



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et
populaire



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : **Biochimie**

قسم : الكيمياء الحيوية

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**

Intitulé :

***Purification et caractérisation partielle des
lectines de la noix de muscade
(Myristicaceae)***

Présenté et soutenu par : **RAHIL Tawfik**

Le : 23 / 09 /2021

SEBAHI Ala eddine

Jury d'évaluation :

Président du jury : **Necib .Y** Professeur – UFM Constantine

Encadreur : **Zitouni .A** Maitre de Conférence UFM Constantine

Examineurs : **Boulahrouf .K** Maitre-assistant - UFM Constantine

***Année universitaire
2020 - 2021***

REMERCIEMENTS :

Tout d'abord nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience nécessaire pour l'accomplissement de ce modeste travail.

C'est avec un très grand honneur que nous préservons cette page en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Monsieur Zitouni .A professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine. Pour ses orientations et ses conseils et l'attention qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail. Mais aussi pour toute la compréhension qu'il a montré envers nous ,la disponibilité et la patience , la simplicité et la sympathie dont il a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, pour sa gentillesse, ses conseils précieux et ses encouragements qu'il nous a prodigués tout au long de ce mémoire ,nous avons vraiment eu de la chance d'avoir eu à travailler avec lui.

C'est aussi avec un grand plaisir que nous remercions Monsieur NECIB.Y Professeur au département de Biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de ce mémoire.

Nous voudrions également adresser un grand merci à Mdm Imane et à Mdm Sana tout deux doctorantes au niveau du laboratoire Génie microbiologique et applications pour leur grande aide, Leur confiance, Leur générosité et leur énorme soutien tout au long de notre travail.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres de notre jury de mémoire. C'est un grand honneur pour nous que vous ayez accepté de présider notre jury de mémoire. Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs précieux conseils.

MERCI



DÉDICACES

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

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas, la couronne sur ma tête et le bonheur de ma vie, ma mère qui m'a apporté son appui durant toute ma vie, pour ses sacrifices et son soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.

A mon père :

J'ai toujours trouvé auprès de toi, Compréhension et soutien. Tes prières et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Trouve à travers ce modeste travail, récompense de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.

A mon grand frère : ABDEL GHANI ; Qui a toujours su m'inspirer, Me guider et me conseiller.

A mon frère : RABAH ; Qui n'a jamais hésité à jouer le rôle du grand frère.

A mes très chères sœurs qui m'aider et me soutenir malgré la distance.

A toute ma famille RAHIL ; FILALI.

A mes neveux et mes nièces, Les plus beaux anges sur terre.

A mon oncle ABDEL AZIZ, MAHMOUDE, Qui ont été un vrai père pour moi.

A mes cousins : SOUFIAN, MOUHAMED

A mes très chers amis : NASSER Edinne, MOUADE, WALIDE, ZAKI,
MOUHAMED, ABDEL HAMID, AYMEN

Un énorme merci à vous pour votre soutien, Votre aide et votre affection sans retenue.

Un merci particulier à mon amie, Mon partenaire, ALA EDINNE qui sans-lui ce travail n'aurait pas été aussi réussi, Avec son sérieux, Sa discipline, Sa détermination mais aussi ses colères, Aussitôt suivi de son sourire et de sa bonne humeur.

TAWFIK

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

A mon père ALLAH yarahmou qui restera toujours présent dans mon coeur.

A ma mère : Celle qui m'as soutenue jusqu'au bout, Et dont je n'oublierais jamais ces innombrables sacrifices.

A mes chers frères : Raouf, Kouceila, Khalil, Qui ont toujours été là pour moi.

ALA EDDINE

Résumé

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, Multivalentes de nature non-immunitaires qui sont capables de reconnaître et se lier spécifiquement et de manière réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexes sans modifier la structure covalente des ligands glycosylés reconnus, qui provoquent dans certains cas l'agglutination des érythrocytes.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans la noix de muscade (*Myristicaceae*), Pour cela ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs testes afin d'y rechercher une activité hémagglutinante suivi par un test de limite de cette dernière.

Avant l'étude des propriétés de nos lectines une purification des protéines a été réalisée par chromatographie sur gel de Séphadex G50, Puis une lyophilisation a été réalisée aux 2 fractions obtenues de cette dernière qui ont une activité hémagglutinante.

Ces protéines qui ont étaient extraites sont soumises à différents tests de propriétés, qui nous ont permis de nous rendre compte de la stabilité de leur pHi qui est compris entre la gamme ph 3 à ph 10, Leur très bonne thermo-stabilité qui malgré des températures extrêmes (de 20°C jusqu'à 120°C) cela n'était pas suffisant pour leur inactivation.

Un test d'inhibition a été aussi réalisé par la suite avec différents sucres, Glycoprotéines et métaux qui a montré pour ces derniers une spécificité pour le glutamine Hcl, Le saccharide sodique (sucres) et le BSA (Glycoprotéine). Avec une forte inhibition obtenue par l'addition de chlorure de sodium, Potassium et de chlorure d'aluminium (Métaux).

Un autre test d'agglutination des hématies humaines (Système ABO) avec nos lectines montre que ces protéines n'agglutinent avec aucun type de groupe sanguin humain.

Mots clés : Lectines; Activité hémagglutinante; Inhibition; Purification; Système ABO.

Abstract :

Lectins are multivalent ubiquitous proteins or glycoproteins of non-immune nature that are capable of specifically and reversibly recognizing and binding to carbohydrate moieties of complex carbohydrates without altering the covalent structure of recognized glycosylated ligands, which cause in some cases the agglutination of erythrocytes.

The purpose of this work is to look for the presence of lectins in nutmeg (*Myristicaceae*), For this purpose these proteins were extracted and subjected to several tests in order to look for a hemagglutinating activity followed by a limit test of it.

Before the study of the properties of our lectins a purification of the proteins was carried out by Sephadex G50 gel chromatography, then a freeze-drying was carried out to the 2 fractions obtained from the latter that have haemagglutinous activity.

These proteins that were extracted are subjected to different tests of properties, which allowed us to realize the stability of their pHi which is between the range of ph 3 to ph 10, Their very good thermo-stability that despite extreme temperatures (from 20°C to 120°C) it wasn't enough for their inactivation.

A test of inhibition was also carried out subsequently with different sugars, glycoproteins and metals which showed for the latters a specificity for glutamine Hcl, sodium saccharide (sugars) and BSA (glycoprotein). With strong inhibition obtained by the addition of sodium chloride, potassium and aluminum chloride (metals).

Another human red blood cell agglutination test (ABO system) with our lectins shows that these proteins do not agglutinate with any type of human blood group.

Keywords: Lectins; Hemagglutinating activity; Inhibition; Purification; ABO system.

ملخص

الليكتينات عبارة عن بروتينات متعددة الوجود أو جلايكوبروتينات ذات طبيعة غير مناعية قادرة على التعرف على الكربوهيدرات المعقدة من الكربوهيدرات المعقدة على نحو محدد وقابل للانعكاس، دون تغيير البنية التساهمية لرابطات الغليكوزيالت المعترف بها، والتي تسبب في بعض الحالات تراس الكريات الحمراء.

والغرض من هذا العمل هو البحث عن وجود الليكتينات في جوزة الطيب (*Myristicaceae*). ولهذا الغرض تم استخراج هذه البروتينات وإخضاعها لعدة اختبارات من أجل البحث عن نشاط لتخثير الدم يعقبه اختبار الحد لهذه الأخيرة.

وقبل دراسة خصائص الليكتينات، أجريت عملية تنقية للبروتينات بواسطة الكروماتوغرافيا G50 سيفاديكس، ثم أجريت عملية تجفيف تجميدية للكسرين التي تم الحصول عليهما من هذه الأخيرة والذي لهما نشاط تخثيري للدم.

وتخضع هذه البروتينات التي تم استخراجها لاختبارات مختلفة للخواص، وهو ما سمح لنا بمعرفة استقرار درجة حرارة هاته الأخيرة وpHi الذي يتراوح بين 3 و10 pH، وأيضا معرفة استقرارها الحراري الجيد للغاية إذ أنه على الرغم من درجات الحرارة القصوى (من بين 20 درجة مئوية إلى 120 درجة مئوية) لم يكن هذا كافياً لتوقيفها.

كما أُجري اختبار تثبيط في وقت لاحق مع السكريات، الغليكوبروتينات والمعادن المختلفة التي أظهرت لهذه الأخيرة خصوصية للغلوسامين HCl و سكاريد الصوديوم (سكريات) و BSA (غليكوبروتين). مع عرقلة قوية تم الحصول عليها عن طريق إضافة كلوريد الصوديوم والبوتاسيوم وكلوريد الألومنيوم (معادن)

أجري اختبار آخر لتخثر خلايا الدم الحمراء البشرية (نظام ABO) مع الليكتينات و بين أن هذه البروتينات لا تتكثل مع أي نوع من مجموعات الدم البشرية.

الكلمات الرئيسية: الليكتينات ؛ نشاط الهيماغلوطين ؛ الكبح ؛ التنقية ؛ نظام ABO .

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les lectines

Les lectines

1. Définition :	1
2. Historique :	2
3. La structure des lectines :	5
3.1 - Les lectines simples :	5
3.2 - Les lectines en mosaïques :	6
3.3 - Les assemblages macromoléculaires :	6
4. Structure tridimensionnelle :	7
5. Spécificité et affinité des lectines :	7
5.1 - Les sites de liaisons des lectines :	9
5.2 - L'inhibition des lectines par des glucides :	10
6. Classification et distribution des lectines dans le monde vivant :	10
6.1 - Chez les animaux :	11
6.1.1 - Les lectines extracellulaires :	11
6.2 - Chez les plantes :	12
6.2.1 - Les mérolectines :	12
6.2.2 - Les hololectines :	12
6.2.3 - Les chimérolectines :	12
6.2.4 - Les superlectines :	13
6.3 - Lectines de microorganismes :	13

6.3.1 - Les lectines bactériennes :.....	14
6.3.1.1 - Les lectines fimbriales :	14
6.3.1.2 - Les toxines :	15
6.3.1.3 - Les lectines solubles :	16
6.3.2 - Les lectines de champignons :.....	16
6.3.2.1 - Caractéristique des lectines de champignons :.....	17
6.3.2.2 - Le rôle des lectines de champignons :	17
7. Propriétés des lectines :	18
7.1 - Les propriétés biologiques des lectines :	18
7.1.1 - L'interaction lectine–glucide :.....	18
7.1.2 - Agglutination des cellules :	19
7.1.3 - Activité mitogène :	19
7.2 - Les propriétés médicinales des lectines :	19
7.2.1 - La propriété antibactérienne :.....	19
7.2.2 - La propriété antivirale :	20
7.2.3 - La propriété anticancéreuse :.....	20
7.2.4 - La propriété antifongique :.....	20
7.2.5 - La propriété immunomodulatrice :	20
8. Les utilisations et les applications des lectines :.....	21
8.1 - Dans le domaine biomédical :.....	21
8.1.1 - Hématologie :	21
8.1.2 - Immunologie :	21
8.1.3 - Biologie cellulaire :	21
8.1.4 - Cancérologie :.....	22
8.2 - En biochimie et protéomique :.....	23
8.3 - Dans le domaine agronomique :	23
9. Le rôle de lectines dans l'immunité :	23

Chapitre II : Le système sanguin

Les groupes sanguins

1. Historique :.....	25
2. Le système ABO :	25

3. Facteur rhésus :.....	26
4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO :.....	26
5. Détermination du groupe sanguin :	27

Chapitre III : Généralité sur la noix de muscade

1. Introduction à la noix de muscade :.....	28
2. Historique :.....	28
3. Description botanique :.....	28
4. Classification scientifique :.....	30
5. Propriétés pharmacologiques :	30

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel	31
1.1 - Matériel végétal :	31
1.2 - Matériel animal :	31
1.3 - Le protocole expérimental :	31
2. Méthode :	38
2.1 - Préparation de l'extrait brut :.....	38
2.1.1 - Préparation de noix :	38
2.1.2 - L'extraction des lectines par la solution tampon :	38
2.2 - Dosage des protéines :.....	38
2.3 - Le test d'hémagglutination :	39
2.3.1 - La Préparation des hématies à 3% :.....	39
2.3.1.1 - Lavage des hématies :	39
2.3.1.2 - La dilution des hématies :.....	39
2.3.2 - La technique d'hémagglutination :	39
2.3.3 - Le teste de la limite d'hémagglutination :	39
2.4 - Précipitation au sulfate d'ammonium :	40

2.5 - Dialyse :	41
2.6 - La chromatographie par filtration sur gel (Séphadex G50) :	42
2.7 - lyophilisation :	42
2.8 - Etude les propriétés des lectines :	43
2.8.1 - La technique d'héماغglutination :	43
2.8.2 - Le teste de la limite d'héماغglutination :	43
2.8.3 - Test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides, glycoprotéines, Et des métaux :	43
2.8.4 - L'effet de la température sur l'agglutination :	45
2.8.5 - L'effet du pH sur l'héماغglutination :	45
2.8.6 - Le test d'agglutination sur les héματος humaines ABO :	45

Chapitre V : Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Le test d'agglutination :	47
2. Dosage des protéines pour l'extrait brut :	48
3. Test de la limite d'héماغglutination :	48
4. Précipitation des lectines au sulfate d'ammonium :	50
5. La Chromatographie sur colonne de sephadex G50 :	53
6. Résultats de la lyophilisation	55
7. Le test d'activité héماغglutination de l'extrait lyophilisé :	56
8. Test d'inhibition d'héماغglutination par les saccharides, glycoprotéine, Et les métaux : ..	56
9. Effet de température sur l'héماغglutination :	61
10. Effet de pH sur l'héماغglutination :	63
11. Le test des héματος humaines ABO :	66

Conclusion et perspectives

Références bibliographique

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanavale A de canavalia ensiformis en complexe avec le tri mannoside (Lenka, 2006).....	5
Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al, 2006).....	6
Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'E-coli.	7
Figure 4 : Représentation schématique d'une interaction lectines-glucides.....	10
Figure 5 : Classification des lectines végétales proposée par Peumans et Van Damme	13
Figure 6 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R)	15
Figure 7 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995).....	15
Figure 8 : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire.....	18
Figure 9 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (Parham,2000).	26
Figure 10 : Représentation schématique de la plante et de la noix de muscade sous ses différents stades.....	29
Figure 11 : Schéma explicatif de la procédure expérimentale.	37
Figure 12 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de la noix de muscade.	47
Figure 13 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction des tubes des différentes fractions protéiques.	54
Figure 14 : Poudre obtenue après lyophilisation.....	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques lectines importantes	2
Tableau 2 : l'historique de découverte des lectines.	3
Tableau 3 : La Spécificité osidique des lectines de certaines plantes (Barcate,2016).	9
Tableau 4 : Quelques lectines et leur origines (Karoline S.A, 2008).....	11
Tableau 5 : Lectines bactériennes solubles.....	16
Tableau 6 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994).....	17
Tableau 7 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (Murdockl .L Shade R.E, 2002).....	22
Tableau 8 : Les Lectines spécifiques des groupes sanguins	27
Tableau 9 : Classification scientifique de la noix de muscade	30
Tableau 10 : Tableau de pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C.....	41
Tableau 11 : Tableau des saccharides et glycoprotéines du test d'inhibition de l'hémagglutination.....	44
Tableau 12 : Résultats d'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut de la noix de muscade	47
Tableau 13 : Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration :.....	48
Tableau 14 : Résultats du test de limite d'hémagglutination de l'extrait.	48
Tableau 15 : concentration des protéines en fonction des dilutions en (mg/ml) à 280nm et 260nm	50
Tableau 16 : Résultats du test de la limite de differentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait.	51

Tableau 17 : évaluation de la concentration des protéines présents dans la fraction la plus active de précipitation.	52
Tableau 18 : l'absorbance en fonction de volume d'élution.	53
Tableau 19 : Représentation d'agglutination des fractions actives.	54
Tableau 20 : Résultats du test d'activité hémagglutination de l'extrait lyophilisé.	56
Tableau 21 : Résultats du test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les saccharides.	56
Tableau 22 : Résultats du test de la limite d'inhibition des lectines de l'extrait avec les sacharides et glycoprotéines.	58
Tableau 23 : Résultats du test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les métaux.	59
Tableau 24 : Résultats du test de la limite d'inhibition des lectines de l'extrait avec les métaux.	59
Tableau 25 : Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination	61
Tableau 26 : Résultats du test de l'effet de pH sur l'activité hémagglutinante.	63
Tableau 27 : Résultats du test d'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait lyophilisé de la noix de muscade.	66

Liste des abréviations

A : Absorbance

BAS : Bovine Albumin Serum

ConA : Concanavaline A lectin

CRD : site de liaison aux hydrates de carbones (Carbohydrate Recognition Domain)

DO : Densité optique

E-coli : Escherichia coli

ELLA : Enzyme Linked Lectin Assay

Fuc : L-fucose

Gal : galactose

Gal, GalNAc : D-galactose, N-acethylgalactosamine

Gal, GalNAc : D-galactose, N-acethylgalactosamine

KDa : kilo Dalton

Man : Mannose

NeuAc : acide N-acétylneuraminique.

nm : nanomètre

PA-IIL : Pseudomonas aeruginosa lectin II

PA-IL : Pseudomonas aeruginosa lectin I

PBS : Phosphate buffer saline

λ : longueur d'onde



Introduction :

Introduction :

Les lectines sont une classe de protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides et agglutine les cellules. Elles interviennent dans divers processus biologiques, Au niveau de la reconnaissance entre les cellules (Par exemple lors de réponses immunitaires, et d'infections).

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

Après cette découverte plusieurs lectines sont isolées et purifiées essentiellement à partir des plantes et sont considérées actuellement comme les principales sources de purifications des lectines, Elles contiennent souvent des quantités importantes de ces dernières.

Les lectines végétales ont un rôle essentiel dans la défense contre les microorganismes pathogènes, les insectes, Les virus, Les nématodes et les prédateurs d'herbivores, Et sont impliquées aussi dans l'organisation cellulaire, La protection cellulaire et les mécanismes de croissance de la paroi cellulaire, Ainsi que la mitose induite (Santos et al., 2014).

En raison de leurs propriétés biologiques les lectines aujourd'hui s'appliquent dans différents domaines biotechnologiques et médicales comme les effets anti tumorales exemple : Les cellules de cancer du sein traitées par l'hémagglutinine *Pseudomonas aeruginosa* Elles peuvent induire la mort de cellules cancéreuses en ciblant les voies de mort cellulaire programmées et sont donc considérés comme un agent anticancéreux prometteur pour une future thérapie contre le cancer (Zheng et al., 2012). Elles sont aussi exploitées pour d'autres activités biologiques, Telles que les activités antifongiques et Antivirales.

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

Les lectines sont présentés en quantité plus importante chez les végétaux plutôt que chez les animaux, Pour cette raison l'objectif principal de notre travail est de chercher la présence des lectines dans la noix de muscade de la famille (*Myristicaceae*) d'un arbre tropicale " Le muscadier ", Et l'extraction de cette dernière à partir de cette plante avec des études biologiques.

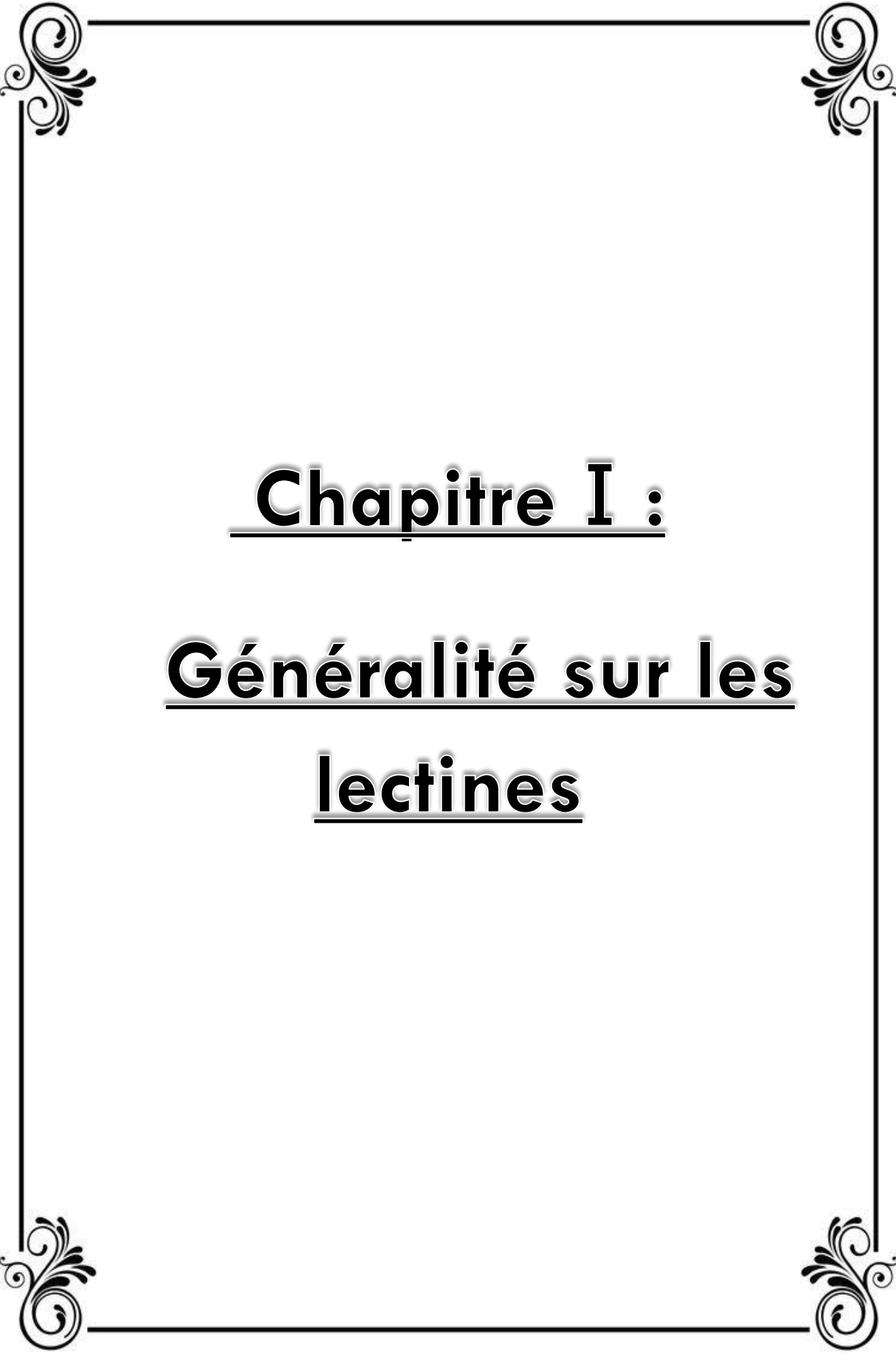
Objectif du travail :

Le protocole que nous avons choisi de suivre est le suivant :

- ✚ Extraction et Fractionnement des protéines à partir de la noix de muscade broyées dans l'azote liquide et diluées dans un tampon phosphate (PBS) suivies de filtrations et de centrifugations.
- ✚ Test d'hémagglutination sur les érythrocytes de lapin afin de déterminer l'activité hémagglutinante des protéines.
- ✚ Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium suivie d'un dessalage par dialyse.
- ✚ Purification par chromatographie sur colonne de Séphadex G50.
- ✚ Lyophilisation des fractions qui ont une activité agglutinante.
- ✚ Test de la température et des effets du pH sur l'hémagglutination en présence de ces protéines afin de déterminer leur thermo-stabilité et leur pH optimum.
- ✚ Test d'inhibition d'hémagglutination en présence de différents monosaccharides, glycoprotéines et des métaux pour déterminer leur spécificité.
- ✚ Test d'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par ces protéines.



Etude bibliographique



Chapitre I :
Généralité sur les
lectines

Les lectines

1. Définition :

Le mot lectine dérive du verbe latin *legere* qui veut dire « sélectionner » ou « choisir ». Un nom bien approprié pour cette très importante classe de protéines. Les lectines ont été définies comme des protéines d'origine non-immune qui se lient spécifiquement et de façon réversible aux sucres et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats (**Kocourek 1981**).

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 (**Karolin,S, 2008**).

Les lectines sont de petites protéines, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD ; habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins et Evrard, 2003**).

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, Car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capable 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., MolecularBiology,An international series of Monographs and Text books,1986**).

Elles interagissent également avec des systèmes biologiques et développent une cascade d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants, ces interactions sont d'un grand essor car elles sont impliquées dans divers processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis & Sharon, 1998**).

Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et du thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés par leur traitement thermique

dont l'efficacité dépend de la température et de la durée du traitement (Meiteet al, 2006).il existe aussi des lectines thermorésistantes (Guillaume, 1993).

Quelques lectines importantes sont énumérées dans le (tableau 1).

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

2. Historique :

En 1888, La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes.

En 1919, **James B. Sumner**, de l'université Cornell (**Ithaca, New York**), isola à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaline A (Sumner, 1919). Il fallut patienter presque vingt ans jusqu'en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'agglutination de la concanavaline A par des saccharoses (**Sumner et Howell, 1936**).

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

L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes. Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin "legere" qui veut dire : sélectionner

Le **(Tableau 2)** montre l'historique de découverte des lectines.

ANNEE	AUTEURE	DECOUVERTES
1884	<i>Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman</i>	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	<i>Dixson</i>	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	<i>Stillmark</i>	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton tiglium</i>
1890	<i>Erlich</i>	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton tiglium</i>
1891	<i>Hellin</i>	Activité hémagglutinante de la graine d' <i>Abrus Precatorius</i>
1897	<i>Elfstrand</i>	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	<i>Landsteiner</i>	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur

1902	<i>Kauss</i>	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	<i>Landsteiner & Raubitschek</i>	Activité Hémagglutinante dans les plantes non Toxiques
1908	<i>Landsteiner & Raubitschek</i>	La spécificité des espèces de plantes a Hémagglutinines
1909	<i>Landsteiner</i>	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	<i>Sumner</i>	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926	<i>Arcusson & Begun/Siever</i>	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947	<i>Boyd & Reguera /Renkonen</i>	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	<i>Liener</i>	Toxicité des hemagglutinines de <i>Phaseolus Vulgaris</i> Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	<i>Jaffe</i>	
1952	<i>Watkins & Morgan</i>	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	<i>Boyd & Sharpleigh</i>	Introduction du terme de lectine
1960	<i>Nowell</i>	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	<i>Agrawal & Golstein</i>	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	<i>Boyd</i>	Lectines dans les algues
1981	<i>Reinsner et al</i>	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse

1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'E-coli
------	-----------------------	--

3. La structure des lectines :

Les lectines sont composées d'une ou plusieurs sous-unités associées par des forces non covalentes en une molécule polymère. La mieux connue, la **con A**, est un tétramère dans lequel des ions métalliques interviennent dans l'assemblage des sous-unités et dans la configuration du site de liaison, configuration d'une grande importance pour son activité. Les lectines ont été classées selon leurs propriétés :

En **agglutinines**, en **mitogènes**, en **toxiques**, et en **enzymatiques**.

- Les lectines sont classées en 3 grandes classes :

3.1. Les lectines simples :

Cette catégorie des lectines est formée de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire en général ne dépasse pas 40KDa. Elle comprend presque toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (**Lenka, 2006**) (**Figure 01**) .

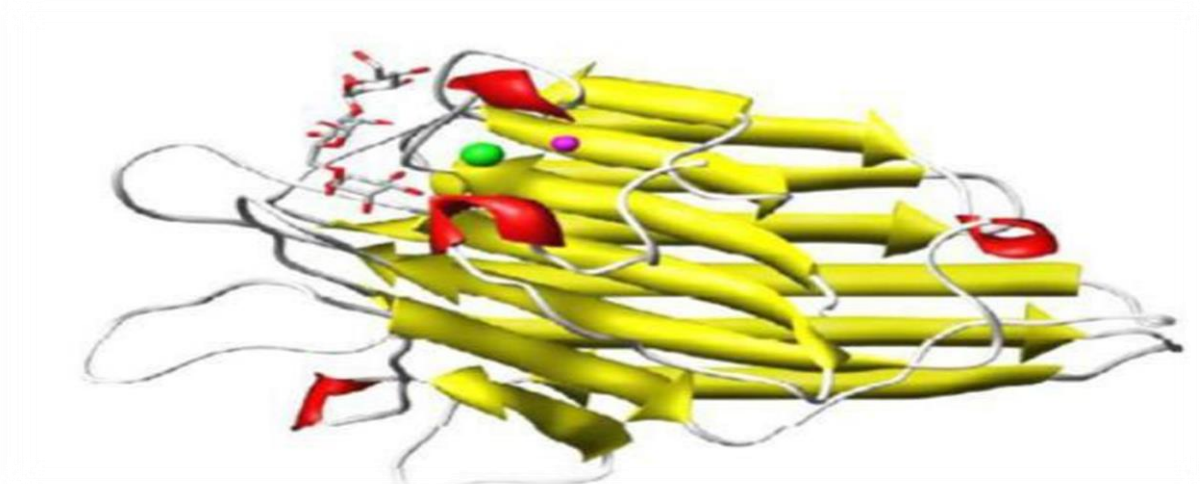


Figure 01 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le tri mannoïde (**Lenka, 2006**).

La protéine est représenté par :

- Un ruban rouge pour les **hélices α** .
- Un ruban jaune pour les **feuilles β** .
- Un fil pour les **autres zones**.

Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (**Lenka, 2006**).

3.2. Les lectines en mosaïques :

Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs type de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (**Lenka et al, 2006**). (**Figure 02**)

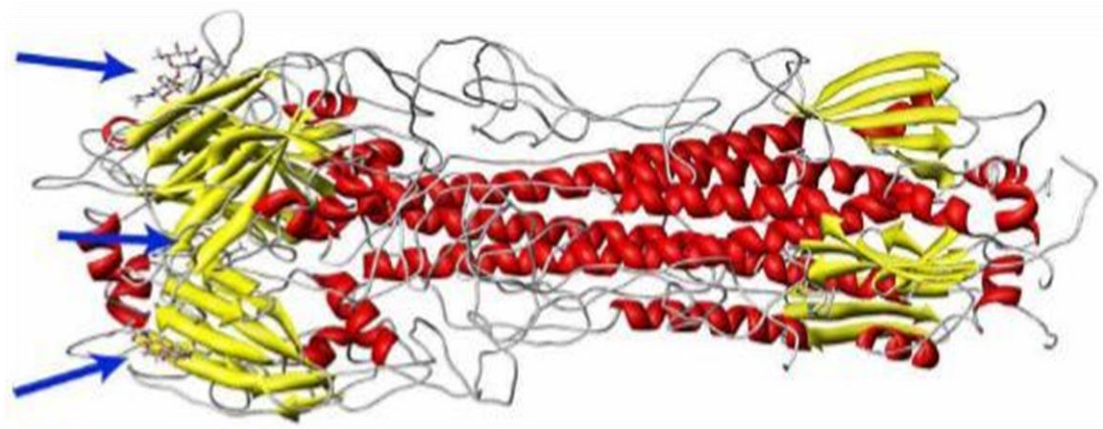


Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (**Lenka et al, 2006**).

3.3. Les assemblages macromoléculaires :

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement

une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006) (Figure03).

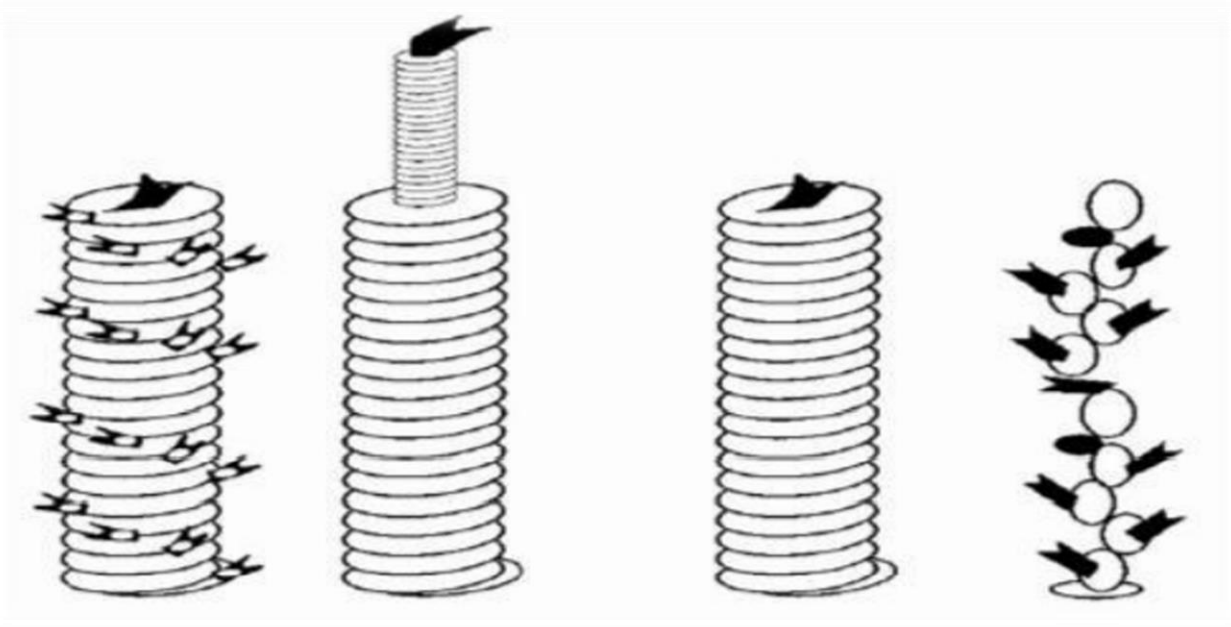


Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'E-coli.

4. Structure tridimensionnelle :

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).

Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regrouper jusqu'à trois régions chevauchantes, la région centrale est constituée par les résidus d'interactions et les ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) nécessaires à ces interactions, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction : lectine-carbohydate. (Sharon & Lis, 1990 ; Young et Oomen, 1992).

5. Spécificité et affinité des lectines :

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (Robert, 2008).

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon, 2003**).

L'affinité des lectines pour les monosaccharides est généralement assez faible (KDa de l'ordre de 1mM) en comparaison avec leur affinité pour les oligosaccharides. (**Dam et Brewer, 2002**).

Les lectines sont classées en cinq (5) groupes différents selon le monosaccharide pour lequel elles présentent la plus forte affinité :

- ✚ le mannose (**Man**).
- ✚ le galactose (**Gal**)/ **N-acétyl galactosamine (GalNAc)**.
- ✚ le glucose (**Glu**)/le **N-acétyl glucosamine (GlcNAc)**.
- ✚ le fucose (**Fuc**).
- ✚ l'acide sialique (**NeuAc, acide N-acétyl neuraminique**).

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**).

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park, et coll. 2008**). Par exemple, en utilisant les techniques de test **ELLA** (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test (Glycans array). La spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont rapides, simple et requièrent des quantités réduites de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « **tandem** » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire.

Les interactions multiples entre d'une part les glycoconjugués et d'autre part les lectines multivalentes, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee 1995**).

(**Tableau 3**) : représente la spécificité osidique de certaines plantes contenant les lectines.

Tableau 3 : La Spécificité osidique des lectines de certaines plantes (**Baracate,2016**).

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

5.1 - Les sites de liaisons des lectines :

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (**Goldstein et Poretz, 1986**).

Les interactions de type **salin** ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (**Pontet, 1996**).

Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels elles se lient (**Gabius, 1985**).

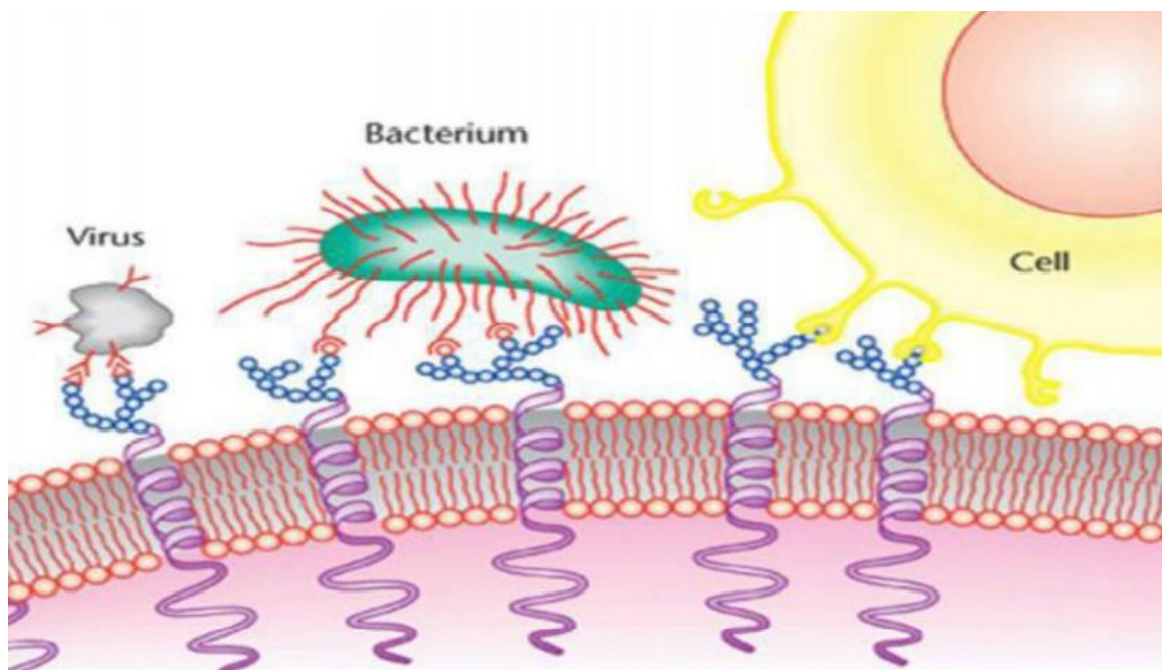


Figure 04 : Représentation schématique d'une interaction lectines-glucides
(Sharon et Lis, 1993)

5.2 - L'inhibition des lectines par des glucides :

La spécificité osidique des lectines est définie en terme de concentration minimale de monosaccharide nécessaire pour inhiber l'agglutination ou la réaction de précipitation induit par ces molécules (Goldstein et Hayes, 1978 ; Goldstein et Poretz, 1986).

Makela (1957) suggère que les monosaccharides réagissant avec les lectines peuvent être divisés en quatre classes, la classification est basée sur la structure **stéréo-isomère** des groupes hydroxyles en **C3** et **C4** du cycle pyranose.

- I : Les lectines qui se lient au L-fucose comme celle de *Ulex europaeus* L .
- II : Les lectines qui se lient au galactose et/ou N-acétylgalactosamine, telle celle du soja.
- III : Les lectines telles la Con A ou la GNA, se lient au mannose et/ou glucose.
- IV : Les lectines qui se lient à la L-xylose, Iodos, Gulose et L-glucose.

6 - Classification et distribution des lectines dans le monde vivant :

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

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

Tableau 4 : Quelques lectines et leur origines (Karoline S.A, 2008)

Origines	Exemple de lectines
Plantes	ConA / Ricine
Bactéries	PA-IL de Pseudomonas Toxine de cholera
Animaux	E-selectin Helix pomatia agglutinin
Virus	Hémagglutinine de virus Capside de rotavirus
Champignons	Lectine de mousseron
Algues	Griffithsin

6.1. Chez les animaux :

Les lectines animales sont des protéines qui se lient spécifiquement aux glucides exprimées dans une variété de tissus. Ils sont excrétés sous forme de protéines membranaires (Bianchet et al, 2009).

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les **glectines**, les lectines de **type C** et les **sigles**.

On peut les regrouper dans deux principaux groupes :

6.1.1. Les lectines extracellulaires :

Les lectines extracellulaires comprenant toutes les autres familles, comme les lectines de type **R** et **A**. Ainsi que les glectines. Elles sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance des pathologies (Chabrol et al. 2012).

6.1.2. Les lectines intracellulaires :

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

6.2. Chez les plantes :

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

6.2.1. Les mérolectines :

Ce sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides (exemple : **héveine**, **protéines d'orchidées**) dit **monovalentes** (**Doumbia, 2004**).

Ce sont aussi de petites protéines monovalentes incapables de précipiter des glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, Et donc non agglutinantes (**Santos et al. 2014**).

6.2.2. Les hololectines :

Ce sont des lectines dit **multivalentes** c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides dont deux ou plusieurs sont identiques ou très similaires, Cette classe comprend toutes les lectines qui ont plusieurs sites de liaison et sont capables d'agglutiner des cellules ou de précipiter des glycoconjugués. (**Santos et al. 2014**).

La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines (**Doumbia, 2004**).

6.2.3. Les chimérolectines :

Ce sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils Possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison.

Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimerolectines se comportent comme des mérolectines (exemple : **chitinase classe I**) ou comme des **hololectines** (exemple : **type 2-Rip** ribosom inactivating proteine ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (**Doumbia, 2004**).

6.2.4. Les superlectines :

Ce sont des oligomères poly-spécifiques constitués de plus de quatre monomères, Elles sont constituées de molécules avec deux ou plusieurs domaines distincts de liaison aux glucides (Santos et al.2014).

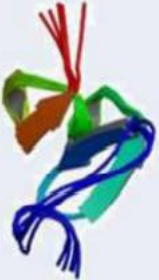
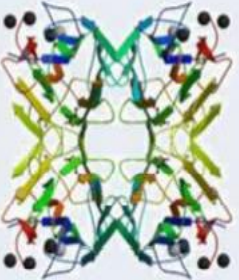
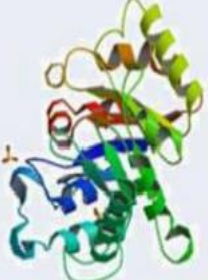
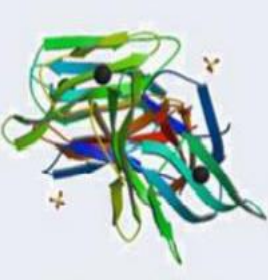
mérolectines	hololectines	chimérolectines	superlectines
			
Heveína (1HEV)	ConBr (3JU9)	PPL2 (2GSJ)	Banana lectin (2BMY)

Figure 5 : Classification des lectines végétales proposée par **Peumans** et **Van Damme** (1995)

Cette classification est basée sur la structure globale des lectines.

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

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

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

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

6.3. Lectines de microorganismes :

Les infections sont toujours initiées par l'attachement du microorganisme aux tissus de l'hôte. Ce phénomène implique la reconnaissance des cellules de l'hôte le microorganisme, Et

nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (**Bouchara et Trouchin, 2003**).

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions **lectines-sucres** jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imbert and Varrot, 2008 ; Sharon, 1996**).

6.3.1 Les lectines bactériennes :

Les lectines bactériennes sont situées sur la surface de la bactérie en général ou bien localisées dans le cytosol, elles jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte durant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré beaucoup d'attention au cours de ces dernières années (**Sharon, 1996**).

Les lectines bactériennes connues sont divisées en trois classes (**Imbert, 2005**) :

- ✚ **Les lectines fimbriales.**
- ✚ **Les toxines.**
- ✚ **Les lectines solubles.** qui n'appartiennent pas aux deux premières classes.

6.3.1.1 Les lectines fimbriales :

Les bactéries sont armées d'organelles de surfaces appelées fimbriae qui sont douées de différentes fonctions, telle que la reconnaissance et l'adhésion sur des surfaces diverses et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes (**Low, 1996**). Des centaines de fimbriae sont attachés à la surface d'une cellule bactérienne.

Dans les trois différents types de fimbriae qui ont été observés (**type 1, type P et type IV**) l'organisation structurale est similaire (**Soto, 1999**).

Les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues jusqu'à aujourd'hui appartiennent aux pili de **type 1** ou de **type p** et montrent que les domaines lectines adoptent des repliements similaires, basés sur une structure allongée de type β -sandwich. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un coté du domaine lectine. (**Figure 6**).

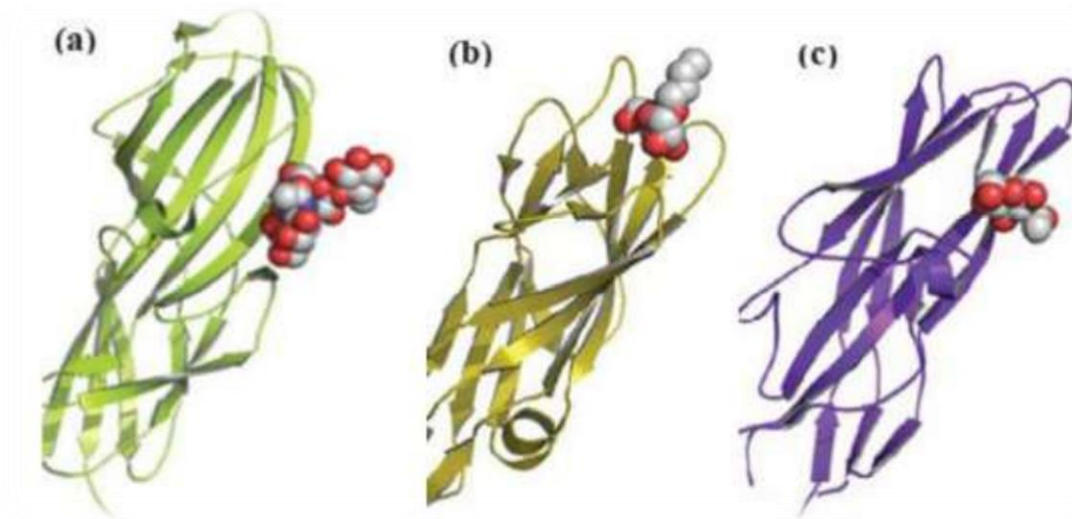


Figure 6 : (a) Récepteur **PAPG** en complexe avec le tetrasaccharide **GBO4** (PDB 1J8R).
 (b) FimH complexé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF).
 (c) une lectine fimbriale **F17-AG** en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W).

6.3.1.2 Les toxines :

Les bactéries secrètent les toxines qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. La rupture de la paroi cellulaire endommage la cellule par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines de type AB sont secrétées par différents microorganismes tels que «*Vibrio cholerae*», Certaines souches d'*E.coli*(ETEC), «*Shigella dysenteriae* » et «*Borderella pertussis* ». Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B (Figure 7).

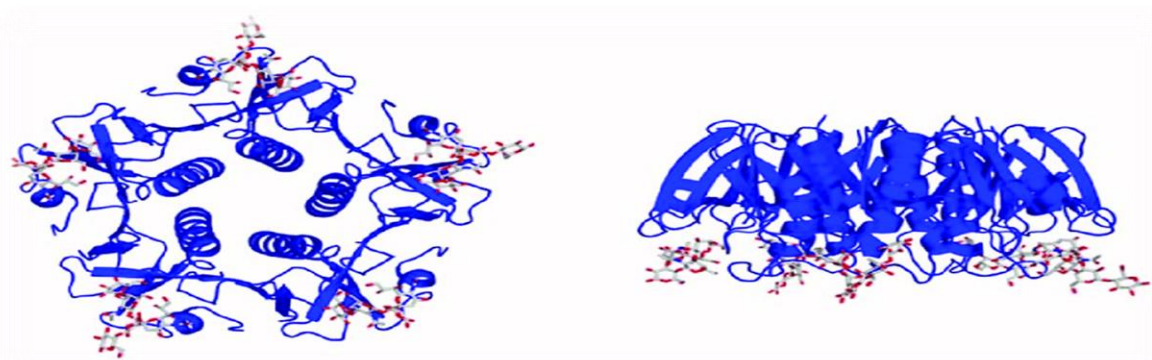


Figure 7 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)

6.3.1.3 Les lectines solubles :

Cette famille de lectines bactériennes regroupe toutes les protéines solubles exprimées par des bactéries ayant une affinité pour les sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique (Kostlanova, 2005).

Tableau 5 : Lectines bactériennes solubles

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

6.3.2. Les lectines de champignons :

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons a été principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (She, 1998 ; Sze, 2004).

L'abondance des lectines dans les champignons est remarquable, des tests d'hémagglutination réalisés sur plus de 411 spécimens ont permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés. (Tableau 7).

Tableau 6 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)

Champignon	Année	Caractéristique et spécificité
<i>Aleuriaaurantia</i> (AAL)	2003	Fucose β -propeller à 6 lames
<i>Flammulinavelutipes</i> (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
<i>Xerocomuschrysenron</i> (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
<i>Coprineuscinerea</i> (CGL2)	2004	Gal Galectine
<i>Agrocibecylindracea</i> (ACG)	2005	Gal Galectine
<i>Agaricusbisporus</i> (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
<i>Laetiporussulphureus</i> (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
<i>Psathyrellavelutina</i> (PVL)	2006	GlcNAC/NeuNAc β -propeller à 7 lames

6.3.2.1 Caractéristique des lectines de champignons :

Les lectines de champignons qui ont été caractérisées et purifiées jusqu'à présent dévoilent des caractéristiques très vaste, soit en terme de taille (**12-190 KDa**), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre de sous-unités (**1-8**) et de structure tridimensionnelle. Leurs spécificité pour les sucres est très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines.

6.3.2.2 Le rôle des lectines de champignons :

Les lectines des champignons jouent un rôle important dans la période de dormance, la croissance et la morphogenèse du corps fructifère ou comme protéines de défense immunitaire. Chez les saprophytes, les lectines pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats nutritifs.

Par contre, chez les champignons qui adoptent un mode de vie parasitaire ou symbiotique avec d'autres organismes, les lectines sont probablement impliquées dans les

processus de reconnaissance de l'hôte ou dans les premières étapes de la mycorrhization (Giollant, 1993).

7- Propriétés des lectines :

7.1. Les propriétés biologiques des lectines :

7.1.1. L'interaction lectine-glucide :

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

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines elle est aussi classiquement utilisée pour leur caractérisation et leur détections. Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (Karoline, 2008).

La figure suivante représente un exemple d'interaction lectines-glucides :

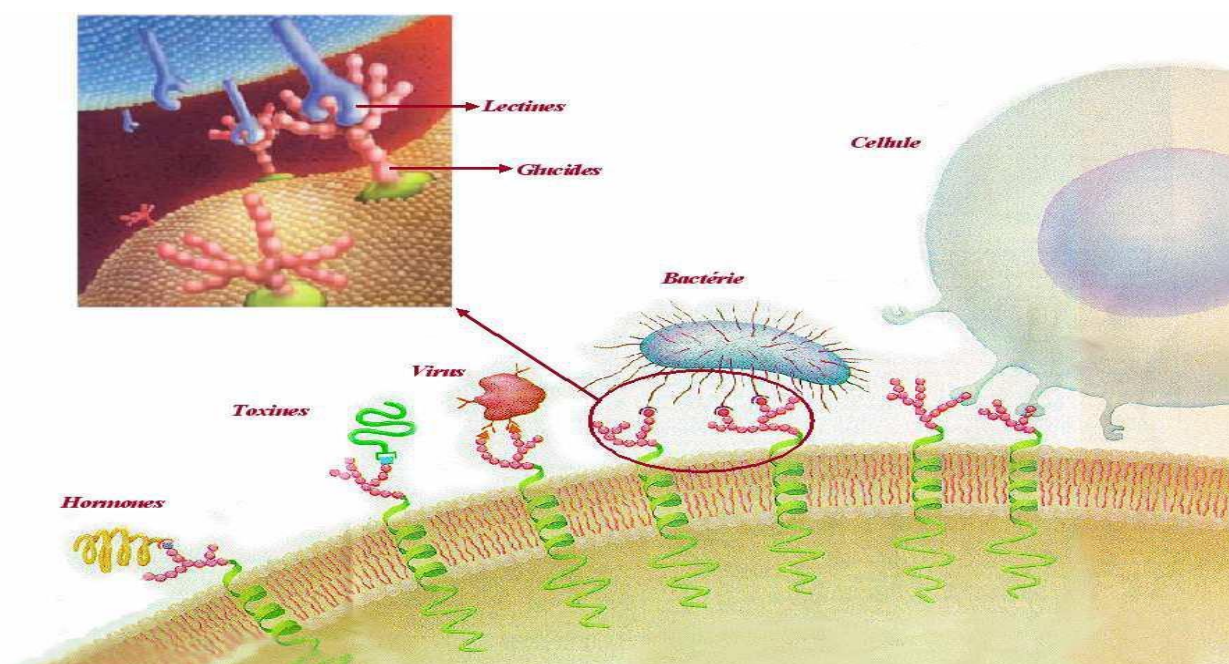


Figure 8 : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire.

7.1.2 Agglutination des cellules :

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, champignon, mycoplasme). Les lectines monovalentes ont un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Baracate, 2016**).

7.1.3 Activité mitogène :

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

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

7.2 Les propriétés médicinales des lectines :

Les lectines étaient considérées comme des substances toxiques uniquement destinées à être utilisées comme outils d'analyse des glycoconjugués. Cependant des études récentes ont montré leur intérêt dans le domaine médical.

7.2.1 La propriété antibactérienne :

Les lectines sont des phénomènes de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**Tanne et Neyrolles, 2010**).

Pour cette raison, Plusieurs lectines ont une activité antibactérienne, Tell que l'**EUL** et le **calnexin A** qui ont une action antibactérienne contre *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* et *P. syringae* respectivement (**Qiu et al. 2012 ; Atalah et al. , 2014**).

Les lectines animales comme les lectines récepteurs des kinases (**LecRKs**) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (**Singh et al. 2005**). Aussi bien pour les lectines de type C qui supportent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al. 2014**).

Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une maniere calcium dépendent ou par leurs opsonisation en se fixant sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (Zhang et al. 2012 ; Huang et al. 2014 ; Xu et al. 2014).

7.2.2 La propriété antivirale :

Dans les infections virales les lectines sont impliquées dans la fixation et inhibition de la réplication des virus (Xu et al.2014).

Elles sont aussi responsables de la détection des molécules pathogènes (PAMPs) liées aux virus

Les lectine ont la capacité de bloqué l'infection du VIH-1 par l'inhibition de l'enzyme rétro transcriptase du virus (Tanaka et al. 2009 ; Hamid et al. , 2013).

7.2.3 La propriété anticancéreuse :

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (Poiroux, 2011). Egalement ils inhibent leur migration (Banwell, 1983).

7.2.4 La propriété antifongique :

Parmi le grand nombre des lectines purifiées seulement une petite portion d'elles a une activité antifongique et qui reste indirect et seuls les lectines qui ont un domaine catalytique ayant cette activité appartiennent à la classe I des chitinases (Andrew et al. 2014).

Les lectine de *Phaselous vulgaris cv* ont une activité fongicide contre *Valsa mali* (Lam et Ng, 2010). La même propriété est présentée par les lectines de *Tinospora tomentosa* qui ont une action inhibitrice sur la croissance du champignon *Aspergillus niger* (Repon et al. 2014).

7.2.5 La propriété immunomodulatrice :

Plusieurs lectines exercent des activités immunomodulatrices au temps de la première interaction avec les glycanes présentent à la surface des cellules immunitaire (Abdeljalil et al.2014).

Les lectines forment des signaux de production des cytokines (Souza et al. 2013). Comme est le cas des lectines isolées à partir de *Viscum album* L qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages, Et elles médiate la repense immunitaire par amélioration des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- α) (Lee et al. 2007).

8 Les utilisations et les applications des lectines :

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (Lis and Sharon ,1998).

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

8.1 Dans le domaine biomédical :

La découverte majeure de certains états pathologiques et physiologique étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules fut possible grâce à l'utilisation des lectines (Raquel et Benevides, 2011).

8.1.1 - Hématologie :

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (Boyd and Sharpleigh, 1954) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

8.1.2 - Immunologie :

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être réutilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (Hirabayashi, 2004).

Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (Jaffe, 1980).

8.1.3 - Biologie cellulaire :

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, Les structures, La dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (**Jaffe, 1980**).

8.1.4 - Cancérologie :

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot et coll., 2004**).

Kenoth et al (2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteurs pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

Tableau 7: Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (Murdockl .L Shade R.E, 2002).

Propriétés	Applications
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	-typage du sang. -identification de nouveaux groupes Sanguins.
Agglutination cellulaire	-recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations. -phagocytose et motilité. -Diminution de la croissance des cellules Tumorales.
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	-isolement, purification et études structurales des glucides. -purification des glycoconjugués (enzymes, hormones). -modèles pour la réaction antigène anticorps (test ELISA, etc.)

Liaison aux sucres	-études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. -structure et fonctionnement des membranes.Q
--------------------	--

8.2 En biochimie et protéomique :

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un une enzyme, immuno-blotting , immuno-précipitation ...) .Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . **(DOLE.A.et LINDEBERG. S. ,2005)**

8.3 Dans le domaine agronomique :

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

9. Le rôle de lectines dans l'immunité :

Les lectines sont utilisées en immunologie par **Paul Ehrlich** au début des années**1890**, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulé par les lectines in vitro ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent in vivo **(Sharon, 1983)**.

Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre d'une réponse de l'immunité innée **(De Hoff et al. 2009)**.

Le système du compliment, son activation peut être initiée par des complexes immuns (voie classique), par des oligosaccharides microbiens (voie des lectines) ou par divers composants de surface des pathogènes (voie alterne) **(Cavaillon, 2005)**.

La voie lectine est initié par la fixation de diverses lectines, telles la **MBL**, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet l'activation des protéases **MASPS** (MBL-Associated Serine Protéase) (**Ayméric et Lefranc, 2009**).

La lectine liant le **mannose** (mannose bindinglectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine du complément qui joue un rôle dans l'immunité inné (**Roos et al. , 2007**). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (**Kawsar et al. , 2010**).

La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytoses. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytoses grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – fucose, récepteur de galactose et récepteur de β -glucane (**Guénard et al. , 2001**)



Chapitre II :
Systeme Sanguin

Les groupes sanguins

1. Historique :

En **1900** le médecin Autrichien Karl Landsteiner (**1868-1943**) démontre que les sangs humains ne sont pas tous semblables ni tous compatibles entre eux. Il découvrit le système ABO, suivant lequel le sang se partage en quatre groupes : **A, B, AB** et **O**, selon les antigènes que l'on trouve associés aux globules rouges des personnes (**Boucher, 2008 ; Danic et Lefrère, 2011**). Un autre antigène important des globules rouges est le facteur rhésus **Rh** identifié en **1940** par Landsteiner et Weiner (**Brooker, 2001**).

2. Le système ABO :

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

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

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

3. Facteur rhésus :

Le facteur Rh est l'un des plus importants systèmes de groupes sanguins après le système ABO, ses antigènes (C, D et E) sont aussi importants que ceux du système ABO. Les personnes dont le sang possède cet antigène sont dites **Rh+**, tandis que les autres sont **Rh-** (Boucher, 2008).

4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO :

Les antigènes du système ABO proviennent d'une famille de glycolipides présents à la surface des globules rouges. Leur structure de base est constituée de lipide céramide auquel est attaché un oligosaccharide composé d'un glucose (Glu), d'un galactose (Gal), d'une N-acétylgalactosamine (Gal Nac), d'un galactose (Gal) et d'une fucose (Fuc).

- Les sujets du groupe O ne produisent que ce glycolipide.
- Les sujets du groupe A ont un enzyme qui ajoute une molécule de N-acétylgalactosamine à la chaîne oligosacchridique pour former l'antigène A,
- Les sujets du groupe B ont une enzyme qui ajoute une molécule de galactose pour former l'antigène B.
- Les globules rouges des sujets du groupe AB expriment en plus la structure de base dépourvue des glucides terminaux, ce qui explique pourquoi des alloanticorps ne sont pas produits contre le groupe O (Parham, 2000) (figure 07)

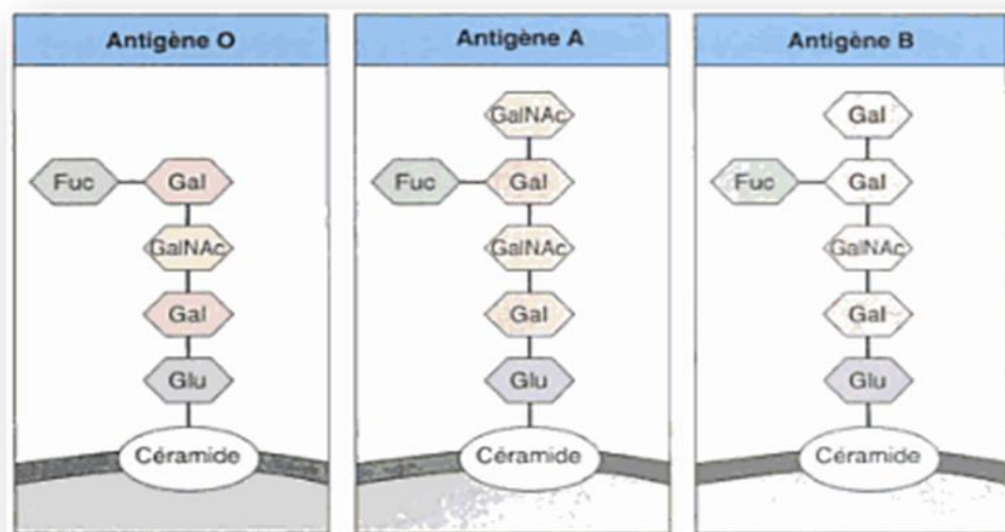


Figure 09 : Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO (Parham,2000).

5. Détermination du groupe sanguin :

La détermination des groupes sanguins ABO se fait à l'aide de deux épreuves : L'épreuve globulaire dite de Beth-Vincent (consiste à détecter les antigènes présents sur les globules rouges du patient grâce à des anticorps de spécificité connue = sérum test) et l'épreuve sérique dite de Simonin (consiste à détecter les anticorps naturels présents dans le plasma grâce à des globules rouges de groupe connu (globules tests)). La détermination du groupe sanguin ABO d'un patient est systématiquement associée à la recherche de l'antigène D (Béziat et al., 1996) (Tableau 05).

Tableau 08 : Les Lectines spécifiques des groupes sanguins.

Origine de lectine	Groupe spécifique	Référence
<i>Bandereira simplicifolia-I</i>	B	Richard, 1998
<i>Sophora japonica</i>	A ; B	
<i>Vicia villosa</i>	A	
<i>Nelumbo vucifea</i>	B	Goker et al, 2008



Chapitre III :

Généralité sur la noix de muscade

La noix de muscade

1. Introduction à la noix de muscade :

La famille des noix de muscade (Myristicaceae) comprend de nombreuses espèces, largement répandues dans les forêts tropicales humides du monde entier. Cette plante a des significations écologiques et ethnobotaniques (**Steeves 2011**) et fait partie d'un groupe plus ancien au sein des angiospermes, qui se compose d'espèces récemment évoluées (**Newsmaster & Ragupathy 2009**).

2. Historique :

La noix de muscade fut à l'origine cultivée par les Arabes au Moyen Age depuis les Iles Banda dans l'archipel des Moluques aujourd'hui on en trouve principalement en Indonésie. (Jean Marie pelt, Éd. Fayard, 2002)

En Europe cela remonte au 17^e siècle lorsque Nathaniel Courthope un marchand d'épices anglais, réussit à établir une route vers Run, l'une des dix îles volcaniques de la mer de Banda. Ces îles font partie des Indes orientales qui sont actuellement situées dans la province indonésienne des Moluques. Pendant ce temps, la noix de muscade était une denrée extrêmement appréciée non seulement en raison de son utilisation comme épice exotique, mais aussi pour ses valeurs médicinales (Milton 2000).

3. Description botanique :

Le muscadier est un arbre tropical à feuilles persistantes. Il a une forme conique naturelle avec un tronc gris-brun et des feuilles brillantes vert foncé. Les branches de l'arbre se déploient en verticilles et les feuilles sont de forme ovale ou lancéolée.

Les feuilles sont disposées alternativement sur les branches et mesurent de 5 à 15 cm de longueur, lisses et de couleur plus claire sur la face inférieure. L'arbre produit des grappes de nombreuses fleurs mâles tandis que les fleurs femelles sont produites en solitaires ou en grappe (maximum de 3). Les fleurs sont jaune pâles et parfumées. Le fruit du muscadier est une baie charnue arrondie qui se divise en deux moitiés lorsqu'elle mûrit. La graine à l'intérieur est brune foncée brillante et de forme ovale. Le tégument est recouvert d'un arille rouge en dentelle qui est attaché à la base de la graine. Les noix de muscade peuvent atteindre une hauteur de 20

m. La noix de muscade peut également être appelée macis et elle n'est pas connue à l'état sauvage. (Recueil de protection des cultures CABI, 2008) (Marcelle, GB, 1995).

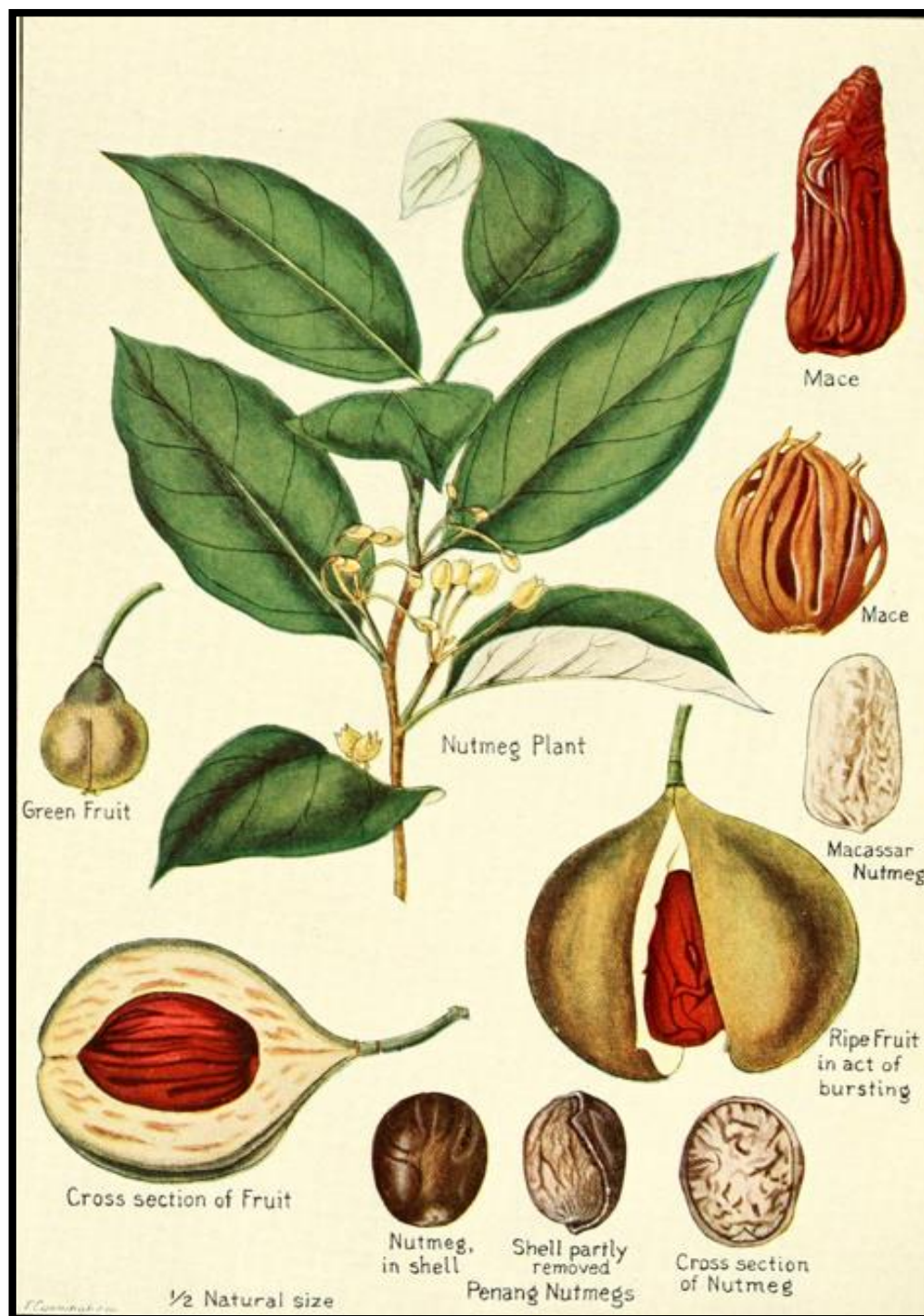


Figure 10 : Représentation schématique de la plante et de la noix de muscade sous ses différents stades.

4. Classification scientifique :**Tableau 9 : Classification scientifique de la noix de muscade :**

<i>Règne</i> <i>Plantae</i>	
<i>Division</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Classe</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordre</i>	<i>Magnoliales</i>
<i>Famille</i>	<i>Myristicaceae</i>
<i>Genre</i>	<i>Myristica</i>
<i>Espèce</i> <i>Myristica fragrans</i>	

5. Propriétés pharmacologiques :

En médecine folklorique, la muscade a longtemps été utilisée comme remède contre les problèmes gastro-intestinaux, tels que flatulences, coliques, indigestion et diarrhées.

L'utilisation traditionnelle de la muscade pour traiter les tumeurs et les maladies infectieuses, telles que les parasites et la peste, a également été signalée. La noix de muscade a été utilisée en usage externe pour traiter les infections cutanées, les rhumatismes et la paralysie (**Khan & Abourashed 2010**).

D'autres utilisations intéressantes de la muscade incluent le traitement des troubles psychologiques (**Antonio et al 2013**).

Malgré la myriade d'utilisations folkloriques de la muscade, les études précliniques et cliniques soutenant de telles utilisations sont relativement limitées. Des études pharmacologiques ont confirmé quelques activités des extraits de noix de muscade, notamment des activités antidiarrhéiques, antimicrobiennes, antioxydantes. (**Grover et al.2000**).



Chapitre IV :
Matériels et méthode

Matériel et méthodes :

Le travail expérimental a été effectué au laboratoire de G.M.A « Génie Microbiologique et Applications » du Bio-pôle situé à Chaab ersass (Université des Frères Mentouri-Constantine1).

1. Matériel**1.1 Matériel végétal :**

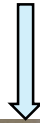
Notre étude a été réalisée sur la noix de muscade (**Myristica fragrans**) de l'arbre tropical « **le muscadier** ».

1.2 Matériel animal :

- ❖ Les hématies utilisées sont issues de sang du lapin pour réaliser les tests d'hémagglutination.
- ❖ Le sang humain de type **A, B, AB** et **O**, pour réaliser le test d'agglutination sur les hématies humaines **ABO**.

2. Méthode :

Le Protocole expérimental suivi :

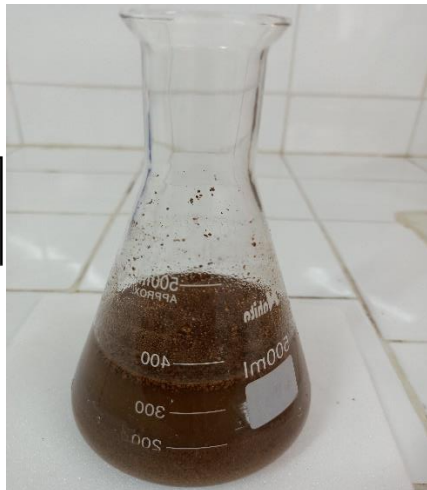


200g des noix de muscade sont rendus en poudre grâce à l'azote liquide.



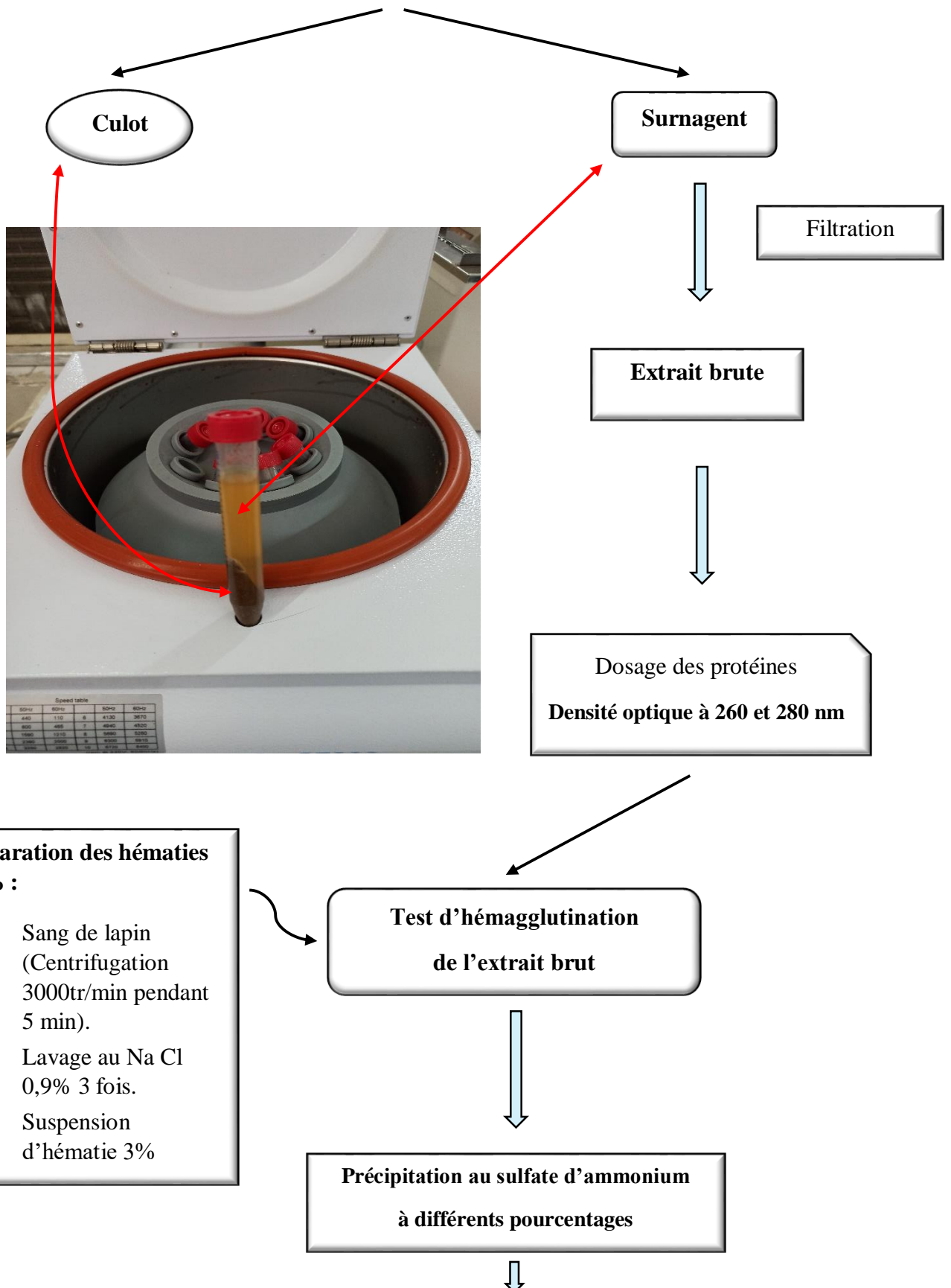
100g d'échantillon dans 300 ml
de PBS

Macération pendant 24h
à 4c°



Centrifugation à
5000 tour /min pendant 15 min



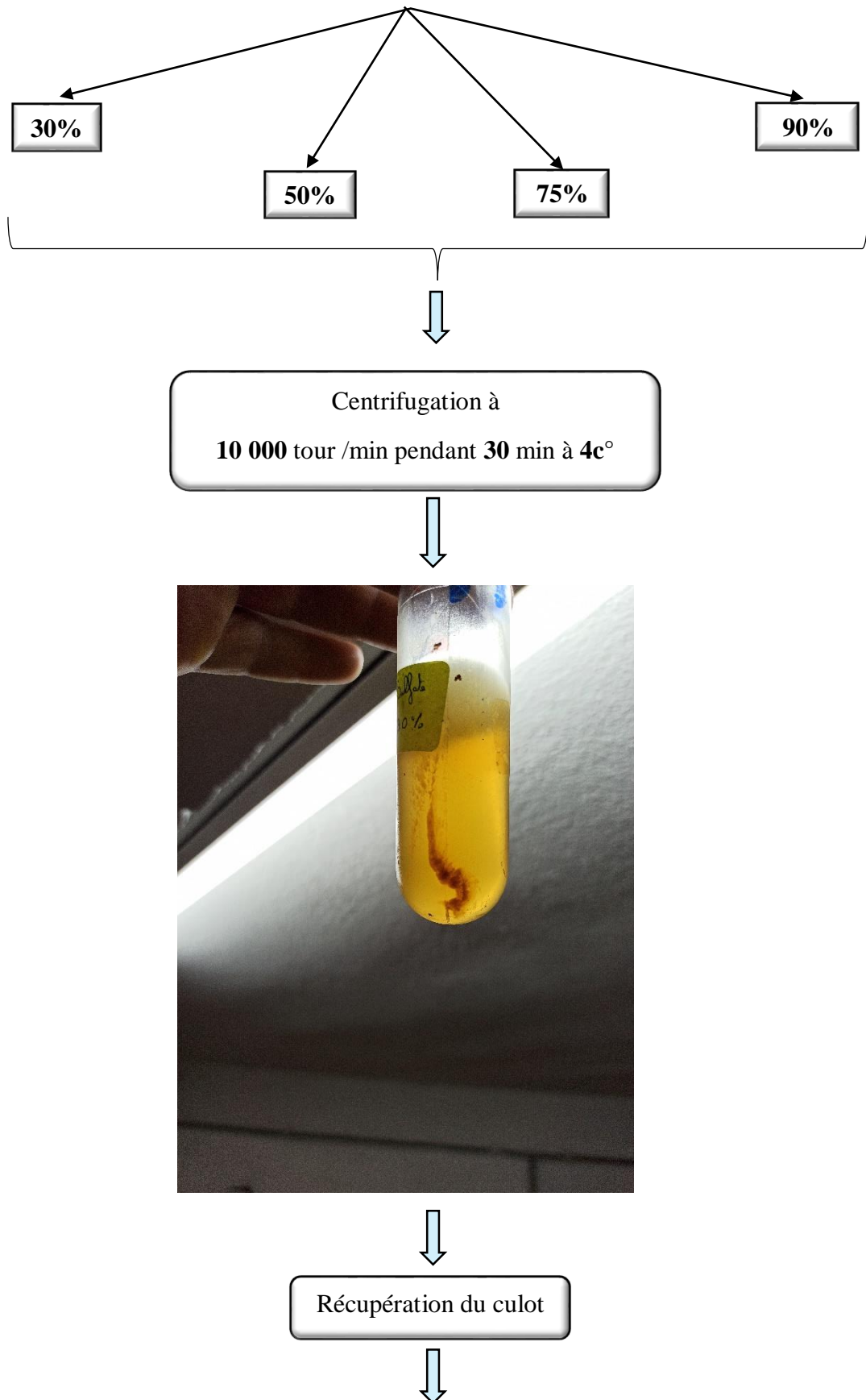


Préparation des hématies à 3% :

- Sang de lapin (Centrifugation 3000tr/min pendant 5 min).
- Lavage au Na Cl 0,9% 3 fois.
- Suspension d'hématie 3%

Test d'hémagglutination de l'extrait brut

Précipitation au sulfate d'ammonium à différents pourcentages



Test d'hémagglutination du culot récupéré
des différents pourcentages

Le culot récupéré qui a la meilleure
activité hémagglutinante

Dialyse



Dosage des
protéines
Densité
optique à 260
et 280 nm

Chromatographie sur colonne G50



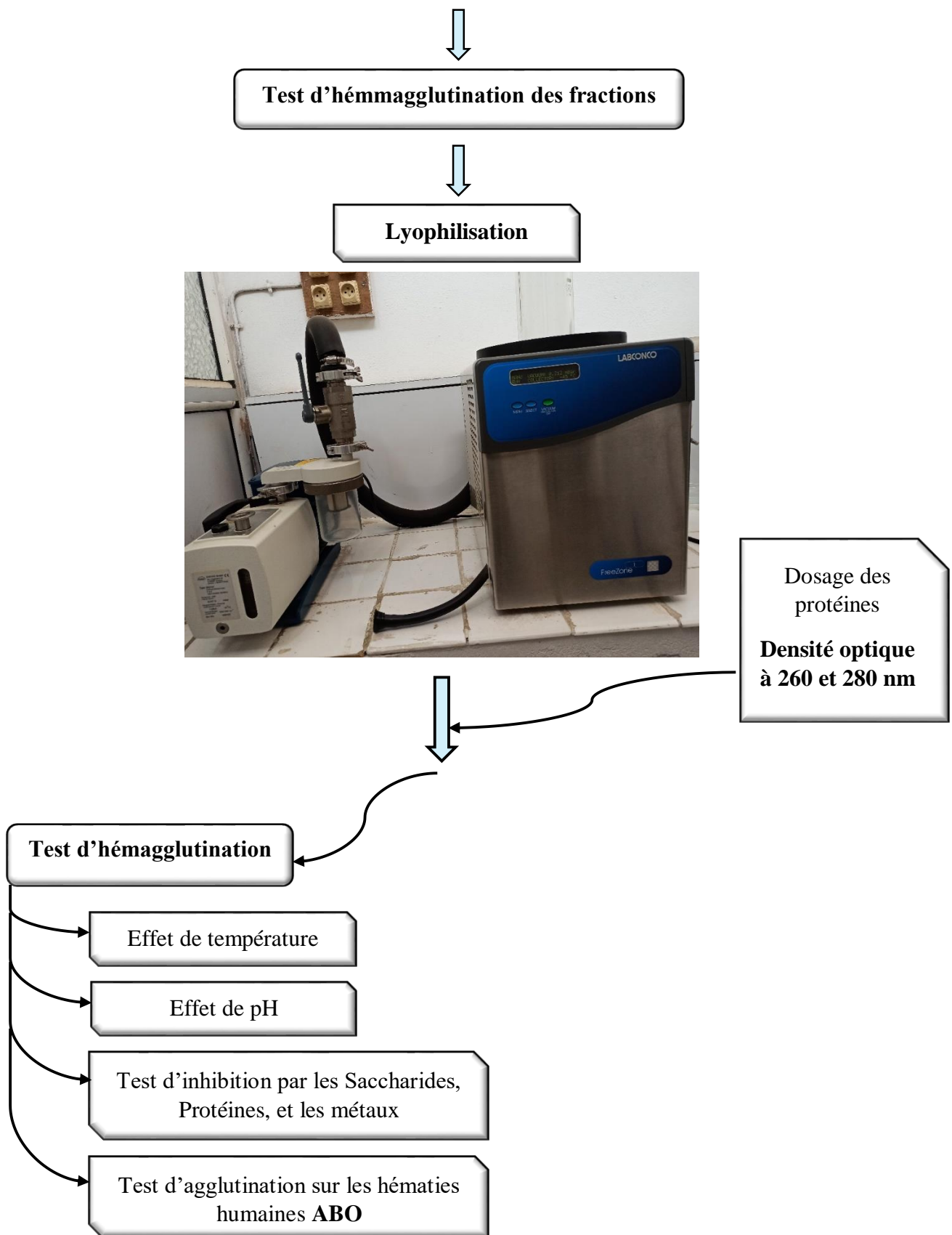


Figure 11 : Schéma explicatif de la procédure expérimentale.

2. Méthode :

2.1 - Préparation de l'extrait brut :

L'extraction des lectines a été faite selon la méthode de (**Budu 1988 et de Cammue et al1985**).

2.1.1 - Préparation de noix :

Les noix ont été cassées puis nettoies, Ensuite broyées dans un mortier par l'azote liquide jusqu'à l'obtenir d'une poudre qui a été conservé dans une boîte fermé.

2.1.2 - L'extraction des lectines par la solution tampon :

✚ Le principe :

C'est une opération visant à récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de plantes à l'aide d'une solution tampon (**Annexe 01**)

✚ La Technique d'extraction :

100g de poudre obtenues à partir des noix de muscade ont été mises dans un flacon de 100 ml de solution tampon (**0.01M pH=7.4**) pendant **24h** ; Après la centrifugation de la suspension à 4500tr/min pendant 45min, le surnageant et le culot sont récupérés et conservés pour la réalisation des tests souhaités.

2.2- Dosage des protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de **Warburg et Christian (1941)** qui ont étudié les propriétés spectrales des macromolécules et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques qui contaminent souvent les préparations de protéine. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à **280 nm**, pour les protéines et à **260 nm**, pour les acides nucléiques.

Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}.$$

2.3- Le test d'hémagglutination :

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les extraits aux différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (Goldstein et al 1980 ; Rüdiger 1993).

Ce test a été porté sur les hématies de lapin et permet d'affirmer la présence des lectines dans les extraits. Il se base sur l'observation de l'agglutination, et par conséquent de la précipitation des érythrocytes en présence des lectines.

2.3.1- La Préparation des hématies à 3% :

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de Higuichi et al(1988), de la manière suivante :

Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

Lavage des hématies :

Le tube contenant une quantité de sang (1.5 ml) a été centrifugé à **3000tr /min** pendant **5 min** le surnageant résultant est versé et une solution de (Na Cl 0.9%) (**Annexe 02**) est ajouté au culot ; après avoir bien mélangé le tube est soumis à nouveau à une centrifugation .l'opération est répété **3** fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant claire.

La dilution des hématies :

Après avoir terminé le lavage le culot contenant les globules rouges est dilué par une solution saline d'eau physiologique sachant qu'on ajoute 1.5 ml des hématies dans 48.5 ml de Na Cl 0.9% afin d'obtenir des hématies à 3%.

2.3.2- La technique d'hémagglutination :

L'activité hémagglutinante des lectines a été réalisée dans des microplaques de titration.

Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl d'extrait brute de notre plantes ont été déposés tout en ajoutant 50 µl des hématies de lapin 3%. Après 1h d'incubation à une température ambiante l'agglutination est observée à l'œil nu.

2.3.3- Le teste de la limite d'hémagglutination :

Ce test nous a permis de déterminer le pouvoir agglutinant et d'en déduire le titre en lectine c'est-à-dire la concentration la plus basse à laquelle on observe une hémagglutination.

Méthode :

Dans chaque puits, **50** µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de **50** µl de l'extrait brute de la noix de muscade qui lui est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants.

Ensuite, **50** µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après **1 h** d'incubation à une température ambiante (**25° C**)

2.4. Précipitation au sulfate d'ammonium :

Principe :

Une des étapes initiales des procédures de purification ; La précipitation au sulfate d'ammonium est une technique qui utilise la solubilité différentielle des protéines comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

L'électrolyte le plus utilisé pour la précipitation différentielle est le **sulfate d'ammonium**, ce sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et compétiteur efficacement avec les protéines, (Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher). Les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines.

Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, Mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

Le tableau ci-dessous donne les quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

Tableau 10 : Tableau de pourcentage de saturation en sulfate d’ammonium à 0°C

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Technique :

L’extrait brut (25mL) de la noix de muscade est soumis à une précipitation au sulfate d’ammonium avec une saturation à différents paliers (0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-90%) afin de séparer les protéines en différentes fractions. Une saturation initiale à 25% a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d’ammonium à l’extrait brut placé dans un bécher à 4°C sous agitation constante et laissé pendant 4h (Annexe 3). Après centrifugation à 10 000 x g pendant 30min, les protéines précipitées sont récupérées dans 1,5mL de tampon PBS.

Cette solution représente la première fraction protéique F1 (0-25%). Le surnageant obtenu est resoumis pour une autre précipitation au sulfate d’ammonium avec une saturation de 25 à 50% en suivant la même procédure. L’opération se poursuit jusqu’à une saturation à 100% de l’extrait en sulfate d’ammonium. Les 4 fractions protéiques ainsi obtenues F1 (0- 25%), F2 (25-50%), F3 (50-75%), F4 (75-100%) sont ensuite dialysées afin d’éliminer le sulfate d’ammonium résiduel.

2.5- Dialyse :

Les protéines précipitées mises en suspension dans un volume réduit du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2) sont dialysées contre 2 litres du même tampon, En utilisant une

membrane semi-perméable (Budain ; limite d'exclusion : 12kDa) sous une faible agitation à 4°C. Le tampon de dialyse est renouvelé 2 fois chaque 4h. L'activité hémagglutinante de chaque fraction protéique est testée, et les meilleures fractions actives seront utilisées pour la prochaine étape.

2.6- La chromatographie par filtration sur gel (Séphadex G50) :

Dans la chromatographie sur gel filtration, Les molécules sont séparées selon leur taille et leur poids moléculaire. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance à base de dextran, Et dans ce travail la phase stationnaire est constituée du gel de Séphadex G50.

Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 1 à 50 KDa.

La préparation de la colonne :

4 g de Sephadex G50 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4). Le mélange a été incubé pendant **48 h** à température ambiante. Puis il a été coulé dans une colonne puis équilibrée avec du tampon.

2ml de dialysat ont été versé lentement dans la colonne Séphadex G50, Puis il a été recueilli par l'élution avec le tampon phosphate (0,1M ; pH7,4) dans des tubes secs (**4ml/tube**) .

Les fractions récupérées ont été testés sur les hématies du lapin, pour assurer que l'activité agglutinante est améliorée. L'absorbance des dialysat récupéré à partir de la chromatographie sur colonne a été mesurée dans le spectrophotomètre à UV dont la longueur d'onde est de **280 nm**. Puis on a tracé la courbe d'absorbance en fonction des tubes.

Les fractions actives sont lyophilisées pour la réalisation des différents tests biologiques. Plusieurs purifications sont nécessaires jusqu'à l'obtention d'une bonne quantité d'extrait.

2.7- lyophilisation :

C'est une technique de déshydratation à basse température et sous vide qui consiste à transformer des extraits initialement liquide en poudre.

Les fractions actives issues de la chromatographie ont été placés dans des boîtes de pétri. Ils ont été d'abord congelé puis fixé au lyophilisateur.

2.8 - Etude sur les propriétés des lectines :

Une solution d'une concertation connue a été préparée à partir de quelques mg de lyophilisat avec le tampon phosphate (0,1M ; pH7,4), pour la réalisation des différents tests.

2.8.1 - La technique d'hémagglutination :

L'activité hémagglutinante a été réalisée dans des microplaques de titration.

30mg de lyophilisat a été mis en suspension dans 5ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4).

Dans chaque puits d'une microplaque, 50 μ l de la solution de notre lyophilisat ont été déposés tout en ajoutant 50 μ l des hématies de lapin 3%. Après 1h d'incubation à une température ambiante, l'agglutination est observée à l'œil nu.

2.8.2 - Le teste de la limite d'hémagglutination :

Ce test nous a permis de déterminer le pouvoir agglutinant et d'en déduire le titre en lectine c'est-à-dire la concentration la plus basse à laquelle on observe une hémagglutination.

Technique :

Dans chaque puits, 50 μ l de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 μ l de suspense (lyophilisat+PBS) qui lui est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants.

Ensuite, 50 μ l des hématies de lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

2.8.3 - Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides, glycoprotéines, Et des métaux :

La spécificité des lectines vis-à-vis des glucides a été mise en évidence en présence d'une série des saccharides pouvant éventuellement inhiber l'agglutination des hématies de lapin. :

Technique :

Dans chaque puits d'une microplaque, **50 µl** de la solution mère de lyophilisat a été diluée (1/4) puis déposé, Tout en ajoutant **50 µl** de solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de Na Cl 0,9%) (**Annexe 04**) (**Mannitol, Ribose, Fructose, D.Sorbitole, Saccharide Sodique, Sucrose, Lactose, Glusamine Hcl, Xylose, Mannose, Glucose, Cellebiose, Maltose, Galactose, Arabinose**), Et glycoprotéines qui est le **BSA** .Et les métaux (**Chlorure de : sulfate, cobalt, cuivre, cuivre II, Sodium, Potassium, Etain II, Baruim, Aluminium**).

Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, cela va permettre au lectine de reconnaître le sucre, **50 µl** des hématies du lapin à 3% ont été rajoutées. Après une heure la lecture a été faite à l'œil nu.

Tableau 11 : Tableau des saccharides et glycoprotéines du test d'inhibition de l'hémagglutination

Type de sucre	Le nom	Poids moléculaire g/mol
Disaccharides	Maltose	323,3
	Lactose	342,3
	saccharose	342,3
Monosaccharide	Glucosamine (HCL)	179,1711
	Glucose	180,156
	Galactose	180,156
	Fucose	164,1565
	Mannose	180,156
	Sucrose	759,3459

Monosaccharide	Xylose	150,13
	Cellobiose	342,3
	Arabinose	150,13
	Mannitol	182,172
	Ribose	150,13
	Fructose	180,16
	Saccharide Sodique	183,18
glycoprotéine	BSA	66,3KDA

2.8.4 - L'effet de la température sur l'agglutination :

12mg de lyophilisat a été mis en suspension dans **800µl** de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4).

Dans 5 tubes à essai, **100µl** de la solution du lyophilisat a été versé, ces derniers ont été incubés à des températures différentes (**40, 60, 80 et 90°C**) dans un bain marie durant **1h** de temps. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à température ambiante, enfin le test d'agglutination a été fait.

2.8.5 - L'effet du pH sur l'hémagglutination :

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante a été déterminé par la mise en œuvre de test hémagglutinante des lectines en utilisant le tampon PBS à différentes valeurs de pH en allant de 2 à 12.

Le test est réalisé comme suit :

Dans chaque premier puits de chaque ligne de la microplaque, sont déposés 50µl de tampon phosphate (à différentes valeurs de pH en allant de 2 à 12) et 50µl de la solution mère de lyophilisat (12 mg/800µl PBS). dans tous les autres puits et pas uniquement au premier, une

cascade de doubles dilutions est ensuite réalisée dans les puits suivants, l'opération est répétée pour tous les autres valeurs de pH. Un puits de la microplaque est réservé aux témoins négatifs (50µl tampon PBS), Les hématies de lapins sont rajoutées à tous les puits et la lecture est faite après une heure d'incubation à température ambiante.

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

La spécificité de groupe sanguin de l'extrait a été établie à l'aide des érythrocytes des différents groupes du système ABO. L'étude a été effectuée sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO. 50 µl de la solution mère de notre lyophilisat ont été déposés dans un puits d'une microplaque suivis de 50 µl des hématies d'un groupe du sang humain préparés au part avant. Après 1h l'observation a été faite à l'œil nu.



Chapitre V:

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Le test d'agglutination :

Le but est de trouver des lectines par la méthode d'hémagglutination qui repose sur l'observation de l'agglutination ou l'agrégation des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse homogène.

Le tableau suivant représente l'hémagglutination des hématies du lapin avec le surnageant de notre échantillon.

Tableau12 : Résultats d'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut de la noix de muscade.

Plante	test d'agglutination
Noix de muscade	++

- ++ : forte agglutination.

L'extrait du gland du chêne montre une bonne agglutination vis-à-vis des hématies du lapin qui a été observé à l'œil nu .cette observation est due à la fixation des lectines avec les sucres présents à la surface des hématies. ce qui prouve que notre plantes contient des lectines . Ces dernières sont capables d'interagir avec des globules rouges ; cette interaction entre les lectines et les hématies se manifeste lors du dépôt des lectines au fond de puits et l'ajout des hématies ; ces derniers vont sédimenter au niveau du puits dès lors dépôt et former un réseau entre les hématies et les lectines, c'est le phénomène d'agglutination.

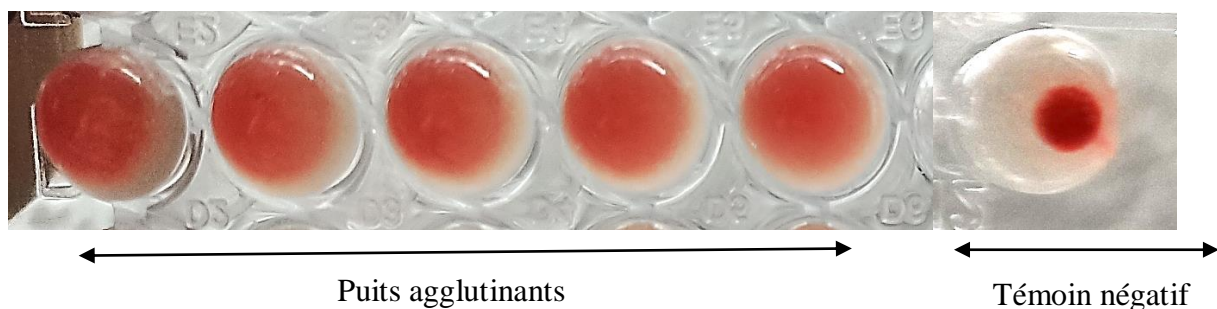


Figure 12 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de la noix de muscade.

Nos résultats montrent clairement que notre surnageant présente une forte agglutination et par conséquent contiennent une forte concentration en lectines, Le potentiel d'agglutination des lectines a été étudié en utilisant des érythrocytes natifs de lapin ce qui a montré une bonne agglutination.

Ces résultats ont été similaires à ceux des lectines extraites des racines des plantes de *Moringa G* et *Moringa M* et qui ont montré également de très fortes agglutinations lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes de lapin (Necib et al.,2014). par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que *Sinapis alba* et *Brassica fruticulosa* (Deeksha et al.,2015) .

2. Dosage des protéines pour l'extrait brut :

Tableau 13 : Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration :

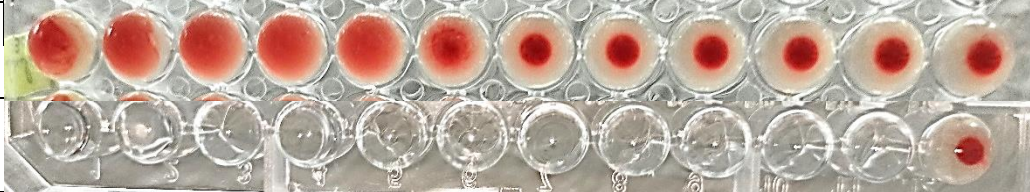

DO à $\lambda=260\text{nm}$	DO à $\lambda=280\text{nm}$	Concentration (mg/ml)
0,278 Dilution 1/100	0,235 Dilution 1/100	0,153

3. Test de la limite d'hémagglutination :

La limite d'hémagglutination est utilisée pour mettre en évidence soit la concentration minimale montrant une agglutination ou encore, la dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus lors du test de la limite d'hémagglutination.

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

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

- **extrait Brut** : (50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).
- **témoin négatif** : (50 µl de PBS+50 µl des hématies à 3%).
- **Résultats** :
 - +++ : **Très forte agglutination.**
 - ++ : **Forte agglutination.**
 - + : **Faible agglutination.**
 - : **Absence d'agglutination.**

D'après les résultats obtenus, on observe sur microplaque une forte activité hémagglutinante au niveau des deux premiers puits (dilution 1/2 ; 1/4) avec des concentrations de : 76.5µg/ml et 38.25µg/ml. Le pouvoir hémagglutinant de nos lectines commence à diminuer progressivement dans les quatre puits suivants allant jusqu'au sixième puits (dilution 1/64) avec respectivement les concentrations : 19.12µg/ml ; 9,56µg/ml ; 4,78µg/ml ; 2,39 µg/ml, alors qu'il disparaît complètement au niveau du septième puits (dilution 1/128) avec une unité hémagglutinante (UH) de : 1.19 µg/ml.

Unité hémagglutinante (UH) : est définie comme le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Les résultats montrent que ces glycoprotéines possèdent des propriétés d'hémagglutination assez intéressantes puisqu'elles peuvent causer une hémagglutination des érythrocytes de lapin jusqu'à : 1,19 µg/ml.

Ces résultats sont plus importants que d'autres lectines de fruits de la famille *Moracées* (*Morus nigra*) qui ont présentés une moyenne d'activité **16 UH** (Derri, 2015).

Ces résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines contenues dans le champignon « *Térfezia Boudiéri* » appelé truffe blanche (champignon du Sahara algérien), ces dernières ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes jusqu'à 3,5µg/ml (Zitouni et al., 2014).


Tableau 15 : concentration des protéines en fonction des dilutions en (mg/ml) à 280nm et 260nm

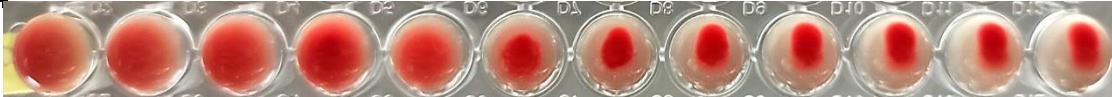
Dilution	[extrait] (mg/ml)	dilution	[extrait] (mg/ml)
1/2	0,0765	1/128	0,0012
1/4	0,0382	1/256	0,0006
1/8	0,0191	1/512	0,0003
1/16	0,0095	1/1024	0,00015
1/32	0,0048	1/2048	0,00007
1/64	0,0024	1/4096	0,00003


4. Précipitation des lectines au sulfate d'ammonium :


Différents niveau de saturation (NH₄)₂SO₄ ont été utilisé pour purifier partiellement l'extrait brut ; ensuite une centrifugation a été faite pour chaque fraction (0-30% ; 30-50% ; 50-70% ; 70-90%) on a obtenu 4 culots ; Ensuite on fait le teste de la limite pour chaque culot.


Tableau 16 : Résultats du test de la limite de différentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait.

Fraction 0-30%	
Culot 1	
Résultats	+++ +++ ++ + - - - - - - - -

Fraction 30-50%	
Culot 2	
Résultats	+++ +++ +++ ++ + - - - - - - -

Fraction 50-75%	
Culot 3	
Résultats	+++ ++ + - - - - - - - - -

Fraction 75-90%	
Culot 4	
Résultats	++ + - - - - - - - - - -

Test négatif	
--------------	--

Résultats :

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- - : Absence d'agglutinations

Les quatre niveaux de saturation (NH₄)₂SO₄ ont été utilisés pour purifier partiellement l'extrait brut.

Le test dévoile la présence des lectines dans les quatre fractions, Et cela montre que le sulfate d'ammonium a précipité différemment dans la noix de muscade, Mais la fraction (30-50%) est la plus active de l'extrait.

Notre lectine de « La noix de muscade » a un taux de saturation par le sulfate d'ammonium différent à la lectine de l'espèce de champignon « *Agrocybe Aegerita* » qui précipité également à 80% (Chen Guang Zhao et al ,School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, China,2002).

Donc pour la suite du travail, nous avons opté pour poursuivre la purification avec la fraction la plus active à savoir la fraction précipitée à 30-50%. Cette fraction est dialysée par la suite afin d'éliminer toute trace de sulfate d'ammonium et d'impuretés avant de l'administrer dans la colonne de chromatographie.

Le tableau suivant présent la concentration en protéine pour la fraction active (30-50%) :

Tableau 17 : évaluation de la concentration de protéines présentes dans la fraction la plus active de précipitation.

culot	DO à $\lambda=260\text{nm}$ dilution1/100	DO à $\lambda=280\text{nm}$ dilution1/100	Concentration (mg/ml)
30-50%	0,165	0,177	0,149

5- La Chromatographie sur colonne de sephadex G50 :

Les résultats de la mesure d'absorbance à 280 nm après la collection de 50 fractions sont réunis dans le tableau suivant :

Tableau 18 : l'absorbance en fonction de volume d'élution.

Tubes	DO	Tubes	DO	Tubes	DO	Tubes	DO	Tubes	DO
1	0.017	12	0.163	23	0.182	34	0.037	45	0.023
2	0.008	13	0.219	24	0.141	35	0.036	46	0.022
3	0.008	14	0.271	25	0.120	36	0.043	47	0.022
4	0.008	15	0.330	26	0.101	37	0.031	48	0.028
5	0.009	16	0.413	27	0.084	38	0.031	49	0.028
6	0.008	17	0.519	28	0.078	39	0.030	50	0.028
7	0.650	18	0.554	29	0.065	40	0.030		
8	1.232	19	0.589	30	0.059	41	0.029		
9	2.469	20	0.523	31	0.052	42	0.022		
10	0.236	21	0.326	32	0.052	43	0.023		
11	0.197	22	0.242	33	0.042	44	0.032		

Eluant : PBS pH 7,4

Absorbance à 280nm

Volume de fraction : 2 ml

A l'aide de tableau précédent on a tracé la courbe représentant le profil d'élution ; l'absorbance a 280nm en fonction des tubes des différentes fractions protéiques :

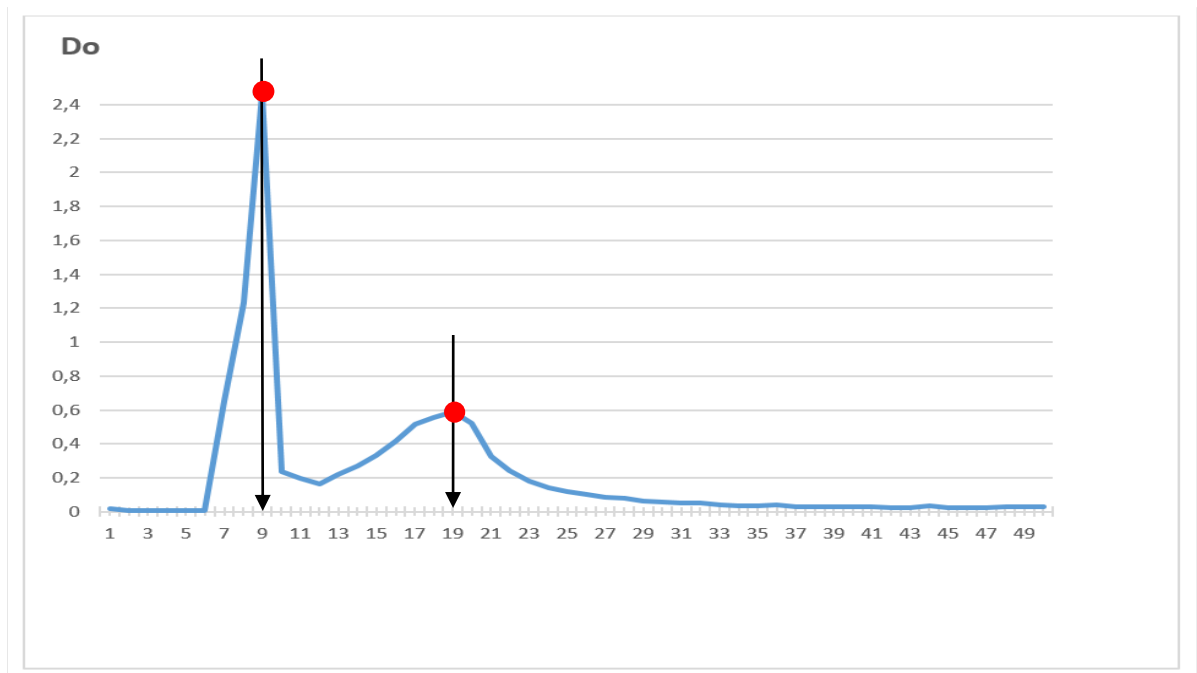



Figure 13 : Courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction des tubes des différentes fractions protéiques.

La courbe a montré 2 pics ; Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces deux tubes (9, 19), Un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin.

Pour mieux confirmer on a testé aussi les fractions actives qui ont la grande absorbance (tube 7,8)

Tableau 19 : représentation d'agglutination des fractions actives.

	Tube N° 7	Tube N° 8	Tube N° 9	Tube N° 19
				
Résultats	-	+++	+++	-

Résultats :

- +++ : très forte agglutination
- - : Absence d'agglutination

Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence de lectines dans 2 tubes (correspondant aux fractions **8** et **9**) avec une très forte hémagglutination, les deux autres tubes (**7** et **19**) correspondant à d'autres protéines. Ces résultats diffèrent de celle de *Pterocladia capillacea* séparées par chromatographie sur colonne de séphadex G 75 (Necib et al. 2015),

Par la suite les deux tubes ont été mélangés et lyophilisés pour être utilisés dans les différents tests biologiques. Plusieurs purifications sont nécessaires jusqu'à obtention d'une bonne quantité.

6- Résultats de la lyophilisation

Après avoir choisi les fractions actives issues de la chromatographie et les avoir placés dans une boîte de pétrie au congélateur ; une lyophilisation est recommandée.

Nous avons procédé à la lyophilisation des fractions concentrées pour éviter leur détérioration lors de la conservation et pour poursuivre notre purification avec le lyophilisat par une électrophorèse.

On a placé notre boîte de pétrie dans le lyophilisateur pendant 4h environ, On récupère notre boîte, On gratte le lyophilisat, on pèse notre poudre obtenue et la conserver dans un pot stérile.



Figure 14 : Poudre obtenue après lyophilisation

7- Le test d'activité d'hémagglutination de l'extrait lyophilisé :

Tableau 20 : Résultats du test d'activité hémagglutination de l'extrait lyophilisé.

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

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- - : Absence d'agglutinations

8. Test d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides, glycoprotéine,

Et les métaux :

Le test d'inhibition a été effectué avec certains saccharides (Mannitol, Ribose, Fructose, D.Sorbitole, Saccharide Sodique, Sucrose, Lactose, Glusamine Hcl, Xylose, Mannose, Glucose, Cellebiose, Maltose, Galactose, Arabinose), Et glycoprotéine qui est BSA, Et métaux qui sont (Aluminium sulfate et Chlorure de : cobalt, cuivre, cuivre II, Sodium, Potassium, Etain II, Barium, Aluminium). Pour déterminer la spécificité de l'extrait. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

A- Les saccharides et glycoprotéines :

Tableau 21 : Résultats du test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les saccharides.

	Glucose	Mannose	Xylose	Glucosamine Hcl	Lactose	Sucrose	Saccharide Sodique	D.Sorbitole	Fructose	BSA	Ribose	Mannitol
Extrait												
Résultats	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Arabinose				Galactose				Maltose			
	-				-				-			
	<p>Témoin négatif</p>											

Résultats :

+ : Inhibition

- : Pas d'inhibition

Extrait Brut : (50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).

Témoin négatif : (50 µl de PBS+50 µl des hématies à 3%)

Dans ce test on a utilisé la solution mère de lyophilisat diluée (1/4)

L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que le sucre se trouvant dans les hématies. Pour les saccharides n'ayant pas une affinité envers la lectine, celle-

ci reste libre pour qu'elle puisse reconnaître le sucre des érythrocytes, et donc provoquer une hémagglutination.

Tableau 22 : Résultats du test de la limite d'inhibition des lectines de l'extrait avec les saccharides et glycoprotéines.

	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
Glusamine Hcl												
S.Sodique												
BSA												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultats :

- + : inhibition
- : pas d'inhibition

Ces résultats montrent que le Glusamine Hcl, Saccharide sodique et le BSA montrent une inhibition de notre lectines même dans les petites concentrations (1/4096). Donc ce sont des fortes inhibiteurs.


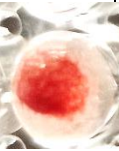
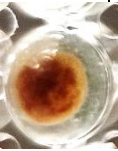






La lectine de la noix de muscade a été spécifiquement inhibé par le monosaccharide le **Glusamine Hcl** et **Saccharide Sodique** et la glycoprotéine **BSA** qui du fait qu'ils n'aient pas donné lieu à une hémagglutination, Probablement présentent une spécificité vis-à-vis de nos lectines. Ce qui n'est pas le cas pour le (**Mannitol, Ribose, Fructose, D.Sorbitole, Sucrose, Lactose, Xylose, Mannose, Glucose, Cellebiose, Maltose, Galactose, Arabinose**) qui ne présentent aucune spécificité du fait de leur agglutination vis-à-vis des hématies.

Cela révèle que la lectine n'est pas inhibée par les sucres simples uniquement mais par des glycoprotéines également.

On a comparé ces résultats avec l'extrait des fruits d'*Aegle marmelos* de la classe *Magnoliopsida*. Et *Musa paradisiac* (Banana) et les résultats ont été que ces dernières ne présentent une affinité que pour le mannose (Subramaniya, 2011) (Koshte, 1990).

B- Les métaux :

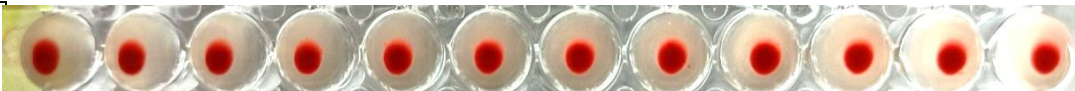
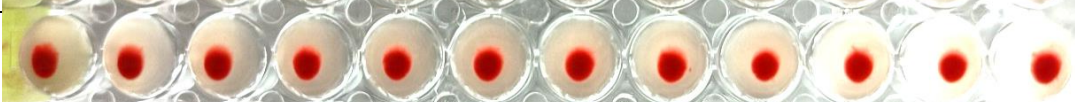
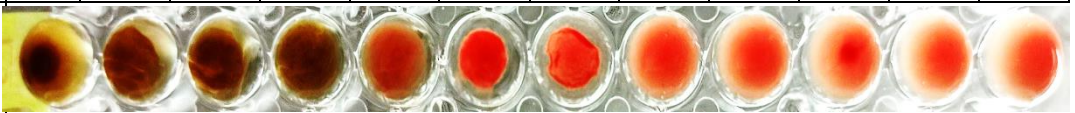
Tableau 23 : Résultats du test d'inhibition des lectines de l'extrait avec les métaux.

	Aluminium Sulfate	Chlorure de Cobalt	Chlorure de Cuivre	Chlorure de Cuivre II	Chlorure de Sodium	Chlorure de Potassium	Chlorure d'Etain	Chlorure de Barium	Chlorure d'Aluminium
Extrait									
Résultats	-	-	-	-	+	+	-	-	+

Résultats :

- + : inhibition
- : pas d'inhibition

Tableau 24 : Résultats du test de la limite d'inhibition des lectines de l'extrait avec les métaux

	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
C de sodium												
C de potassium												
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C d'Aluminium												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C = chlorure

Résultats :

- + : inhibition
- : pas d'inhibition

D'après les résultats obtenus, L'agglutination n'a pas été influencée par l'addition d'Aluminium Sulfate ou de Chlorure de : Cobalt, Cuivre, Cuivre II, Etain II, Baruim, Aluminium. Par contre une forte agglutination obtenu par l'addition de chlorure de sodium, Potassium et de chlorure d'aluminium ce qui suggère que ces dernières sont essentiels à l'activité d'agglutination, Ces résultats sont contradictoires avec les études menées sur *Geotrupes Stercorarius* (Deviet al, 2014), et *Clarias gariepinus* (Odekanyin et Kuku, 2014).

Le test de la limite d'inhibition des lectines par les métaux montre que le chlorure de sodium et chlorure de potassium peuvent donner une inhibition même dans les petites concentrations, Ils sont donc des forts inhibiteurs, L'opposé de Chlorure d'Aluminium qui montre une faible inhibition d'agglutination qui apparait dans le premier puits seulement avec les grandes concentrations, Il est donc un faible inhibiteur.

















































9. Effet de température sur l'hémagglutination :

La plupart des molécules protéiques se dénaturent aux températures élevées et par conséquent elles perdent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle.

L'augmentation de la température provoque une rupture des interactions intermoléculaires ; comme les liaisons hydrogènes qui stabilisent la structure spatiale ou la forme tridimensionnelle native. Cette dénaturation entraîne la perte totale ou partielle de l'activité biologique. Dans le cas d'une lectine, la dénaturation détruit ses capacités d'hémagglutination.

Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différentes températures 40, 60, 80, 100 et 120 °C. Sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination .

T \ D	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
20 C°												
Résultats	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
40 C°												
Résultats	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
60 C°												
Résultats	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
80 C°												
Résultats	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

100 C°												
Résultats	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
120 C°												
Résultats	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Témoin négatif												

T : Température

D : Dilution

Résultats :

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- - : Absence d'agglutinations

Le traitement thermique des lectines de la noix de muscade à différentes températures de 40, 60, 80 ,100 ,Et 120°C pendant une heure , n'est pas suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante.

A 20°C, 40 C°, Et 80 C° : Il y'a une très forte agglutination dans les trois premiers puits qui diminue ensuite dans le quatrième et cinquième puits, Et qui commence à disparaître dans le sixième puits (dilution 1/64).

A 100 C° : Il y'a une forte agglutination dans les quatre premiers puits, Et commence à disparaître dans le cinquième puits (dilution 1/32).

A 60 C° et 120 C° : Il y a une très forte agglutination au niveau des quatre premiers puits qui diminue au niveau du cinquième puits, Et elle disparaît au niveau du sixième puits (dilution 1/64)

Du coup on déduit que : 60 C° et 120 C° est la température dans laquelle les lectines de la noix de muscade donnent une activité hémagglutinante maximale. Elle est donc leur température ambiante.

Les résultats obtenus montrent que les lectines ont perdu leur activité hémagglutinante à des seuils élevés de concentrations, on en déduit que même si les lectines ont résisté à des degrés élevés de température (120 C°), Elles n'ont pas pour autant gardé l'intégralité de leur pouvoir hémagglutinant, Il se peut que les lectines ont été dénaturées, Mais pas totalement, il y aurait probablement eu un réarrangement moléculaire en vue de garder l'intégrité du site de reconnaissance spécifique des sucres.

Les lectines présentes dans la noix de muscade sont similaires aux lectines du champignon « *Ganodermacapense* », ces dernières ont une thermo-stabilité (thermo-résistante) spectaculaire, leur activité hémagglutinante n'est pas affectée même après exposition à 100°C pendant 60 minutes. (Patrick H.K Ngai, 2004).



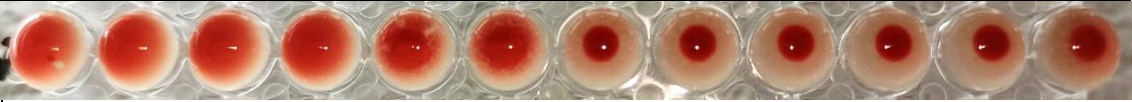

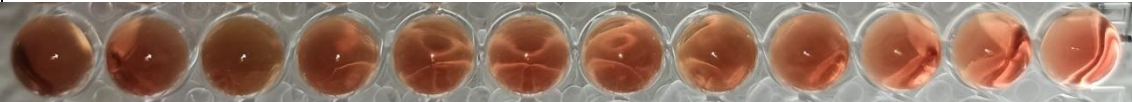

Comme est le cas des lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* et les racines des plantes *Cyperus rotundus*, *Pistacia Lentiscus* et *Ruta graveolens* pousse jusqu'à 100°C (Necib et al, 2015).

10. Effet de pH sur l'hémagglutination :

L'activité hémagglutinante de la solution mère de notre lyophilisat a été testée à différents pH ; les résultats obtenus sont dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Résultats du test de l'effet de pH sur l'activité hémagglutinante.

	Dilution											
pH	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
1												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3												
Résultats	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4												
Résultats	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5												
Résultats	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6												
Résultats	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
7												
Résultats	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

8												
Résultats	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9												
Résultats	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
10												
Résultats	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
11												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12												
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin négatif												

Résultats :

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- - : Absence d'agglutinations

D'après les résultats obtenus :

L'activité d'agglutination des lectines de la noix de muscade est stable dans un intervalle allant de [3 à 10] alors qu'elle est absente de [1 à 2] et [11 à 12].

Ces lectines ont une faible activité à pH acide (Ph= 3,4 et 5) avec une perte totale d'activité à pH=1 et pH=2 ; au-delà du ph=6 l'activité augmente jusqu'à atteinte d'une valeur maximale dans un zone neutre-basique de PH compris entre [6 et 10] pour devienne disparaître à pH compris entre 11 et 12 ; Ceci montre que les lectines de la noix de muscade restent stables toute au long de la gamme du pH de [3à10]. Et qu'elles exercent mieux leur pouvoir hémagglutinant sur les érythrocytes à pH basique qu'à pH acide.

Les résultats obtenus sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines du champignon « *Ganoderma capense* », L'activité hémagglutinante de ces lectines est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11. (Patrick H.K Ngai, 2004).

11. Le test des hématies humaines ABO :

Tableau 27 : Résultats du test d'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait lyophilisé de la noix de muscade.

Groupe sanguine	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	
A													
B													
AB													
O													
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Témoin négatif													
Résultats	-	-	-	Avec le sang humain				Avec le sang du lapin				+	+

Résultats :

- + : **très forte agglutination**
- - : **Absence d'agglutinations**

L'extrait lyophilisé de la noix de muscade n'agglutine avec aucun type de groupe sanguin humain, Ces résultats sont contradictoires avec les études réalisées sur *Diplotaxis assurgens*, *Raphanus sativus*, *Brassica tournifortii* et *Geotrupes Stercorarius* (Devi et al, 2014, Deeksha et al, 2015). Qui agglutinent les érythrocytes de tous les groupes Sanguins humains.

Conclusion générale :

Les lectines occupent désormais une place prépondérante dans le monde de la biologie, notamment l'immunologie, La biologie cellulaire et moléculaire. Ces glycoprotéines ont des propriétés diverses qui doivent être pleinement exploitées.

Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires qui se lient spécifiquement à différents motifs de sucres en raison de leur hydrate de carbone du domaine de reconnaissance.

Dans le cadre des travaux de recherche effectués, Nous nous sommes intéressés à la caractérisation partielle des lectines extraites à partir de la noix de muscade, Après séchage et extraction dans un tampon PBS (0.01M, pH 7.4) et une macération à froid pendant 24 heures, La détection et la quantification des lectines est réalisée par différents tests d'hémagglutination. Nous avons déduit que les lectines de la noix de muscade avaient la capacité d'agglutiner les érythrocytes, Et c'est à partir de là que nous avons poussé nos recherches en effectuant plusieurs autres tests biologiques.

L'extrait brut de la noix de muscade a subi une précipitation graduelle par le sulfate d'ammonium à froid. L'analyse de l'activité agglutinante de fractions précipitées montre que c'est la fraction 30-50% qui est la plus riche en lectine.

Après dessalage par dialyse au contact du PBS, Nous avons procédé à une purification par le biais d'une chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50. Le résultat obtenu nous révèle une courbe dans laquelle est mis en évidence deux pics d'activité représentant les lectines.

La lyophilisation des fractions actives a donné une quantité importante de lyophilisat de notre lectines adéquat pour faire les différents tests de leurs propriétés.

Nos recherches ont montré que ces lectines pouvaient résister à des seuils élevés de température, Leur thermo-stabilité s'étend jusqu'à 120 °C, Et l'activité d'agglutination de ces lectines est stable dans un intervalle allant de [3 à 10].

De plus, Nous avons démontré que ces lectines avaient une affinité avec les saccharides dont : Le saccharide sodique le Glusamin Hcl. Ces derniers peuvent adhérer au site de reconnaissance des lectines,

La BSA qui est une glycoprotéine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines de la noix.

Ces lectines n'agglutinent avec aucuns types de groupe sanguins humains, Donc nous ne pouvons classer les lectines de la noix de muscade dans la catégorie des lectines agglutinant les érythrocytes des groupes sanguins humains.

Perspectives :

Les travaux que nous avons effectués sont une initiation à de nombreux 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 :

- Contrôle de la pureté et estimation des poids moléculaire par SDS-PAGE.
- Purifier les lectine par chromatographie d'affinité, HPLC ...
- Faire une spectrophotométrie de masse pour déterminer la masse moléculaire et la structure de la lectine, La séquence glucidique.
- Ce travail mériterait également d'être étoffé par une étude cristallographique en vue de déterminer les structures en 3D des lectines et ainsi les comparer avec d'autres structures connues.
- Les résultats de ces recherches pourraient également être suivis par des études sur :
 - L'Activité antioxydante.
 - L'Activité immunologique.
 - L'Activité anticancéreuse.

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

Référence :

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.

Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014) .Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*.172, 672–686.

Antonio RL, Kozasa EH, Galduroz JC, Dawa Dorjee Y, Kalsang T, Norbu T, Tenzin T, Rodrigues E (2013). Formulas used by Tibetan doctors at Men-Tsee-Khang in India for the treatment of neuropsychiatric disorders and their correlation with pharmacological data. *Phytother Res* 27:552–563.

ATALAH. B. A., DE VLEESSCHAUWER. D., XU. J., FOUQUAERT. E., HÖFTE. M., VAN DAMME. E. J. Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins towards important abiotic and biotic stresses. *J. Plant Physiol*, **2014**. 171: 986–992.

Ayméric J-L, Lefranc G. (2009). *Immunologie Humaine*. De Boeck & Laccier S.A. Paris.24.

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

Banwell JG. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial over growth in the rat. *Gastroenrology*. 84, 506-515.

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

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

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

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

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

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

Brooker C. (2001) .Le corps humain: étude, structure et fonction, le rôle infirmer dans la pratique clinique. 2ème édition .DE BOECK .196.

Références et bibliographies

Budu, C. V. (1988), isolation of two lectins from fir (*Abies alba* mill) bark tissue on immobilized peroxidase and some of their properties. Preliminary study. *Rev. roum Biochim.*, 25 (1) :3-7.

CABI Crop protection compendium. (2008). Marcelle, G. B. (1995). Production, handling and their culinary uses.

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

Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de langerhans : la langérine. *Chimie et sciences du vivant*. Université de Grenoble. 2012. pp 63-64.

Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST, (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. pp 2454–2458.

Dam TK and Brewer CF. (2002) . Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*102, 387-429.

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

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

DEEKSHA. M., SANGHA. K., KHURANA. D. S., KAUR. G., BALA. M., SINGH. B (2015).Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch*. 3(1) : 20-24.

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

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

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

Falasca A I. (1989) . Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *FEBS Lett.* 246(1-2), 159 -162.

Gabius HJ, Springer WR and Barondes SH. (1985). Receptor for the cell binding site of discoidin I. *Cell*.(42),449-456.

Références et bibliographies

- Ghopskins W, Evrard C-M. (2003).** Physiologie Végétale. DE BOECK.1ère édition , 104-105.
- Giollant, M., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., and Didier, E. (1993)** Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus* - research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol.*, 101, 513-522.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S et al. (2008).**Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract ankaferd blood steeper. *Jint. Med. Res* (36) , 163-170.
- Goldstein I J , Hughes R C , Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980).** What should be called a lectin? *Nature*.285, 66.
- GOLDSTEIN. I. J., HAYES.C.E.** the lectincarbogydrat binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohdr. Chem. Biochem*, **1978**. 35: 127-334.
- GOLDSTEIN. I. J., PORETZ. R. D.** isolation, physicochemical, caracterization and carbhydat-binding spificity of lectins in LIENER. I. E., SHARON. N., GOLDSTEIN. I. J. *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, Orlando, **1986**. 35-229.
- Guénard H et al.(2001).** Physiologie humaine. 3ème édition. PARDEL , 497.
- Guillaume J. (1993).** Nutrition et Alimentation des Poisson et Crustacés. Terrain,396.
- Guillot J, Guerry M, Kanska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M and Penault-Llorca F. (2004).** Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*. 91, 141-158.
- HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S.** lectins : proteins with diverse application. *J. Appl. Pharm Sci*, **2013**. 31:93-103.
- Higuichi M., Fukumoto, y. And Iwai, K. (1988).**Appearence of lectin in winged bean pods during seed development after flowering. *J. Agric. Food Chem.* 36 (3) : 534-53. *.Glycoconj.J.*,21,35-40.
- Hirabayashi,J (2004)** Lectin-based structural glycomics:glycoproteomics and glycan.
- Houles, C. (2001).** Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes a la jacline. L'institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp : 11-35.
- Houles, C. (2001).** Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes a la jacline. L'institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp : 11-35.

Références et bibliographies

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 and Varrot A. (2008). Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 567-576.

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

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

Jean Marie pelt,Ed. Fayard. (2002). Les épices.

Karoline S.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Université Grenoble 1- Joseph Fourier.

Karoline S.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Université Grenoble 1- Joseph Fourier.

Kawsar S A, Aftabuddin S, Yasuimitsu H, Ozeki Y. (2010). The cytotoxic activity of two D-galactose binding lectins purified from marine invertebrates. *Arch. Biol. Sci. Belgarde* 62(4), 1027-1034.

KENOTH. R. Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichsanthes cucumerina* seed lectin. *Eur. J. Biochem*, 2001. 268: 5541-5549.

Khan IA, Abourashed EA. (2010). Nutmeg. In: Khan IA, Abourashed EA (eds) *Leung's encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*, 3rd edn. Wiley, Hoboken, pp 467–470.

Kokourek,J. and Horejsi,V.(1981).Definong a lectin .*Nature* ,290,188.

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

Kostlanova, N., Mitchell, E.P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gilboa garber,N., Chambat, G., Wimmerowa, M. and Imberty, A. (2005) The fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum*: a new type of b-propeller architecture.

Références et bibliographies

- LAM. S. K., NG. T. B.** Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, **2010**. 17: 457–462.
- LEE, Y.C. and LEE, R.T. (1995)** Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.
- LEE. J. Y., KIM. J. Y., LEE. Y. G., BYEON. S. E., KIM. B. H., RHEE. M. H., CHO. J. Y.** In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **2007**. 30(11): 2043-2051.
- Lenka S, Imberty A, Jaroslave K. (2006).**modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransférases. *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 mediate cellular recognition. *Chem. Rev* 98, 673-674.
- Lis, H. and Sharon, N. (1998)** Lectins carbohydrate-specific proteins that mediate cellular Recognition.*Chem.Rev.*, 98,637-674.
- Meite A , Kauame K G , Kati-Coulibaly S. (2006).** Substances antinutritionnelles. *Méd.Nut* 42(4), 179-187.
- Merritt, E.A., and Hol, W.G.J. (1995)** AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 165 171.
- Milton G. (2000).** Nathaniel’s Nutmeg. Hodder and Stoughton, London .
- Mukherjee S , Zheng H , Derebe M G, Callenberg K M , Partch C L, Rollins D , Prophter D C, Jiang Q X.(2014).** Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*. 505, 103–107.
- MURDOCK. L. L., SHADE. R. E.** Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectects. *J. Agric. Food. Chem*, **2002**. 50 (22): 6605-661.
- Nachbar M S , Oppenheim J D.(1980).** Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2238 -2345.
- Necib Y, Bahi A, Merouane F , Bouadi H , Boulahrouf K .(2015).**comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1720-1733.

Références et bibliographies

Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2014). Immunomodulatory activity of lectin extrated from THE RED MARINE ALGA PTEROCLADIELLA CAPILLACEA .Volume 4. Issue 1, 1693-1706.

Newsmaster SG, S Ragupathy. (2009). Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae) Molecular Ecology Resources, 9, pp. 172-180.

Odekanyin O O, Kuku A. (2014). caracterization of galactosespecific lectin from the skin mucus of african catfish clarias gariepinus burchell. 1822. Acadimic jornsals. 9(20), 869-879.

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

Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008) Chemical tools for functional studies of glycans. Chem. Soc. Rev., 37, 1579-1591.

Patrick H.K Ngai Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 314, Issue 4, 20 February 2004, Pages 988–993.

Pemberton 1994. Agglutinins from some british higher fungi. Mycol.Res., 98, 277-290.

PEUMANS. W. J., VAN DAMME. E. J. lectine as plant defense proteins. Plant Physiol, 1995. 109:347-352.

Poiroux G. (2011). Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photochimiothérapie. Biologie cellulaire et biochimie. Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier. Pp, 35-50.

Pontet M. (1996). Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales: les galectines. Immunoanal.Biol. Spéc 11,297-305.

QIU. Y., XI. J., DU. L., ROJE. S., POOVAIAH. B. W. A dual regulatory role of arabidopsis calreticulin-2 in plant innate immunity. Plant J, 2012. 69: 489–500.

RAMATA N. (2010). Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de *Abrus precatorius* L. la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako. PP 8-24.

Ramé A, Naccache P. (2001). Transfusion sanguine. LAMARRE ,05 .

RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G. Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans* vogel. Biologie Structurale et Nanobiologie. France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, 2011. p: 11.

Références et bibliographies

- REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOYON. S. H .** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *The Journal of Phytopharmacology*, **2014**. 3(1): 44-51.
- Richard H T. (1998)**. Application of lectin histochemistry and cytochemistry in diagnostic and prognosis. *Methods molecular medicine* 9 , 73-94.
- Robert K, Marry MD, PhD. (2008)**. Les glycoprotéines in *Biochimie de Harper*. DEBOECK ,527.
- Roos A, Daha M R, Vanpelt J, Berger S P. (2007)**. Lectine liant le mannose dans les maladies rénales. *Flammarion-Médecine-Science-Actualités Néphrologiques* 13 , 134- 157.
- Rüdiger, H. (1993)** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, pp.31-46.
- Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014)**. "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.
- Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014)**. "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.
- Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014)**. "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.
- Sharon N and Halima, Lis. (2003)**. *Lectins*. Kluwer Academic Publishers.
- Sharon N, Lis H. (1993)**. Carbohydrate in cell recognition. *Scientific American*.268(1), 82-89.
- Sharon N. (1983)**. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34. 213-291.
- Sharon N. (1996)**. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*408, 1-8.
- SHARON. N., LIS. H.** Legume lectins-A large family of homologous proteins. *FASEB J*, **1990**. 4: 3198–3208.
- She Q B, NG T B, Liu W K A.(1998)**. novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*.247, 106-111.
- Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005)**. Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.

Références et bibliographies

Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.*, 181, 1059-1071.

SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUEBARREIRA. M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, **2013**. 30:641-657. **Suzuki, T., Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi and H. Dohra et al, 2009.** Purification characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens* biosci.

Steeves RAD. (2011). An intrageneric and intraspecific study of morphological and genetic variation in the neotropical *Compsonera* and *Virola* (Myristicaceae) [Thesis], The University of Guelph, Canada.

Subramaniya, B.R., Malliga, R.M., Nirmal, K.K., Sivasitambaram, N.D. (2011). " Isolation and Partial Characterisation of a Novel Lectin from *Aegle marmelos* Fruit and Its Effect on Adherence and Invasion of *Shigellae* to HT29 Cells". *Plos one*.

Sumner J B, Howell SF. (1936). Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32(2), 227-237.

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

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

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

Van Liempt, E., et al. (2006) Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucosecontaining glycans. *FEBS Lett*, 580, 6123-6131.

Warburg ET Christian W, (1941). Isolierung-und Kristallisation des garungsferments Enolase. *Biochem.Z.*, 310,384-421.

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 *marsupenaus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 2014. 44, 397–405.

Références et bibliographies

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

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.

Zhang H , Peatman E , Liu H , Feng T , Chen L , Liu Z.(2012). Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2012. 32 , 598-608.

Zitouni. A ; Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de *Terfezia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara) **2014.**



Annexe

Annexe

Annexe 1 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1M ; pH=7,4)

Pour 1000ml de PBS

Réactif	Concentration	Quantité
Phosphate di-sodique (Na ₂ HPO ₄)	10 mM	144g
Phosphate de mon potassium (KH ₂ PO ₄)	2 mM	0.24g
Chlorure de Sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de Potassium (KCl)	2,7 mM	0.2g
Eau distillée	/	1L

Annexe 2 : Préparation de NaCl à 0.9%

Chlorure de Sodium (NaCl)	Eau distillée
0,9g	100ml

Annexe 3 : Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																			
	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
	5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
	10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
	15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
	20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
	30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
	35				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	461	35
	40					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	40
	45						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	388	45
	50							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	352	50
	55								0	31	62	95	129	164	201	239	279	317	55
	60									0	31	63	97	132	168	205	244	281	60
	65										0	32	65	99	134	171	209	245	65
	70											0	32	66	101	137	174	209	70
	75												0	32	66	101	137	174	75
	80													0	33	67	103	139	80
	85														0	34	68	105	85
	90															0	34	70	90
	95																0	35	95
	100																	0	100

% solution initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Annexe 4 : Préparation des monosaccharides

Sucre	NaCl
0,1g	1ml

Année universitaire : *2020/2021*

Présentée par : *RAHIL Tawfik*

SEBAHI Ala eddine

Purification et caractérisation partielle des lectines de la noix de muscade (*Myristicaceae*)

Mémoire de fin d'étude de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé :

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, Multivalentes de nature non-immunitaires qui sont capables de reconnaître et se lier spécifiquement et de manière réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexes sans modifier la structure covalente des ligands glycosylés reconnus, qui provoquent dans certains cas l'agglutination des érythrocytes.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines dans la noix de muscade (*Myristicaceae*), Pour cela ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs testes afin d'y rechercher une activité hémagglutinante suivi par un test de limite de cette dernière.

Avant l'étude des propriétés de nos lectines une purification des protéines a été réalisée par chromatographie sur gel de Séphadex G50, Puis une lyophilisation a été réalisée aux 2 fractions obtenues de cette dernière qui ont une activité hémagglutinante.

Ces protéines qui ont étaient extraites sont soumises à différents tests de propriétés, qui nous ont permis de nous rendre compte de la stabilité de leur pHi qui est compris entre la gamme ph 3 à ph 10, Leur très bonne thermo-stabilité qui malgré des températures extrêmes (de 20°C jusqu'à 120°C) cela n'était pas suffisant pour leur inactivation.

Un test d'inhibition a été aussi réalisé par la suite avec différents sucres et métaux qui a montré pour ce dernier une spécificité pour le glutamine Hcl, Le saccharide sodique et le BSA. Avec une forte inhibition obtenue par l'addition de chlorure de sodium, Potassium et de chlorure d'aluminium.

Un autre test d'agglutination des hématies humaines (Système ABO) avec nos lectines montre que ces protéines n'agglutinent avec aucun type de groupe sanguin humain.

Mots clés : Lectines; Activité hémagglutinante; Inhibition; Purification; Système ABO.

Laboratoire de recherche : **BIOCHIMIE**

Jury d'évaluation :

Président du jury : **Necib .Y** **Professeur – UFM Constantine**

Encadreur : **Zitouni .A** **Maitre de Conférence – UFM Constantine**

Examineurs : **Boulahrouf .K** **Maitre-assistant – UFM Constantine**

Date de soutenance : 23/09/2021