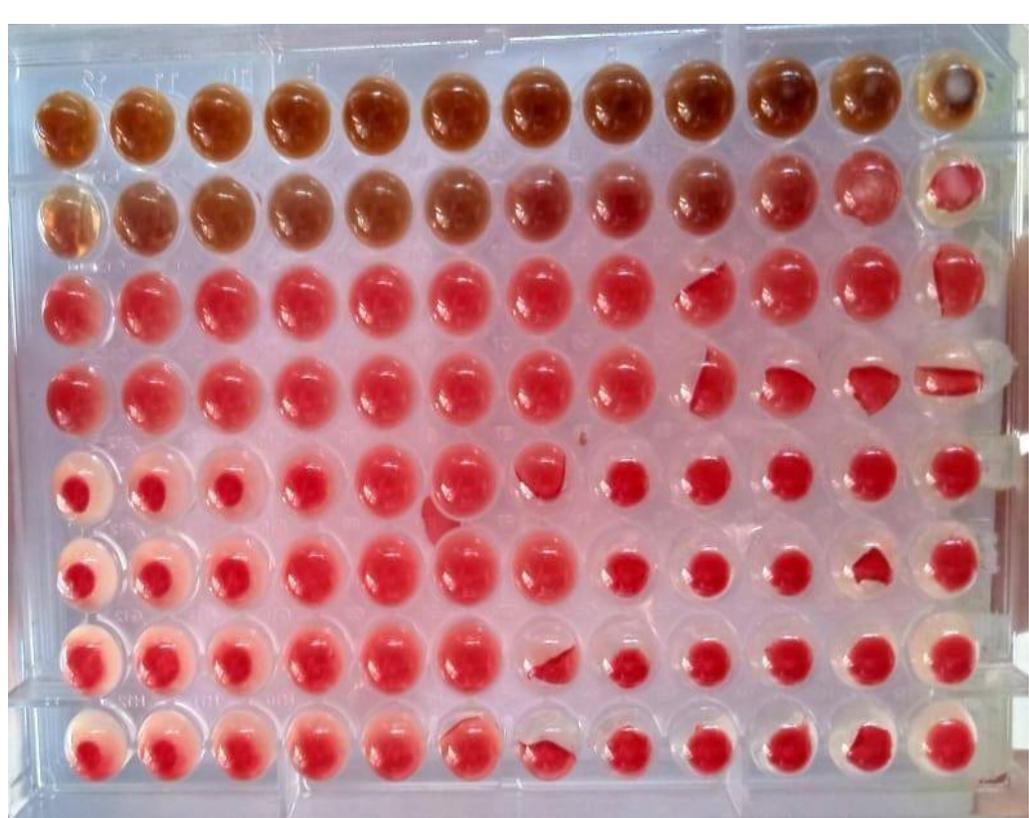
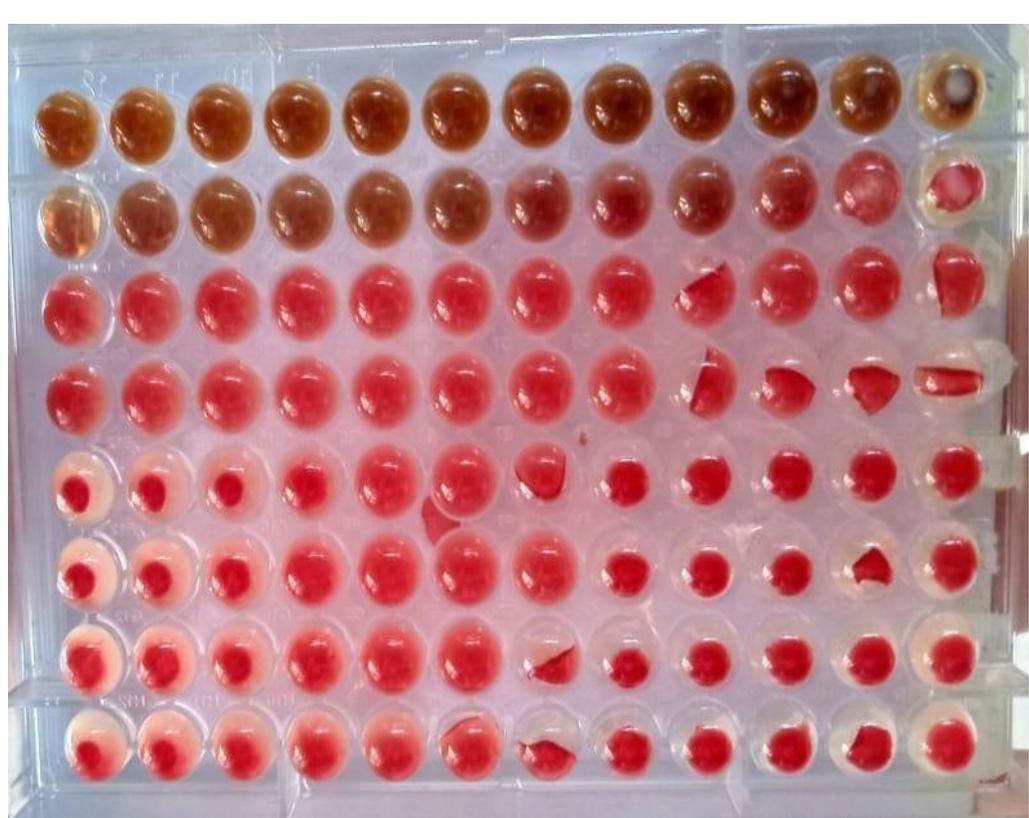
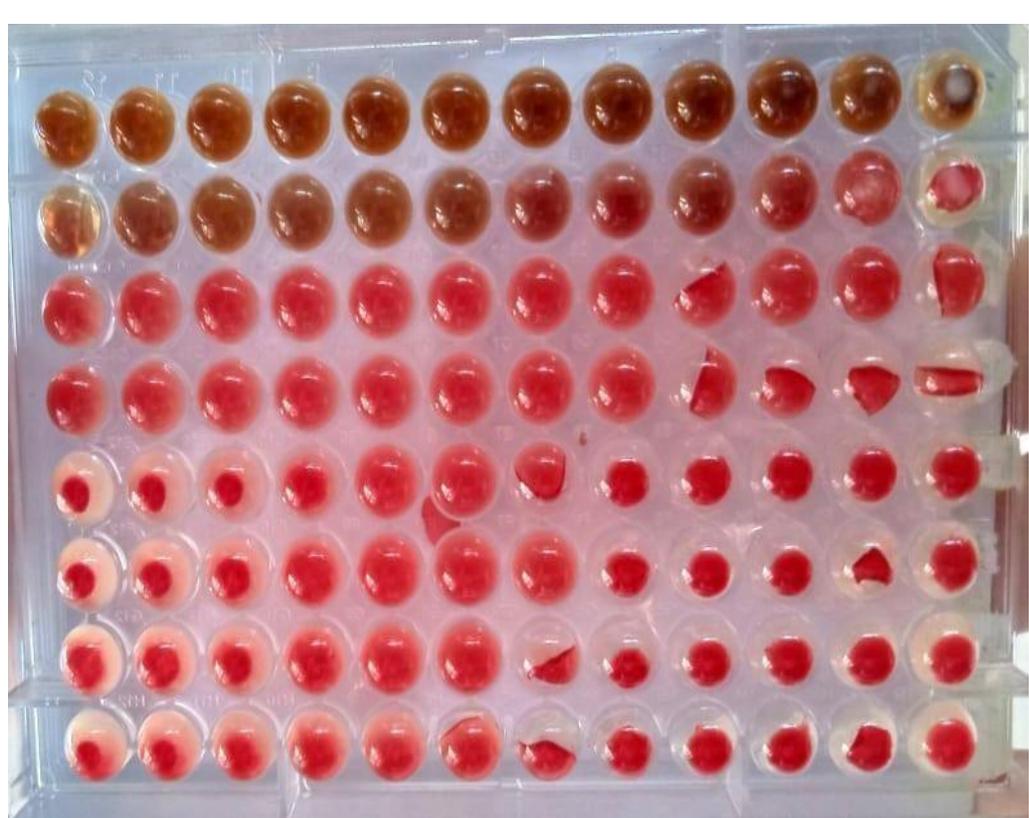
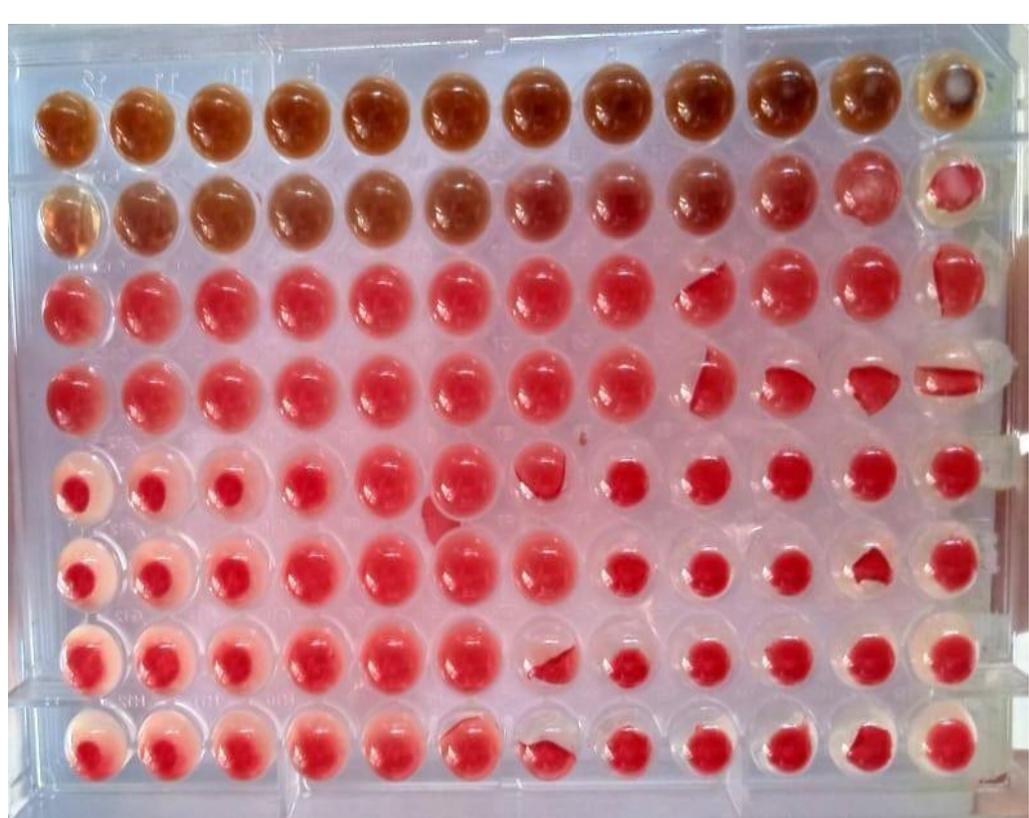
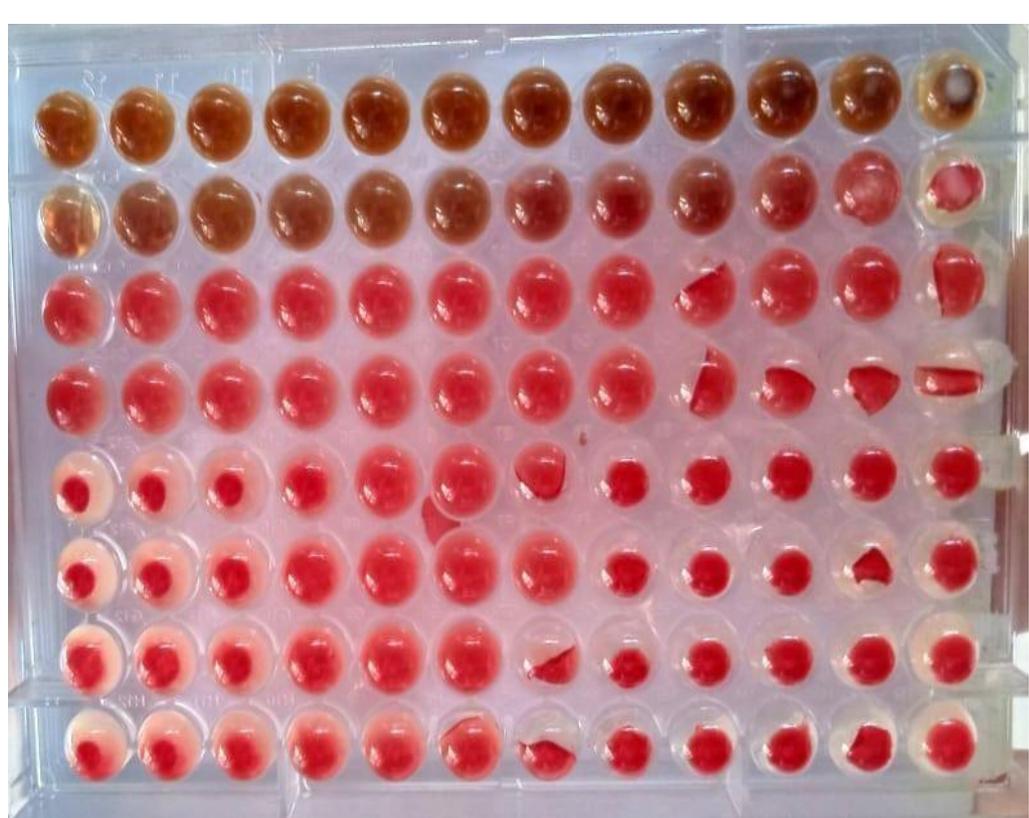
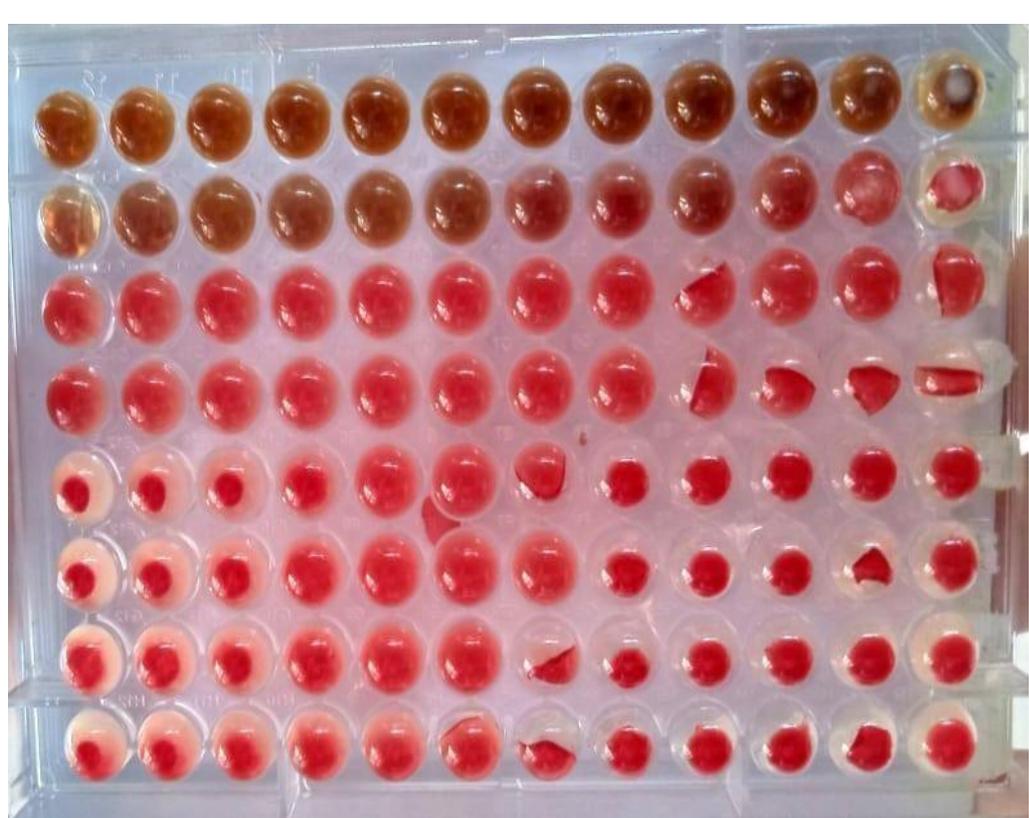
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
pH=1.36												
pH=2												
pH=3												
pH=4												
pH=8.11												
pH=9												
pH=10												
pH=11												
pH=12												

Tableau 17 : Effet du pH sur les résultats d'agglutination d'extrait des lentilles rouges

Ph	1.36	2	3	4	8.11	9	10	11	12
Activité hémagglutinante	-	-	+++++	+++++	++	++	+++	+++	-

(-) : Absence totale d'agglutination.

(++++) : Très forte activité.

(+++) : Forte activité.

(++) : Faible agglutination.

Résultats : La lectine des lentilles rouges révèle une activité lectinique maximale dans l'intervalle [3-4]. Une faible activité apparaît à partir du sixième puits (dilution :1/64) jusqu'auneuvième puits (dilution :1/512) du pH [8.11-11]. Elle diminue au niveau des puits suivants. Alors que dans les pH acide 1,36 ;2 et le pH alcalin 12 elle a perdu leur totale activité (Dans les 12 puits).

Conclusion : ce lectine n'a aucune activité lectinique dans les milieux très acide et alcalin. Mais elle est forte dans l'intervalle de pH compris entre 3 et 4.

3. L'effet d'inhibition de l'activité agglutinante

Tableau 18 : Test d'inhibition d'extrait des lentilles rouges par différents glucides

Sucre	Résultat	Lecture
Mannose		-
Galactose		-
Cellobiose		-
Arabinose		-
Lactose		-
Maltose		+
Glucosamine HCL		-
Glucose		-

- : Absence d'inhibition d'agglutination

+ : Inhibition d'agglutination

3.1. Les résultats du test d'inhibition par les saccharides

Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhiber uniquement avec les disaccharides, plus particulièrement par le maltose. Ceci veut dire que ce dernier est attaché aux lectines puis occupé le site actif censé être occupé par le sucre présent sur la surface cellulaires des érythrocytes, donc ces lectines présentent une affinité pour ce dernier sucre.

L'extrait de lentille rouge ne montre aucune inhibition avec les autres saccharides testés (**Tableau 18**), dans ce cas la lectine va fixer l'hématie plutôt que les l'inhibiteur, donc le résultat est une agglutination (+).

L'inhibition de l'activité agglutinante d'une lectine par les saccharides est due à l'occupation du site ou des sites actifs ou encore appelé **domaine de reconnaissance des glucides** par un ou plus de ces saccharides.

3.2. Les résultats du test de la limite d'inhibition par le maltose

$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
---------------	---------------	---------------	----------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------



Figure 22 : Limite inhibitrice d'agglutination par le maltose sur l'extrait des lentilles rouges

Tableau 19 : Limite inhibitrice d'agglutination par le maltose sur l'extrait des lentilles rouges

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
Limite inhibitrice d'agglutination	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Absence d'inhibition

+ : Inhibition

Les résultats de la limite inhibitrice d'agglutination par le maltose indiquent que l'activité s'arrête dans le 2ème puit (la dilution de 1/4).

4. Le test d'agglutination sur les hématies humains ABO

Ce test montre une agglutination avec tous les groupes sanguins mais les hématies du groupe O manifestent la plus forte activité par rapport aux autres groupements.

Tableau 20 : Test d'agglutination avec les érythrocytes humains

Groupe sanguin	A	O	B	AB
Activité agglutinante				

Conclusion : la lectine de lentille rouge possède une activité agglutinante non spécifique vis-à-vis tous les groupe sanguins (A, B, AB, O).

5. Les résultats d'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de sephadex G50

Tableau 21 : Résultats d'extraction de 80 fractions des lentilles rouges obtenus après chromatographie sur colonne de G50

F : Fraction

V : Volume

Abs : absorbance

F	V	Abs									
1	4ml	0.076	21	4ml	0.126	41	4ml	0.063	61	4ml	0.057
2	4ml	0.083	22	4ml	0.077	42	4ml	0.052	62	4ml	0.057
3	4ml	0.057	23	4ml	0.076	43	4ml	0.052	63	4ml	0.057
4	4ml	0.036	24	4ml	0.088	44	4ml	0.052	64	4ml	0.062
5	4ml	0.203	25	4ml	0.063	45	4ml	0.051	65	4ml	0.055
6	4ml	0.204	26	4ml	0.062	46	4ml	0.051	66	4ml	0.049
7	4ml	0.978	27	4ml	0.055	47	4ml	0.050	67	4ml	0.056
8	4ml	0.203	28	4ml	0.055	48	4ml	0.050	68	4ml	0.056
9	4ml	0.113	29	4ml	0.054	49	4ml	0.050	69	4ml	0.056
10	4ml	0.112	30	4ml	0.067	50	4ml	0.049	70	4ml	0.050
11	4ml	0.079	31	4ml	0.048	51	4ml	0.067	71	4ml	0.072
12	4ml	0.072	32	4ml	0.058	52	4ml	0.052	72	4ml	0.048
13	4ml	0.072	33	4ml	0.052	53	4ml	0.051	73	4ml	0.058
14	4ml	0.110	34	4ml	0.053	54	4ml	0.056	74	4ml	0.058
15	4ml	0.121	35	4ml	0.069	55	4ml	0.048	75	4ml	0.057
16	4ml	0.150	36	4ml	0.056	56	4ml	0.057	76	4ml	0.109
17	4ml	0.201	37	4ml	0.063	57	4ml	0.056	77	4ml	0.050
18	4ml	0.191	38	4ml	0.062	58	4ml	0.057	78	4ml	0.059
19	4ml	0.169	39	4ml	0.053	59	4ml	0.050	79	4ml	0.078
20	4ml	0.143	40	4ml	0.063	60	4ml	0.056	80	4ml	0.080

Afin de pouvoir interpréter les résultats, on a tracé la courbe représentant le profil d'éluion : absorbance à 280nm en fonction du volume d'éluion.

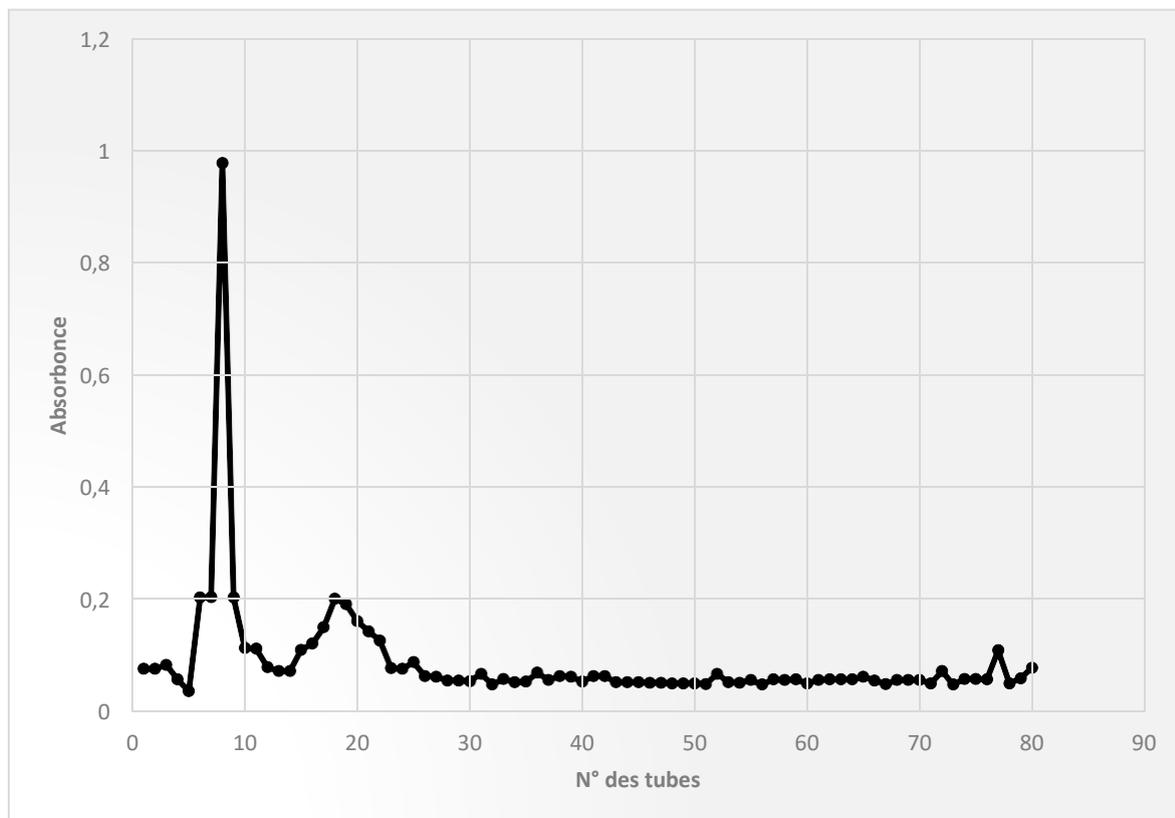


Figure 23 : Courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction du volume d'éluion des différentes fractions protéiques

Éluant était : PBS

(pH= 7, 34)

Absorbance à

280nm

Le volume de rétention : 4ml

L'extraction des lectines à partir d'extrait des lentilles corails est réalisée selon l'absorbance à 280 nm, un seul pic a été observé qui il correspond aux proteïns de hautpoids moléculaire.

Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de 5ème fraction. Un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit dans lechapitre précédent. Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence des lectines avec une forte hémagglutination.

5.1. Le test d'hémagglutination après chromatographie :

D'après la figure 24, nous avons observés une précipitation (résultat négatif) au niveau de la septième fraction ($Abs=0.978$) ceci explique la présence des protéines a des fortes concentrations. Dans la cinquième fraction ($Abs=0.203$) on remarque une légère agglutination des fractions avec les hématies de lapin, donc sont des lectines mais à faible concentration.

(Voir Figure 24)

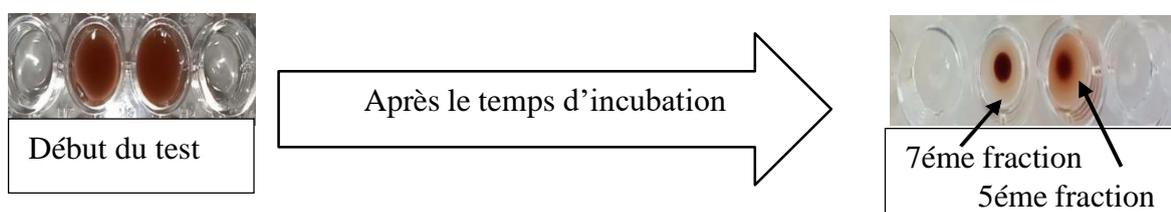


Figure 24 : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les 80 fractions obtenues après purification des protéines

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion :

Nous avons extrait des substances à partir des graines de légumineuses **Lentille rouge**, ces molécules ont une activité agglutinante sur les hématies humaines et les hématies prélevées de lapin, et donc ce qui signifie la présence de lectine.

Les extraits bruts de la **lentille rouge** affichent une activité hémagglutinine forte et stable.

Les lectines isolées de **lentille rouge** montrent une agglutination avec tous les types de groupements sanguins mais avec une forte sélectivité avec les érythrocytes du groupe **O**.

Notre extrait ne présente aucune spécificité pour les saccharides testés, sauf avec le maltose donc il y a une grande affinité entre le maltose et la glycoprotéine de l'extrait.

Les lectines de notre plante sont thermorésistantes et à la température 120°C elles perdent totalement leur activité hémagglutinante.

On déduit que la structure des lectines peut être affectée par le changement de pH dont l'activité agglutinante est optimale à **pH 3** et à **pH 4**.

La purification par chromatographie sur colonne de Sephadex G50 a montré un seul pic pour l'extrait des **lentilles corail**.

Perspectives :

Les travaux que nous avons effectués sont une initiation à de nombreuses autres perspectives, la poursuite des recherches sur ces lectines impliquerait au préalable l'utilisation de plusieurs autres techniques d'analyse biochimique et méthodes permettant de fournir une très bonne caractérisation et purification de ces protéines

Plusieurs axes doivent être menés :

- Purifier la lectine par chromatographie d'affinité, HPLC, et vérifier sa pureté par SDS-PAGE.
- Faire une spectrophotométrie de masse pour déterminer la masse moléculaire et la structure de la lectine, la séquence glucidique pour expliquer les propriétés biologiques de la lectine.
- Étude des propriétés biologiques des lectines in vivo et in vitro :
 - L'activité antioxydant.
 - L'activité immunologique.
 - L'activité anticancéreuse.
 - L'activité antidiabétique...

Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

**Références
bibliographiques**

ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A. The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. Journal of Plant Studies,2014. 35(1): 1927-0461.

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

Baba-Aissa,F.(2000). “Encyclopedie des plantes utiles”, Edition Librairie Moderne- Rouiba, 256-323.

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

Babosha AV (2008) Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. Biochemistry (Mosc) 73: 812-825. 202

Bailly P.,Chiaroni J. Roubinet F. (2015). Les groupes sanguins érythrocytaires, coordonné par. Edit. : John Libbey Eurotext, Paris.

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

Bouchara J-P ,Trouchin G. (2003) .Lectines fongiques et adhérence

In Les Mycoses. ELSEVIER. Paris,167.

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

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

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

BRABANT-HAMONIC JULIETTE. (2004). Tisanes et vieux
remèdes. Édition OuestFrance. Page 24 et page 56.

Chan Y. S., Xia L. et Ng T. B. (2015). A Glucosamine-Specific
Lectin from Green Dragon No. 8 Beans (*Phaseolus vulgaris*). Induced
Apoptosis on Nasopharyngeal Carcinoma Cells. Vol 2015: 1-7

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

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

**Coltri K., Casabona-Fortunato A.S., Gennari-Cardoso M.L.,
Pinzan C.F., Ruas L.P., Mariano V.S., et al.(2006)**. Paracoccin, a
GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to
laminin and induces TNF-alpha production by macrophages.
Microbes Infect 8 (3):704-13.

Crocker, PR. (2002). **Siglecs**: sialic-acid-binding immunoglobulin-

like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 609-615.

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

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

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

Edelman .G.M, Cunningham B.A, Reeke G.N, Becker J.W,

Waxdal M.Jand Wang J.L. (1972) . The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69, 2580-2584.

Edelman GM, Cunningham BA, Reeke GN, Becker JW, Waxdal MJ and Wang .

ERTRAND BERNARD.(2002). Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition .Editions de Terran, 2002.- 128p.- (Collection Le Compagnon Végétal; n01).Paris

Etzler .M.E. (1986). Distribution and function of plant lectins inThe lectin properties

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

FAO. (2016). “Légumineuses Des graines nutritives pour un avenir durable“.13-22,36-37, 51-52

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

Gianluca Cioci. ETUDE STRUCTURE-FONCTION DE GLYCOCONJUGUES ET DE LECTINES BACTERIENNES ET FONGIQUES. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. fftel-00081084f

Gilboa-Garber N., Katkoff D.J., Garber N.C. (2000). // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* V. 29: 53-57.

Gordts, S.C., Renders, M., Ferir, G., Huskens, D., Van Damme, E.J., Peumans, W., Balzarini, J., Schols, D 2015. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (6), 1674e1685 manitoba.

Hammarstrom S., Murphy L.A., Goldstein I.J., and Etzler M.E. (1977).Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: *Helix pomatia*Ahemagglutinin, soy bean agglutinin, *Lima bean* lectin and *Dolichos biflorus* lectin.

Biochemistry.16 (12): 2750-2755.

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

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

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

Imberty 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.

Imberty, A., & Varrot, A. (2008). Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(5), 567–76.

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

Javadekar V.S., Sivaraman H., Sainkar S.R., Khan M.I. (2000). A mannose-binding protein from the cell surface of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3528): its role in flocculation. *Yeast*;16(2):99–110

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.

Karoline Saboia Aragão. Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. fftel00385711f

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

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

Kuku A., Kayode A. F. et Akintola A. (2005). Purification and characterization of lectin from the seeds of *Psophocarpus palustris* .*Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(12):1667-1671.

Leffler H , Carlsson S, Hedlund M, Qian Y and Poirier F. (2004).

Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433-440

Lefrere JJ, Berche P (2010) [Karl Landsteiner discovers the blood groups]. *Transfus Clin Biol* 17: 1-8.

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 biologieand medicine. Academic Press INC. London LID. pp 13-24.

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

M(1957) Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. Ann Med Exp Biol Fenn 35: 1-133.

Makela O (1957). Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds, Ann Med Exp.Biol.Suppl, P11-35.

Mazoyar,M.(2002). “ Larousse Agricole :le Monde agricole au XXIe siècle”. Edition Mathilde majorel assistéede Nora Schott Thierry olivaux :dossiers < et < .p316-320.

Meite A,Kauame .K.G,Kati-CoulibalS. (2006). Substances anti nutritionnelles. Méd.Nut 42(4), 179-187.

Min W., Dunn A.J. et Jones D.H. (1992). Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. The EMBO Journal vol. 11 (4): 1303 – 1307

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

6611.

N. Garber, U. Guempel, N. Gilboa-Garber and R.J.

Doyle, FEMS Microbiol. Lett. **48**, 331-334 (1987).

Peumans W. J. and Damme E. J. M. V. (1995) Lectins as plant defense proteins. *PlantPhysiol.* **109**, 347-352.

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

PeumansWJ ,Vandamme JM. (1995).lectine as plant defenseproteins. *Plant Pharmacol* **380(6)** : 509-521.

Pramanik T. et Pramanik S. (2000). Distribution of ABO and Rh blood groups in Nepalese medical students: a report. *East Mediterr Health J.* 6(1):156-8

Q.,Napimoga M. H. (2009) Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential antiinflammatoryand analgesic effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379(6)**:609-616.

Radak, Z., 2005. The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65 (6), 487e493

RAMATA N. (2010). Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de *Abrus precatorius* L. la Faculté de Médecine, de

Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako.
PP 8-24.

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

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

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

Ryder SD, Jacyna MR, Levi AJ, Rizzi PM, Rhodes JM (1998) Peanut ingestion increases rectal proliferation in individuals with mucosal expression of peanut lectin receptor. Gastroenterology 114: 44-49.

Sabóia Aragão K., Thèse. (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum* Univ.J.F., Grenoble, 125p.
salina. *Bioresour Technol* **101 (2):** 794-798.

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 -prism fold. Nature Struct. Biol., 3, 596-603.

Santos A. F. S., da Silva M. D. C., Napoleão T. H., Paiva P. M. G., Correia M. T. S. et Coelho L. C. B. B. (2014). Lectins: Function,

structure, biological properties and potential applications. Vol.15: 42
– 62

Sharon N (2008) Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 36: 1457-1460.

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

Sharon, N., & Ofek, I. (2000). Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconjugate Journal*, 17(7-9), 659–664.

Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H.,

Bnouham, M., Ziyat, A., 2000. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 73 (1e2), 95e100.

Teixeira C.R., Cavassani K.A., Gomes R.B., Teixeira M.J., Roque-Barreira M.C., Cavada B.S., da Silva J.S., Barral A., Barral-Netto M. (2006). Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine.* 24(15): 3001-3008.

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

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

Valadez-Vega C., Guzmán-Partida A. M., Javier Soto-Cordova F., Álvarez-Manilla G. et al ;(2011). Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules*.16: 2561-2582.

Van Damme EJ, Lannoo N, Fouquaert E, Peumans WJ (2004) The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconj J* 20: 449-460.

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

Wang Q, Yu LG, Campbell BJ, Milton JD, Rhodes JM (1998) Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet* 352: 1831-1832.

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

Wiley, D. C., & Skehel, J. J. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 365–94.

Woodley JF (2000) Lectins for gastrointestinal targeting--15 years on. *J Drug Target* 7: 325-333.

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.

Wright C.S. (1980). Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* 141: 267-291.

Wu AM, Sugii S, Herp A. (1988). A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, 819-847.

Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao Y R B I W J, Zhao X F , Wang J X L.(2014).Type lectin from the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 2014. 44, 397–405.

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.

zui fujimoto,hiroki tatenno, jun hirabayashi. (2014)Lectin structures : classification based on the 3-D structures *1200:579-606.*

Annexe

Annexe01 : Préparation du Tampon, Saccharides et l'Nacl

- Préparation de 1000ml du Phosphate Buffered Saline (PBS) (0.1M, pH=7.34) pour l'extraction des lectines :

Réactifs	Concentration	Quantité
Phosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	8Mm	1.423g
Phosphate de monopotassium (KH ₂ PO ₄)	1.5mM	0.204g
Chlorure de sodium (Na Cl)	137mM	8.006g
Chlorure de Potassium (KCl)	2.7mM	0.201g
Eau distillée	/	1L

- Les solutions de la titration :

HCl (0.1 M)
NaOH (0.1 M)

- Préparation du NaCl à 0.9% :

Chlorure de Sodium (NaCl)	18g
Eau distillée	2L

- Préparation des saccharides (400mM) :

Sucre	Concentration
Glucose	0.07206
Galactose	0.07206
Glucosamine HCl	0.08625
Arabinose	0.06005
Mannose	0.07206
Cellebiose	0.13692
Maltose	0.144128

Annexe02 : Préparation du gel pour la chromatographie sur colonne

Sephadex G50	4g
PBS	100ml

Annexe03 : Résultats de mesure après absorbance à 280nm des lentilles rouges

Fraction	Absorbance à 280nm
1	0.076
2	0.083
3	0.057
4	0.036
5	0.203
6	0.204
7	0.978
8	0.203
9	0.113
10	0.112
11	0.079
12	0.072
13	0.072
14	0.110

15	0.121
16	0.150
17	0.201
18	0.191
19	0.169
20	0.143
21	0.126
22	0.077
23	0.076
24	0.088
25	0.063
26	0.062
27	0.055
28	0.055
29	0.054
30	0.067
31	0.048
32	0.058
33	0.052
34	0.053
35	0.069
36	0.056
37	0.063
38	0.062
39	0.053
40	0.063
41	0.063
42	0.052
43	0.052
44	0.052
45	0.051
46	0.051
47	0.050

48	0.050
49	0.050
50	0.049
51	0.067
52	0.052
53	0.051
54	0.056
55	0.048
56	0.057
57	0.056
58	0.057
59	0.050
60	0.056
61	0.057
62	0.057
63	0.057
64	0.062
65	0.055
66	0.049
67	0.056
68	0.056
69	0.056
70	0.050
71	0.072
72	0.048
73	0.058
74	0.058
75	0.057
76	0.109
77	0.050
78	0.059
79	0.078
80	0.060

Matériels techniques et produits chimiques utilisés :

- **Matériels de laboratoires :**

- * Bécher
- * Cuve
- * Eprouvette gradué
- * Entonnoir
- * Etiquettes
- * Embouts (jaune + bleu)
- * Erlenmeyer
- * L'ente-goutte
- * Lame et lamelle
- * Micropipettes
- * Microplaques
- * Tubes à essai
- * Tubes à fond conique
- * Tubes en verre
- * Portoirs
- * Pissette en plastique

- **Appareillage :**

- * Bain marie
- * Agitateur
- * Centrifugeuse
- * Spectromètre
- * pH mètre
- * Réfrigérateur
- * Vortex
- * Microscope

- **Produits chimique :**

- * L'eau distillée stérile