

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Les lectines dans le monde de la glycobiologie

Présenté par : MORDJANA Nihad

Le 20/06/2022

BECHARA Mimouna

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mr Zitouni. A (Maitre de conférences B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinateur 1 : Mr Nacib.Y (Professeur- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinateur 2 : Mr Boulahrouf.k (Maitre de conférence B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

Remerciements :

En tout premier lieu, nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur **Monsieur ZITOUNI** Maître de conférences catégorie B à L'Université des Frères Mentouri Constantine pour avoir dirigé ce travail, pour toute la compréhension qu'il a montrée, la disponibilité et la patience dont il a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, pour sa générosité scientifique, sa gentillesse, ses conseils précieux et les encouragements qu'il nous a prodigué tout au long de ce mémoire.*

*C'est 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 acceptant de présider et d'examiner ce mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi à l'examineur de ce mémoire, **Monsieur BOULAHROUF.K** Maître de conférences catégorie B à l'Université des Frères Mentouri de Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez participé au jury de ce mémoire.*

Enfin, Nos remerciements que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tous ceux qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience.

Dédicace :

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 ma mère Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit. Que tes sacrifices, tes peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Ce travail est également le fruit de ton amour, tes bénédictions et surtout ta bonne éducation.

A mes chers frères : Abderrahmane et Aymen Pour leur appui et leur encouragement durant ces années d'études.

A mon grand-père Messaoudé et ma grande mère Fatima merci d'être toujours là pour moi.

A mes chères cousines Wafa et Amel.

A toute ma famille et tous ceux qui ont participé de près et de loin à mon succès A tous ceux-là, je voudrais exprimer haut et fort, et en toute âme et conscience, ma gratitude et mes remerciements pour leur soutien permanent et infini.

Je ne saurais comment remercier mes chères amies en particulier Imen Ghoumazi ,Mina Belbekri ,Lyna Zitouni , Ikrem Bensihamdi , Jihene Ramoule et mon binôme Mimouna , qui ont été là pour moi et qui m'ont soutenue et tendue la main quand j'en ai besoin.

Nihad

Dédicace

A mon père :

L'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Que dieu lui garde dans son vaste paradis.

A ma mère :

Pour son amour, et qu'elle m'a toujours accordé en témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse.

Merci d'avoir été toujours là, pour moi.

A la lumière de mes jours, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur : Mon frère « Chouaïb ».

A mes sœurs « Amína et Rokía », un énorme merci pour votre aide et soutien.

A ma belle « Ilham », mon armure, je te souhaite tous le bonheur du monde .

A mon soutien moral et source de joie et de bonheur « Chams El Acil ».

A toute ma famille, merci beaucoup pour votre soutien.

A toutes mes amies : Rayane, Dounia, Racha, Achouak, et mon binôme « Nihad », je vous souhaite une vie pleine de succès.

Mimouna

Sommaire

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION :	1
➤ L'objectif du travail :	2
DEFINITION :	3
HISTORIQUE :	4
STRUCTURE :	7
- Les lectines simples.....	7
- Les lectines mosaïque :	8
- Les assemblages macromoléculaires	8
- Structure tridimensionnelle	9
SPECIFICITE ET AFFINITE DES LECTINES :	9
➤ Le site de reconnaissance	9
Distribution des lectines dans le monde vivant :.....	10
➤ Les lectines présentes chez les plantes :	11
• Fonction de lectine chez les plantes :.....	12
• Classification des lectines :.....	12
Lectine des microorganismes :	13
a. Les lectines bactériennes.....	14
b. Les lectines fimbriales.....	14
c- Les toxines :.....	15
d- les lectine soluble :.....	16
- Les lectines de champignon :	17
- Caractéristiques :.....	17
- Rôles :.....	18
➤ Les lectines animales :	18
- Lectines intracellulaires.....	18
- Lectines extracellulaires.....	18
LE ROLE DES LECTINES DANS L'ORGANISME VIVANT :	18

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES LECTINES : LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES LECTINES SONT MULTIPLES ET VARIEES	20
--	-----------

LES UTILISATIONS ET LES APPLICATIONS DES LECTINES.....	22
---	-----------

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 01 GENERALITE SUR LES PLANTES

INTRODUCTION :.....	25
----------------------------	-----------

1. L'AGROCYBEAEGERITA :.....	26
-------------------------------------	-----------

➤ Définition :.....	26
----------------------------	-----------

➤ Classification scientifique du Pholiote du Peuplier :.....	26
---	-----------

2. SPERGULARIA RUBRA L JET PEST	27
--	-----------

➤ Noms communs	27
-----------------------------	-----------

➤ Nom scientifique.....	27
--------------------------------	-----------

➤ Définition:	27
----------------------------	-----------

➤ Classification de Spergularia Rubra :	28
--	-----------

3. EUCALYPTUS GLOBULUS.....	28
------------------------------------	-----------

➤ Origine du nom	28
-------------------------------	-----------

➤ Noms communs	28
-----------------------------	-----------

➤ Définition.....	28
--------------------------	-----------

➤ Classification.....	29
------------------------------	-----------

❖ PREPARATION DE L'ECHANTILLON :	30
---	-----------

CHAPITRE 02 MATERIELS ET METHODES

1. Dosage des protéines :.....	32
---------------------------------------	-----------

2. Test d'hémagglutination :	32
---	-----------

3. Test de la limite d'hémagglutination.....	32
---	-----------

4.	Effet de la température sur l'hémagglutination	33
5.	Effet de la température sur la limite d'hémagglutination.....	33
6.	Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et de glycoprotéines :	33
7.	Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines	34
8.	Chromatographie :.....	34
	8-1 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50	34
	8-2 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G200	34
	8-3 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G75	35
9.	L'effet du pH sur l'hémagglutination :.....	35
	9-1 Des champignon « l'Agrocybe Aegerita».....	35
	9-2 Des plantes	36
10.	Testes concernant le champignon « l'Agrocybe Aegerita » :	36
	➤ Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.....	36
	➤ Electrophorèse SDS-PAGE :	37
	➤ ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR (Pharm. Méd. Trad. Afr. 2001, VoU 1, pp. 1-11,ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA RACINE DE PLUCHEA OVALIS (PERS.) DC.(ASTERACEAE) CHEZ LE RAT)	37

CHAPITRE 03 RESULTATS ET DISCUSSION

1.	DOSAGE DES PROTEINES :	41
2.	TEST D'HEMAGGLUTINATION	42
3.	TEST DES LIMITES D'HEMAGGLUTINATION :.....	43
4.	TEST DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'HEMAGGLUTINATION :	44
5.	TEST DE L'EFFET DE TEMPERATURE SUR LA LIMITE D'HEMAGGLUTINATION D'AGROCYBE AEGERITA :	45
6.	TEST DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION PAR DES SACCHARIDES ET DES GLYCOPROTEINES :.....	46
7.	TEST DE LA LIMITE D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION PAR LES SACCHARIDES ET UNE GLYCOPROTEINE :.....	48
8.	CHROMATOGRAPHIE :.....	50

8-1 chromatographies sur gel d'exclusion Séphadex G 50 :	50
8-2 L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de Séphadex G 200	51
8-3 L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Séphadex G75	52
9. TEST DE L'EFFET DU PH SUR L'HEMAGGLUTINATION.....	52
9-1 de champignon :.....	52
9-2 des plantes :	54
10. TEST CONCERNANT LE CHAMPIGNON :.....	55
➤ Précipitation au sulfate d'ammonium.....	55
➤ SDS-PAGE :.....	56
• L'ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR :	58
CHAPITRE 4 : CONCLUSION	61
ANNEXES :	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

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.

Les lectines appartiennent à une division importante d'organismes et elles présentent un large éventail d'activités biologiques importantes pour le fonctionnement de la cellule et de l'organisme entier, et ce, en raison de la haute spécificité de la liaison réversible aux hydrates de carbone. Elles sont des outils précieux largement utilisés en biologie et en médecine et aussi en diverses applications biotechnologiques.

Ici, nous passons revue une caractérisation partielle des lectines isolées à partir du champignon **AgrocybeAegerita** et les plantes : **Spergularia Rubra L jet Pest et Eucalyptus globulus**, y compris leur localisation, leurs propriétés et leurs spécificités glucidiques.

Ces protéines sont généralement extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, de leur thermo-stabilité, leurs interactions et affinités avec les sucres. Elles sont ensuite partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur gel d'exclusion. La pureté de la lectine est ensuite vérifiée par une (SDS-PAGE) dans des conditions dénaturantes.

Les effets anti-inflammatoires du champignon « *AgrocybeAegerita* » sont évalués sur les rats wistar. Une des méthodes utilisées consiste à administrer l'extrait brut de champignon par voie intra péritonéale 30 minutes avant l'induction de l'inflammation (l'œdème du pied) par 0.1ml de formaldéhyde à 2%. La drogue de référence est un anti-inflammatoire : le 'Diclofenac' 25mg.

Mots Clés : Lectines ; affinité ; Agglutination ; Purification.

ملخص

اللكتينات عبارة عن بروتينات متعددة الوجود أو جاليكوبروتينات 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 تراص الكريات الحمراء تنتمي اللكتينات إلى تقسيم رئيسي للكائنات الحية وتعرض مجموعة واسعة من الأنشطة الحيوية المهمة للخلية ووظيفة الكائن الحي، وبسبب خصوصية عالية للارتباط القابل للعكس للكائنات. الكربوهيدرات، فهي أدوات قيمة تستخدم على نطاق واسع في علم الأحياء والطب وأيضا في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية المختلفة

هنا، نستعرض ما هو معروف حاليًا عن الكريتين المعزولة من الفطر والنباتات

AgroclybeAegerita et Spergularia Rubra L jet Pest et Eucalyptus globulus

بما في ذلك خصائصها وموقعها وخصائصها الكربوهيدراتية

pHi تم استخراج هذه البروتينات واخضاعها لعدة اختبارات من أجل البحث عن نشاط هيماتوغوتينيني ، و ثباتها عند

الحرارة المناسبة لها وتفاعلاتها وارتباطاتها مع السكريات. ثم تم تنقيتها جزئيا باستخدام كروماتوجرافيا الجل المستبعدة. ثم فحص نقاء تحت ظروف غير طبيعية

تم تقييم الآثار المضادة لالتهابات من الفطريات على الفئران

يتم إعطاء المستخلص الخام من الفطر البريتوني قبل 30 دقيقة من تحريض الالتهاب (وذمة القدم) بنسبة 1.0 مل من

الفورمالدهيد بنسبة 2 ، % والمخدر هو مضاد للالتهاب. 25mg Diclofenac

تقارب-تكتل اللكتينات:-الكلمات المفتاحية

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.

Lectin a major division of organisms and exhibit a wide range of biological activities important for cell and whole organism function, and because of the high specificity of reversible binding to organisms. Carbohydrates, they are valuable tools widely used in biology and medicine and also in various biotechnological applications.

Here, we review and analyze with partial characterization what is currently known about lectins isolated from the poplar "Phyotee *AgrocybeAegerita*», *Spergularia Rubra* L jet Pest and *Eucalyptus globulus* fungus, including their location, properties and carbohydrate specificities.

These proteins were extracted and subjected to several tests in order to look for a haemagglutinante activity, to report their pHi, their thermo-stability and their interactions and affinities with the sugars. They were then partially purified using exclusion gel chromatography. The purity of the lectin was then checked by SDS-PAGE under denaturing conditions.

The anti-inflammatory effects of the "*AgrocybeAegerita*" fungus were evaluated on wistar rats weighing from. The crude extract of the fungus is administered intraperitoneally 30 minutes before the induction of inflammation (edema of the foot) by 0.1ml of formaldehyde at 2%, the reference drug is an anti-inflammatory the "*Diclofenac*"25mg.

Key Words: Lectins; affinity; Agglutination; Purification

Liste des figures :

FIGURE 1 :ROLE DE GLYCOCONJUGUES SITUES SUR LA SURFACE CELLULAIRE. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'EXEMPLES SUR LA SURFACE CELLULAIRE.REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'EXEMPLES D'INTERACTION LECTINES-GLUCIDES.	4
FIGURE 2 : REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UN MONOMERE DE CONCAVALINE A DE CANAVALLIAENSIFORMIS EN COMPLEXE AVEC LE TRIMANNOSIDE (CODE PDB 1CVN). LA PROTEINE EST REPRESENTEE PAR UN RUBAN JAUNE POUR LES BRINS B, UN RUBAN ROUGE POUR LES HELICES A ET UN FIL POUR LES AUTRES ZONES.	7
FIGURE 3 : REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UN TRIMERE D'HEMAGGLUTININE DU VIRUS INFLUENZA COMPLEXE A L'ACIDE SIALIQUE (9)	8
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE DIFFERENTS FIMBRIALDE LA BACTERIE D'ESCHERICHIA COLI (9)	8
FIGURE 5 : RECEPTEUR PAPG EN COMPLEXE AVEC LE TETRASACCHARIDE GBO4 (PDB 1J8R) (B),FIMHCOMPLEXE AVEC BUTYL-A-DMANNOPYRANOSIDE (PDB 1UWF) ET (C) UNE LECTINE FIMBRIALE F17-AG EN COMPLEXE AVEC	15
FIGURE 6 : DEUX ORIENTATIONS POUR LA SOUS-UNITE B DE LA TOXINE DU CHOLERA COMPLEXEE AVEC LE GM1 (PDB 3CHB) (MERRITT, 1995)	16
FIGURE 7: CHAPEAU D'AGROCYBE AEGERITA (MYCORANCE.FREE.FR)	26
FIGURE 8 : LA PLANTE DE SPERGULARIA RUBRA L JET PEST, (RONALD.L, ET AL.,2012)	27
FIGURE 9 : LA PLANTE D'EUCALYPTUS GLOBULUS.	29
FIGURE 10 : POUDRE D'AGROCYBE AEGERITA	30
FIGURE 11 : SCHEMA D'EXTRACTION DES LECTINES A PARTIR DE LA POUDRE DU CHAMPIGNON« AGROCYBE AEGERITA »	31
FIGURE 12 : MESURE DE L'ŒDEME DU PIED DU RAT	39
FIGURE 13 : COURBE REPRESENTANT LE PROFIL D'ELUTION DE L'ABSORBANCE EN FONCTION DU VOLUME D'ELUTION DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES	51
FIGURE 14 : LA COURBE D'ABSORBANCE DE L'EXTRAIT DES SPERGULARIA-RUBRA L JET PEST (A) APRES LEUR PASSAGE A TRAVERS LA COLONNE DE SEPHADEX G200.LES VALEURS D'ABSORBANCE A 280 NM SE TROUVE DANS LES TUBES DE 1A20	51

FIGURE 15 : COURBE REPRESENTE LA FILTRATION D'EXTRAIT D'EUCALYPTUS GLOBULUS SUR COLONNE DE SEPHADEX G75.

Liste des tableaux :

TABLEAU 1: HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DES LECTINES (RENATO ET COL, 1991)	5
TABLEAU 2: SPECIFICITE OSIDIQUE DE CERTAINES PLANTES A LECTINES (RENATO, ET COLL. 1991)	10
TABLEAU 3: QUELQUES STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DES LECTINES (15)	11
TABLEAU 4: CLASSIFICATION DES LECTINES DES PLANTES SELON VAN DAME 1995	13
TABLEAU 5 :LECTINES BACTERIENNES SOLUBLES(23)	16
TABLEAU 6:ROLES PHYSIOLOGIQUES DE QUELQUES LECTINES DANS LE MONDE VIVANT(28)	19
TABLEAU 7: LES UTILISATIONS ET LES APPLICATIONS DES LECTINES	22
TABLEAU 8: RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES DE CHAMPIGNON	41
TABLEAU 9 : RESULTATS DU TEST DE DOSAGE DES PROTEINES DE PLANTE SPERGULARIA- RUBRA-L JET PEST	41
TABLEAU 10 : RESULTATS DU TEST D’HEMAGGLUTINATION	42
TABLEAU 11 : RESULTATS DE TEST DE LA LIMITE D’HEMAGGLUTINATION	43
TABLEAU 12 : RESULTATS DE TEST DE L’EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L’HEMAGGLUTINATION	44
TABLEAU 13 : RESULTATS DU TEST DE L’EFFET DE TEMPERATURE SUR LA LIMITE D’HEMAGGLUTINATION D’AGROCYBE AEGERITA	45
TABLEAU 14 : RESULTATS DU TEST DE L’INHIBITION DE L’HEMAGGLUTINATION PAR DES SACCHARIDES ET DES GLYCOPROTEINES	46
TABLEAU 15 : RESULTATS DU TEST DE LA LIMITE D’INHIBITION DE L’HEMAGGLUTINATION PAR LES SACCHARIDES ET UNE GLYCOPROTEINE	48
TABLEAU 16 : RESULTATS DU DOSAGE DES 82 FRACTIONS OBTENUES APRES PURIFICATION DES PROTEINES	50
TABLEAU 17 : RESULTATS DE L’EFFET DU PH SUR L’HEMAGGLUTINATION DE «AGROCYBE AEGERITA »	52
TABLEAU 18 : RESULTATS DE L’EFFET DE PH SUR LES PLANTES	54
TABLEAU 19 : RESULTATS APRES PRECIPITATION AU SULFATE D’AMMONIUM	55
TABLEAU 20 : LES ECHANTILLONS SOUMIS A L’ELECTROPHORESE ET LEURS CONCENTRATIONS	56

TABLEAU 21 : VARIATION DU VOLUME DE L'ŒDEME CHEZ LES RATS TEMOINS ET TRAITES	58
TABLEAU 22 : RESULTATS DES STATISTIQUES SIGNIFICATIVES ANOVA DE L'ŒDEME	58
TABLEAU 23 : MONTRE LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES DE COMPARAISON ENTRE LES TROIS ESPECES.	61

Liste des abréviations :

pH = potentiel Hydro isoélectrique

PBS = la solution tampon phosphate di-sodique

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèses

Tris : 2-amino-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol

(NH₄)₂SO₄ : sulfate d'ammonium

PREMIERE PARTIE :

Introduction :

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 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 capables D'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique Très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes. Les méthodes anciennement utilisées pour leur identification consistent à mélanger l'extrait à Examiner (dérivé par exemple d'un tissu ou d'une plante) avec des érythrocytes en solution.

L'agglutination ou la précipitation des cellules indique que la solution analysée contient une (ou parfois plusieurs) molécules agglutinantes. Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle mais la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixante, en concomitance avec la naissance de la glycobiologie. L'intérêt était motivé surtout par l'utilisation des lectines dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides, tels que les déterminants des groupes sanguins et de glycoconjugués, surtout des glycoprotéines. La découverte majeure que certains états physiologiques et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules fut possible grâce à l'utilisation des lectines. Le nombre de travaux publiés sur les lectines a vu une grande croissance principalement grâce à l'abondance des lectines dans tous les organismes vivants, accompagné d'une certaine facilité de purification. Dans les derniers temps, on a aussi commencé à considérer les lectines comme des molécules bioactives et on s'est de plus en plus intéressé aux rôles biologiques de ces molécules. On s'est aperçu tout de suite de l'extrême variabilité des lectines, d'abord en termes de structure primaire, et à la suite des premières structures résolues par diffraction des rayons X, en termes de structure tridimensionnelle L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié sans doute a leur Capacité unique de « lire » l'information biologique qui est codifiée dans la structure Tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont en fait les récepteurs spécifiques pour les Interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de

processus de Reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures

➤ **L'objectif du travail :**

- Notre travail consiste en un recueil des différentes méthodes utilisées le plus souvent pour purifier partiellement ou complètement les lectines qui sont des glycoprotéines, procéder ensuite à leur caractérisation, et enfin étudier et mettre en évidence certaines de leurs propriétés biologiques.
- L'étude des lectines dans le monde de la glycobiologie
- Etude comparative des trois espèces différentes sur les lectines

Définition :

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, Végétale ou animale, dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un Système immunitaire (non immunitaire). Elles sont capables de reconnaître spécifiquement Des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (1). 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 (2) 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 (3) Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les Cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très Importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement Multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de 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(4) Les lectines végétales sont actuellement les seules qui soient couramment utilisées Pour caractériser ou fractionner des glycoconjugués d'origines diverses (5). La plupart des lectines présentent 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 (figure 1). Cette caractéristique est typique des Lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation (6,7)

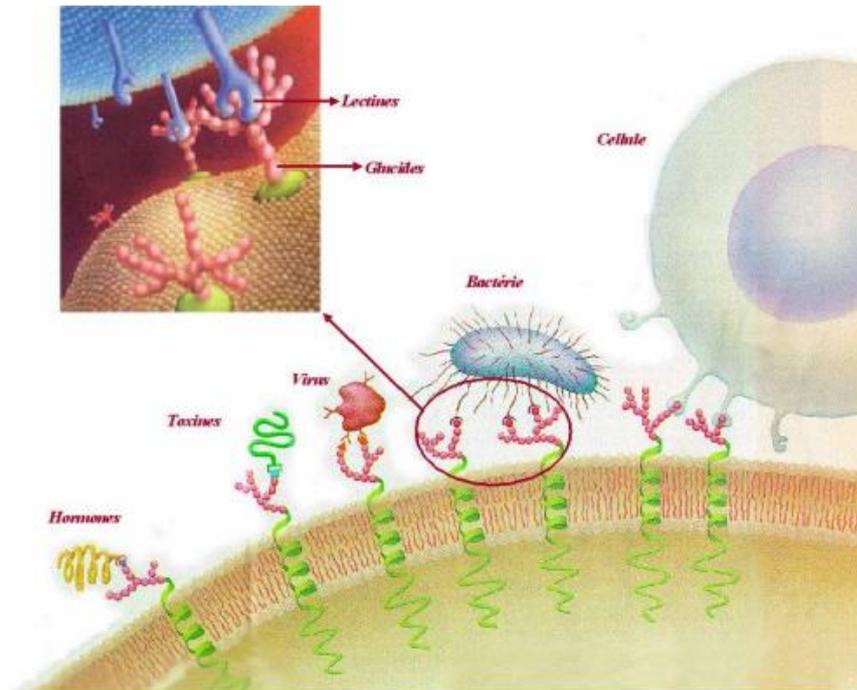


Figure 1 : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique D'exemples d'interaction lectines-glucides d'interaction lectines-glucides.

Historique :

En 1888, P. H Stillmarka découvre la première lectine qu'il décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes. (8) A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. Ensuite P. Ehrlich découvre la même activité dans l'extrait du pois rouge (*Abrus precatorius*).

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

En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd et Sharpleigh, 1954**). L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines

d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes.

Tableau 1: Historique de la découverte des lectines (Renato et col, 1991)

Année	Auteurs	Découvertes
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d'Abrus precatorius
1886	Dixson	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de « Ricinus communis » Toxicité de la graine de « Croton tiglium »
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et de la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' « Abrus precatorius »
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner and Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1908	Landsteiner and Raubistscscek	La spécificité des espèces de plantes à hémagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Summer	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd and Reguera/Renkoner	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de « PhaseolusVulgaris »
1949	Jeffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de « Phaseolusvulgaris »
1952	Watkins and Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples ; démonstration à l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupes sanguins
1954	Boyd&Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de « Phaseolusvulgaris »
1965	Agrawel and Golstein	Chromatographie

		d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner and al	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi and Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'E.Coli

Structure :

Les lectines sont classées en 3 grandes classes :

- 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 galantines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (9) La protéine est représentée par un ruban rouge pour les hélices α , un ruban jaune pour les brins β et un fil pour les autres zones le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (9) (figuer 2)

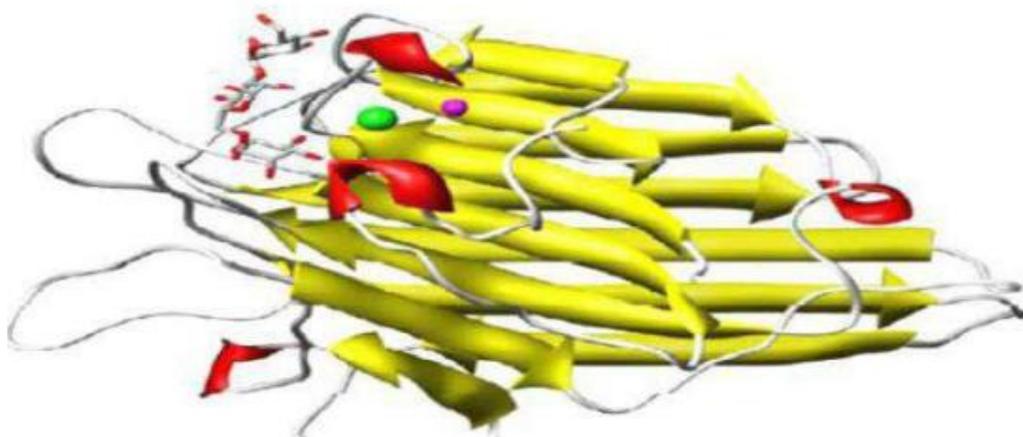


Figure 2 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN). La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones.

- **Les lectines mosaïque :**

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (9) (Figure 3).

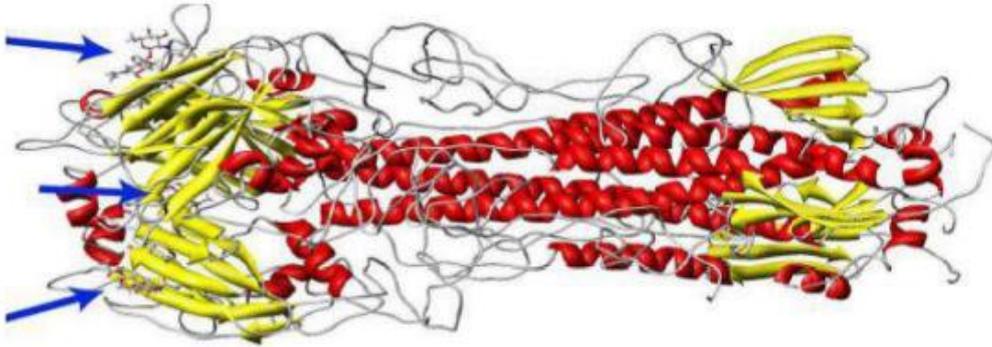
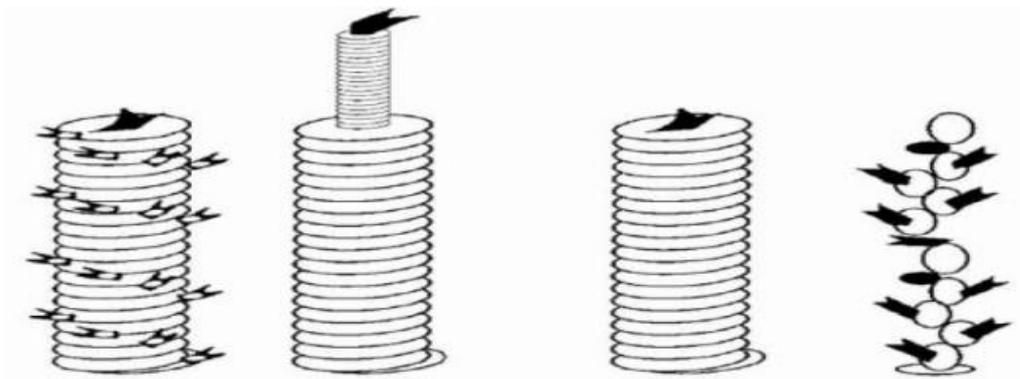


Figure 3 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexé à l'acide sialique (9)

- **Les assemblages macromoléculaires**

Ces lectines sont le plus souvent rencontrées chez les bactéries au niveau des fibrilles, où des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre de 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili (s'intègrent dans la structure du filament).

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(9) (Figure04).



➤ Figure 4 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia Coli (9)

- **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. 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.(10)

Spécificité et affinité des lectines :

La majorité des lectines sont spécifiques à un petit nombre de sucre, ses sucres sont généralement présents sur la surface des cellules sous la forme glycoconjugués surtout. En se référant sur la spécificité des lectines on peut identifier deux classes : Celles qui reconnaissent un monosaccharide et celles qui reconnaissent des oligosaccharides (11). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man)

Le Galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acétylneuraminique, NeuAc) (11).

Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines.

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.

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (12). Par exemple, en utilisant les techniques du test ELLA (Enzyme LinkedLectinAssay) et du test « Glycansarray » la spécificité d'une lectine peut être déterminée.

Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel.

➤ **Le site de reconnaissance**

Les liaisons hydrogène et ioniques entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et

directionnelles, ce qui leur permet d'avoir une bonne affinité et spécificité (13\14).

Les sites de liaisons sont généralement sous forme de creux peu profonds sur la surface de la protéine chez les lectines spécifiques aux monosaccharides, Par contre, chez les lectines spécifiques aux oligosaccharides, les sites de liaisons sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (Gianluca, 2006) . Le tableau II nous montre la spécificité osidique de certaines plantes à lectines.

Tableau 2: Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato, et coll. 1991)

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

Distribution des lectines dans le monde vivant :

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

Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale.
Le

nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines (15).

Tableau 3: Quelques structures tridimensionnelles des lectines (15)

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

➤ **Les lectines présentes chez les plantes :**

Chez les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermaphytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g. les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquences et des similarités structurales.

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaline A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 elles se retrouvent dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de subir une attaque par

des organismes étrangers, notamment les organes intervenants dans la suivie de l'individu ou del'espèce.

- **Fonction de lectine chez les plantes :**

- La spécificité des lectines et les propriétés conférées par leurs sites multiples de valence amènent certains auteurs à les comparer à des anticorps, et à proposer alors pour ces molécules un rôle d'"anticorps" chez les plantes. Cependant, une augmentation de la synthèse des lectines lors de l'exposition de la plante à un antigène (caractéristique importante des anticorps animaux) n'a jamais été démontrée. Sans être de véritables anticorps de la plante, les lectines peuvent jouer le rôle de molécules constitutives de défense contre des parasites.

De nombreuses études révèlent ainsi l'existence d'interactions entre des lectines et des microorganismes (16).

- D'autres études, au contraire suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (16).
- Le rôle des lectines dans le processus de symbiose entre les bactéries du genre *RHIZOBIUM* et Les légumineuses
- Fonction dans :
L'élongation des parois cellulaires ; fonction de cofacteurs enzymatiques
Agissant avec des enzymes glycoprotéiques ; intervention dans le transport des Glucides et dans leur mise en réserve dans les graines ; contrôle de la division Cellulaire (mitogénicité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (16)

- **Classification des lectines :**

Peumans et Van Damme (1995) indique s'il existe quatre types majeurs de lectines sont présents chez les plantes (17) :

- *Les mérolectines*

Les mérolectines sont de petits peptides qui sont constitués d'une seule chaîne polypeptidique

qui ne possèdent qu'un seul domaine de liaison aux glucides par exemple : (héveine, protéine d'Orchidées). Ils sont incapables de faire une agglutination avec les cellules.

b. Les hololectines

Les hololectines contiennent deux domaines (ou plus) de liaisons aux glucides quasi-identiques, ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules. La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines.

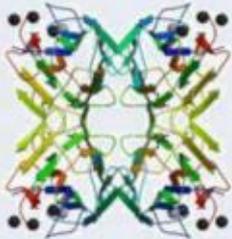
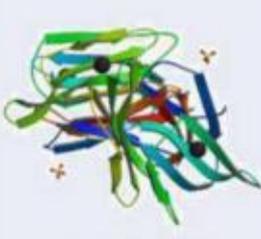
c. Les chimérolectines

Les chimérolectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip « RibosomInactivatingProteine » : Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine).

d. Les superlectines

Les superlectines sont de l'oligomère poly-spécifique constituée de plus de quatre monomères, elles sont considérées comme un groupe spécial de chimérolectines composé de deux domaines différents structurellement et fonctionnellement .

Tableau 4: classification des lectines des plantes selon van dame 1995

Les mérolectines	Les hololectines	les chimérolectines	les superlectines
 <p>Heveina (1HEV)</p>	 <p>ConBr (3JU9)</p>	 <p>PPL2 (2GSJ)</p>	 <p>Banana lectin (2BMY)</p>

Lectine des microorganismes :

Dans la nature, les lectines participent à la reconnaissance des cellules de l'hôte par les

microorganismes pathogènes

L'adhérence aux tissus constitue une étape cruciale dans le développement de l'infection

a. 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 (18).

Les lectines bactériennes connues sont divisées en trois classes : les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles qui n'appartiennent pas aux deux premières classes (19).

b. 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 (20). 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 (21).

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 côté du domaine lectine. (Figure 6)

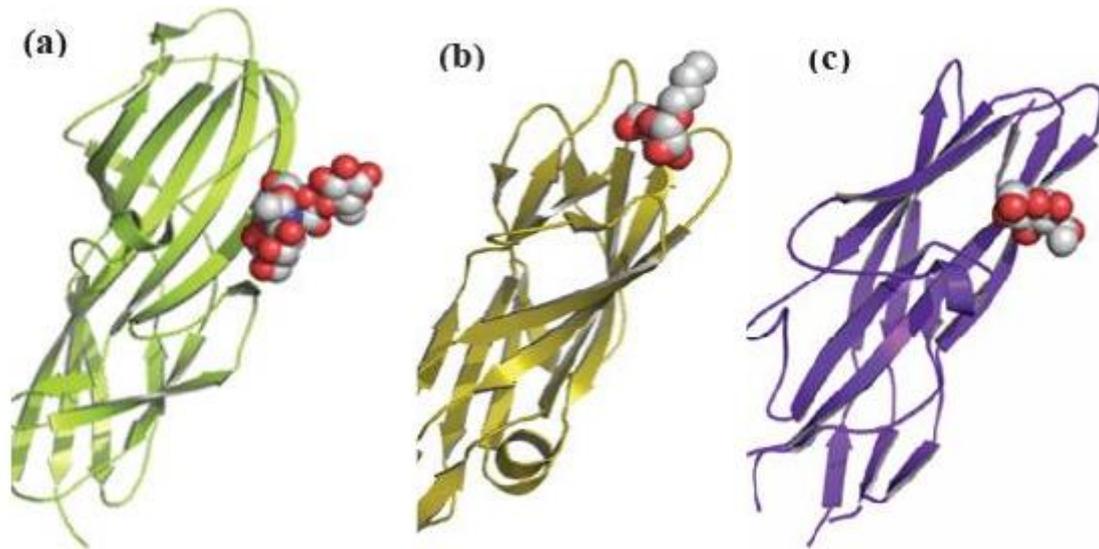


Figure 5 : Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH complexé avec butyl- α -Dmannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec

c- 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 « *Bordetella 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 qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire (22)

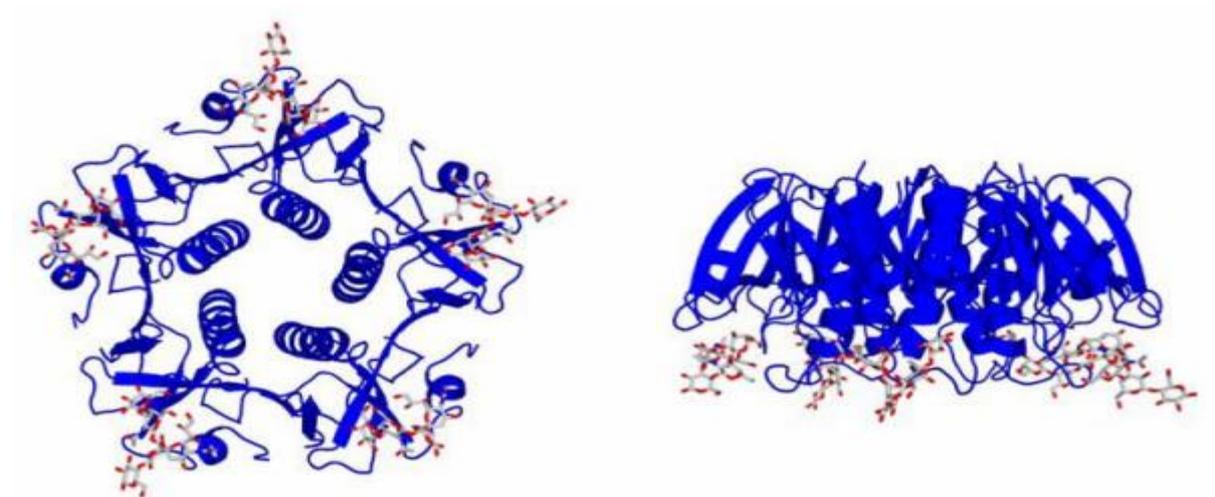


Figure 6 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)

d- les lectine soluble :

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(23)

Tableau 5 :Lectines bactériennes solubles(23)

Nom	Type	Spécificité	Caractéristique
Pseudomonas aeruginosa PA-IL	Pathogène humain	Galactose	Lectine cytotoxique
Pseudomonas aeruginosa PA-IIL	Pathogène humain	Fructose /Mannose	Très haute affinité vers le fucose
Cromobacteriumviolaceum CV-IIL	Pathogène humain	Fructose /Mannose	Très haute homologie avec PA-IIL
Burkolderiacenocepacia BCLx	Pathogène humain	Fucose /Mannose	Gènes identifiés homologues à PA-IIL
Ralstoniasolanacearum RS-IIL	Pathogène végétal	Mannose /Fucose	Très haute homologie avec PA-IIL
Ralstoniasolanacearum RSL	Pathogène végétal	Fucose	Similaire à «aleuriaaurantialectin» une lectine de champignon

- **Les lectines de champignon :**

Les champignons, y compris les moisissures et les champignons proprement dits, font partie d'une importante classe d'organismes. N'étant pas capable d'utiliser la photosynthèse comme les plantes ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils se nourrissent et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui leur confèrent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques.

Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines antifongiques, des ribonucléases, des protéines de type ubiquitine, des lectines, des cellulases, des xylanases, des laccases, des invertases et des tréhaloses phosphorylases (25). 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 (26,27). L'abondance de lectines dans les champignons est tout à fait remarquable et un test d'agglutination conduit sur plus de 411 spécimens a permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés

- **Caractéristiques :**

Les lectines de champignon qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en termes de taille (12-190 kDa), soit en termes de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi 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.

De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

- **Rôles :**

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (28). Elles joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la morphogénèse 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 mycorhization.

➤ **Les lectines animales :**

Elles sont 13 familles qui se divisent en deux groupes :

- **Lectines intracellulaires**

Les lectines intracellulaires se composent de quatre groupes : les lectines de type M, P et L et les calnexines .ces lectines interagissent dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (29).

- **Lectines extracellulaires**

Les lectines extracellulaires comprennent toutes les lectines restantes, comme celles de type C et R, ainsi que les galectines, elles sont en général responsables dans la signalisation et L'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance de Certaines pathologies (29).

Le rôle des lectines dans l'organisme vivant :

Le tableau suivant récapitule le rôle des différentes lectines chez les bactéries, les virus , les toxines ,les plantes .

Tableau 6: Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant(28)

Lectines	Rôles
<i>Bactéries</i>	
Lectines fimbriales	Adhésion, infection
Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines	Adhésion, infection
<i>Virus</i>	
Influenza haemagglutinine	Adhésion, infection
<i>Amoeba</i>	
Lectines de surface	Adhésion
<i>Plantes</i>	
Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
Autres	Défense
Galectines	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire

Propriétés Biologiques des lectines :

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées

Liaison avec les sucres :

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (30).

Agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules.

Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (31\35). En outre, on s'est aperçu que les lectines agglutinent plus facilement les cellules malignes par rapport à leurs homologues normales. Des attitudes préférentielles ont été observées également entre cellules embryonnaires et cellules adultes, entre cellules en mitose et cellules en interphase (35).

Activité mitogène :

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (32\33\34).

Effets mimétiques des hormones :

Les lectines des graines de haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (32). De même les lectines des graines de *Momordica charantia* comme diverses autres lectines possèdent des activités antilipolytiques et lipogénique (activités insuline-like) à cause de son interaction avec les récepteurs d'insuline des adipocytes(35).

Actions antivirales :

Lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (35).

Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre

Narcissus cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius*).

Autres propriétés

- Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses
- la précipitation des glycoprotéines,
- l'activation de la voie alterne du complément
- l'agrégation des immunoglobulines
- l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes
- les effets pro et anti inflammatoires
- l'induction de l'apoptose

L'intérêt des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (11). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

1- En biochimie et protéomique

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un enzyme ,immuno-blotting ,

immunoprécipitation ...) .Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement .(structure des complexe et interaction) . (36)

Les utilisations et les applications des lectines

Les lectines ont la capacité d'interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité de fonctions et d'évènements dans ces organismes vivants. Ces interactions jouent un rôle important car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (11). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

Tableau 7: les utilisations et les applications des lectines

Domaine :	Application :
Hématologie	Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains et sont utilisées dans les banques de sang pour leur identification ou leur typage
immunologie	Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immun thérapeutiques
Biologie cellulaire	étudier la nature, la structure et la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques

<p>Cancérologie</p>	<p>-marqueurs histochimiques puisque le cancer est associé à une modification des glycanes présents sur les cellules</p> <p>-transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses</p>
<p>agronomique</p>	<p>la lutte contre les agents pathogènes des plantes tels que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans les cultures</p>
<p>Biochimie et protéomique</p>	<p>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 enzyme ,immuno-blotting , immunoprécipitation ...)</p>

Deuxième partie :

Introduction :

Nous nous sommes limités à une étude exhaustive de trois mémoires réalisés au sein de l'université des frères Mentouri de Constantine pour passer en revue les différentes techniques d'analyse des lectines (plantes / champignon)

Mémoire 1 : Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines extraites du champignon « *Agrocybe Aegerita* » (38)

Mémoire 2 : L'extraction des lectines à partir des racines de deux plantes médicinales (*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*) (39)

Mémoire 3 : l'étude comparative de lectine extraite à partir de trois plantes *Spergularia- rubra*- L et *Pest inula viscosa* leaves et *linum usitatissimum* (40)

Chapitre 1 : Généralités sur les plantes

1. l'Agrocybe Aegerita :

➤ Définition :

Elle correspond à un champignon saprophyte qui se développe sur le vieux bois d'arbre, comme les espèces : le saule, le peuplier, l'orme et l'érable (Giovannini, 2006, Wasser et Weis 1999) .

Il est principalement distribué dans les zones où l'humidité relative est élevée, principalement en Asie, en Europe et en Amérique du Nord (Lau, 2001). Ce champignon correspond à l'une des espèces les plus couramment cultivées en Chine pour leur effets anti-tumorales, propriétés antifongiques (Zang et al, 2003), leur agent diurétique (Hobbs, 1996) ; la présence de polysaccharides à activité hypoglycémique avec une marque a été étudiée pour sa capacité à inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (Tadashi et al., 1994).



Figure 7: Chapeau d'Agrocybe Aegerita (mycorance.free.fr)

➤ Classification scientifique du Pholiote du Peuplier :

Division : Basidiomycota

Classe : Agaricomycètes

Famille : Bolbitiaceae

Genre : Agrocybe

Espèce : A. Aegerita

Nom binomial : *A.Aegerita*

Nom commun : Champignon du peuplier

2. *Spergularia Rubra* L Jet Pest

➤ Noms communs

sablaine rouge, *Spergularia* rouges, calcaire, fleur de sable et casse pierre c'est le nom le plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions.

➤ Nom scientifique

Spergularia Rubra L Jet Pest

➤ Définition:

Spergularia rubra L Jet Pest, est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de la famille des Caryophyllacées.

Spergularia rubra L Jet Pest est une plante dont la racine est fibreuse et longue et dont les tiges pouvant atteindre jusqu'à 25 centimètres sont dressées ou étalées les feuilles opposer linier petite sont munies de stipules lancéolées les fleurs visibles de mai ont septembre senti déposées solitairea l'extrémité des tiges le fruit est une capsule qui contient des nombreuses graines noires. (Pierre.M et lys.M, 2007). (Ronald.L , et al.,2012).

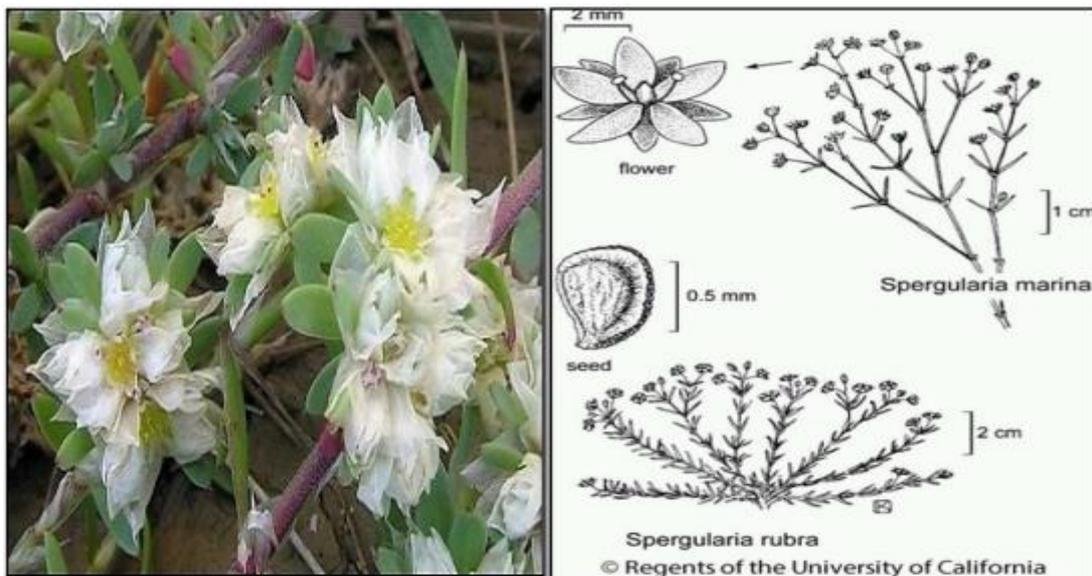


Figure 8 : la plante de *Spergularia Rubra* L Jet Pest, (Ronald.L, et al.,2012)

➤ **Classification de *Spergularia Rubra* :**

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Caryophyllales

Famille : Caryophyllaceae

Genre : *Spergularia*

Espèce : *Spergularia rubra*

3. *Eucalyptus globulus*

➤ **Origine du nom**

Le mot « *Eucalyptus* » vient du grec ; Eu « bien » et kaluptos « couvert ».

➤ **Noms communs**

Gommier, gommier bleu, arbre au koala, arbre à la fièvre.

➤ **Définition**

Le genre *Eucalyptus*, représenté par plus de 700 espèces réparties dans le monde entier (Brooker et Kleinig, 2006). Il s'étend dans des régions les plus sèches (quasi désertiques) jusqu'aux cotes humides (Chennoufi et al, 1980). Il est apte à résister au froid et à croître sur des sols secs, siliceux, calcaires, humides ou argileux, salés ou non, près ou loin de la mer (Virmani et Datta, 1967).

Il se compose de grands arbres magnifiques et à feuilles persistantes avec un feuillage parfumé riche en glandes sébacées et est une excellente source de l'huile d'*eucalyptus*

- Odeur : forte, fraîche, balsamique « odeur d'une baume », camphrée.
- Saveur : chaude aromatique, un peu amère, suivie d'une sensation de fraîcheur prononcée et agréable.
- Récolte : en Février et en Novembre à la taille des arbres.



Figure 9 : la plante d'Eucalyptus globulus.

➤ **Classification**

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida /Dicotylédones

Sous –Classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceas

Genre : Eucalyptus

Espèce Eucalyptus : globulus

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

❖ Préparation de l'échantillon :

- 1- Lavage : le champignon *Agrocybe Aegerita* et les plantes ont été lavé par l'eau de robinet pour éliminer les grosses particules (la poussière) présentes dans ce champignon récolté, puis rincé à l'aide de l'eau distillée pour éviter la présence des impuretés.
- 2- Séchage du champignon et les plantes ont été réalisé dans un endroit sec à l'air libre et à l'abri de la Lumière pendant un mois
- 3- Ensuite broyé par l'azote liquide 38g de la poudre obtenue sont dilués dans 304ml du tampon phosphate (PBS 0.1M pH 7.4)



Figure 10 : Poudre d'*Agrocybe Aegerita*

- 4- Le mélange est homogénéisé grâce à un blinder ultra-turax, soumis à une macération pendant 24h sous agitation à froid pour assurer une meilleure extraction des protéines.
- 5- Puis filtré grâce à une pompe à vide afin d'éliminer les grosses molécules.
- 6- Le filtrat est ensuite soumis à une centrifugation à 12000tr/min pendant 30 minutes à 4°C.
- 7- Surnageant et culot vont subir un test d'hémagglutination afin de déterminer l'absence ou la présence de lectines

MATERIELS ET METHODES

- 8- Seul le surnageant qui a révélé une activité hémagglutinante a été récupéré dans des tubes flacons et conservé à 4°C.

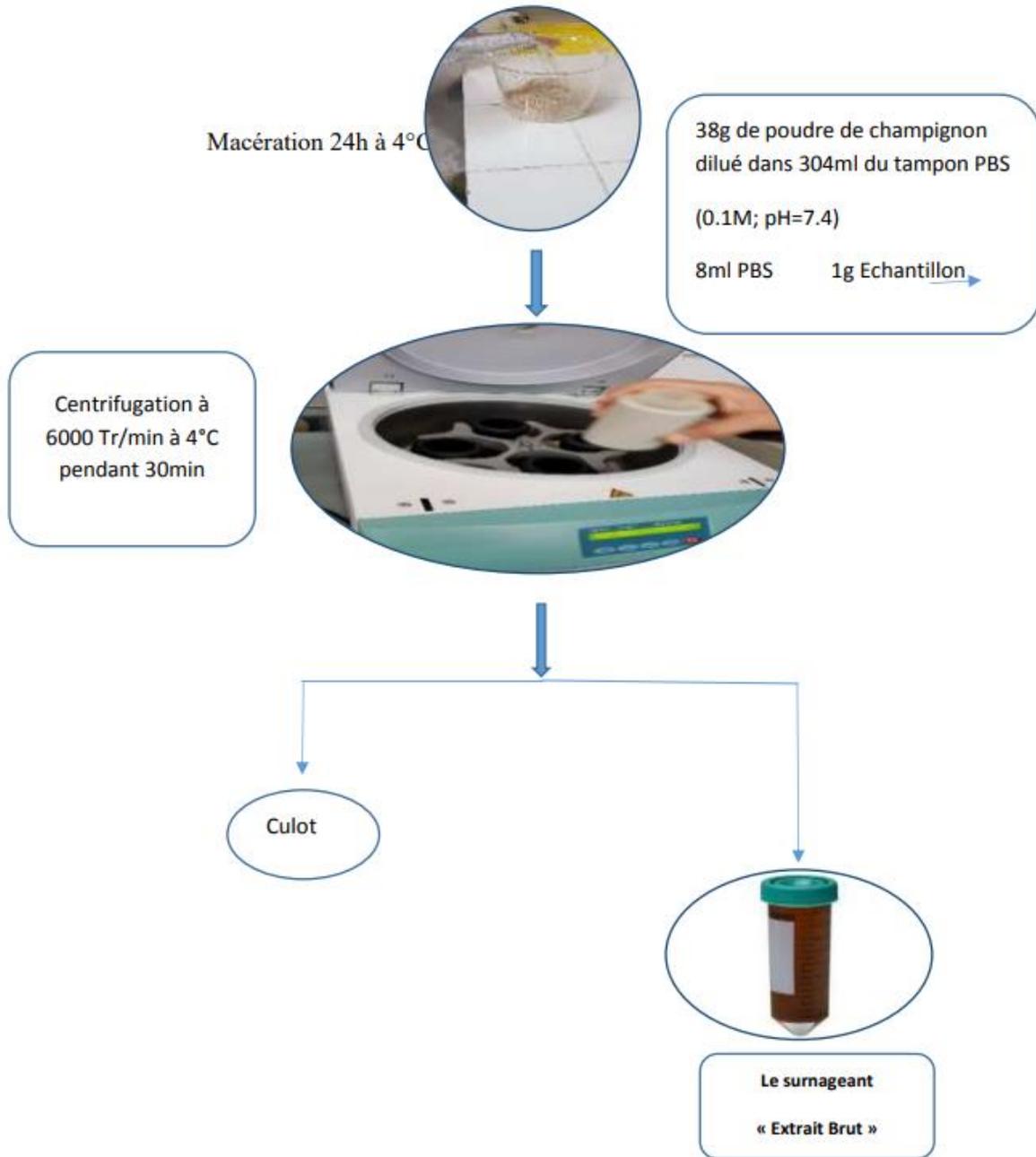


Figure 11 : Schéma d'extraction des lectines à partir de la Poudre du champignon « Agrocybe Aegerita »

Il y'a plusieurs techniques. On a choisi les tests suivants :

1. Dosage des protéines :

Dans le champignon :

Le dosage des protéines a été réalisé sur un spectrophotomètre UV-Visible L'absorbance a été mesurée à 280nm pour les protéines et à 260nm pour les acides nucléiques qui pourraient éventuellement contaminer les solutions le calcul des concentrations est donc fait selon la méthode de Warburg et Christian.

Les valeurs obtenues peuvent alors s'intégrer à l'équation suivante : [Protéines] (mg/ml)
 $= 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$

Dans la plante *Spergularia Rubra* L. jet

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de (Lowry, 1951).

2. Test d'hémagglutination :

Ces tests sont réalisés à 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(1). Cette technique repose sur la capacité des lectines à former un réseau avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de surface.

Réalisation du test :

- Dans les quatre premiers puits de la 1ère ligne de la microplaque, a été déposé à l'aide d'une micropipette 50µl du tampon PBS (**Annexe 2**) + 50µl de l'extrait et rajoute 50µl d'hématies à 3%(Un prélèvement de sang oculaire a été effectué sur un lapin de 3kg.Le sang est prélevé directement dans un tube héparine (5 ml) (**Annexe 1**))
- Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs composés chacun de 50µl de solution tampon (PBS) et de 50µl d'hématies à 3% (dépourvus d'échantillons).
- Après une heure d'incubation à température ambiante la lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée à l'œil nu.

3. Test de la limite d'hémagglutination

- On vise par ce test-là plus basse concentration en lectines pour laquelle une hémagglutination est encore visible c'est le point d'équivalence et la concentration en lectines de ce puits, et une limite d'hémagglutination. Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brut.

- Puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits qui suivent.
- Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits.
- Là encore, trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs, composés chacun de 50µl de solution tampon (PBS) et de 50µl d'hématies à 3%.
- Après une heure d'incubation à température ambiante la lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée à l'œil nu.

4. Effet de la température sur l'hémagglutination

- Le traitement thermique a été réalisé sur un tube : verser 2ml d'extrait brut, ce dernier, incubé à des degrés différents de température (30, 40,60, 80 et 100°C) dans un bain marie durant 1h du temps.
- Une activité agglutinante est testée pour l'extrait qui a été soumis à des degrés différents de température (50µl d'extrait+50µl d'hématies).
- Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs.
- Après une heure d'incubation à température ambiante la lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée à l'œil nu.

5. Effet de la température sur la limite d'hémagglutination

- Impliquer la méthode de double dilution pour un volume de 50 µl du tampon PBS(0,01M) plus 50 µl de l'extrait soumis au bain marie et 50 µl d'hématie du lapin fixé à 3% qui est testée pour chaque température en réservant à chaque fois trois puits pour le témoin négatif de chaque extrait sont respectivement composés de 50µl de l'extrait + 50µl de tampon phosphate ayant aussi été incubé dans le bain marie à chaque température (30°C,40°C, 60°C, 80°C et 100°C) et de 50µl d'hématies de lapin.
- La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

6. Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et de glycoprotéines :

- Le test est réalisé comme suit :
- Dans une microplaque déposer 50µl de l'extrait + 50µl du sucre (**Annexe 3**) + PBS
- Après incubation 30min à 37°C, 50µL d'une suspension d'érythrocytes de rat à 4% sont ajoutés à chaque puits.

- L'inhibition de l'héماغglutination est lue après une heure d'incubation à température ambiante.

7. Test de la limite d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines

- Ce test est effectué avec les sucres qui inhibent l'agglutination, il est réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination.
- Dans chaque puits de la microplaque, 50µl d'homogénat sont déposés, et c'est uniquement dans les premiers puits relatifs à chaque sucre que sont rajoutés 50µl de chaque inhibiteur+50 ul de PBS, une gamme de concentrations par doubles dilutions est réalisée dans les puits suivants,
- Le mélange est incubé pendant une heure de temps à température ambiante. Au final 50µl d'hématies à 3% sont ajoutés dans chaque puits. L'observation l'héماغglutination est faite à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

8. Chromatographie :

8-1 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50

- Afin de purifier les lectines produites par « l'Agrocybe Aegerita », et de choisir la meilleure procédure de purification, une chromatographie sur gel filtration Séphadex G50 a été réalisée en raison de l'intervalle de fractionnement adéquat avec les poids moléculaires relatés par la bibliographie.
- Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Séphadex G50.Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 1500 à 30000 Da.
- 9g de Séphadex G50 sont mis en suspension dans 150 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7,4). Le mélange est incubé pendant 48 h à température ambiante, ensuite dégazé et coulé dans une colonne (1cm/10cm).
- Les extraits issus de la chromatographie sur colonne sont placés dans le spectrophotomètre à UV Afin de mesurer l'absorbance à longueur d'onde 280 nm, qui a été utilisée pour estimer la teneur en protéines dans les éluât de la colonne et tracer la courbe d'absorbance en fonction des tubes.

8-2 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G200

- 4 g de Séphadex G200 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,4). Le mélange a ensuite incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne.

- Un échantillon de surnageant d'extrait brut de «*Spergularia Rubra* L Jet Pest » a été récupéré puis versé au niveau de la colonne Séphadex G200 et équilibrée avec un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), avec lequel elle a été recueillie par élution dans des tubes secs (5ml/tube)
- Les extraits issus de la chromatographie sur colonne sont placés dans le spectrophotomètre à UV afin de mesurer l'absorbance à longueur d'onde 280 nm, qui a été utilisée pour estimer la teneur en protéines dans les éluât de la colonne et
- Tracer la courbe d'absorbance en fonction des tubes.

8-3 Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G75

- 4 g de Séphadex G75 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,2). Ensuite le mélange incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne.
- Récupéré le surnageant puis versé au niveau de la colonne Séphadex G75 et équilibrée avec un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2), avec lequel elle a été recueillie par élution dans des tubes secs (5ml/tube)
- Les extraits issus de la chromatographie sur colonne sont placés dans le spectrophotomètre à UV afin de mesurer l'absorbance à longueur d'onde 280 nm, qui a été utilisée pour estimer la teneur en protéines dans les éluât de la colonne et tracer la courbe d'absorbance en fonction des tubes

9. L'effet du pH sur l'hémagglutination :

9-1 Des champignon « l'Agrocybe Aegerita »

- Pour tester l'effet du pH, des échantillons de lectines sont dialysés contre des solutions tampons à différents pH [3-11] pendant 24 h. Différents tampons ont été utilisés pour cela (selon la gamme de pH) : 20 mM de tampon citrate phosphate (pH 3.0 à 6.0), 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 7.0 à 9.0), et 20 mM de tampon Glycine-NaOH (pH 10.0 à 11.0).
- 2ml de dialysat de l'extrait sont mis dans un sac de dialyse, et baignant dans un 1L des différents tampons à différents pH (3-4-5-6-8-9-10-11) et laisser une nuit sous agitation à froid .Après 24H, puis récupéré la membrane de dialyse de chaque tampon à différents pH et introduit dans 1L du tampon PBS pendant 4h.

9-2 Des plantes

- Dans 12 tubes à essai une petite quantité de poudre des plantes a été mis tout en ajoutant un petit volume de tampon phosphate à différent valeurs de pH en allant de 1 à 12, Après 24 h d'incubation à 4 °C, le test d'hémagglutination a été effectuée sur le surnageant.

10. Testes concernant le champignon « l'Agrocybe Aegerita » :

➤ Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

-Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

- Le tableau ci-dessous donne les quantités de (NH₄)₂SO₄ 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).

% 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	
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	710	
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	675	
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	639	
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	603	
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	567	
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	533	
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	497	
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	462	
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	389	
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	353	
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	319	
									0	31	63	97	132	168	205	244	283	
										0	32	65	99	134	171	209	248	
											0	32	66	101	137	174	212	
												0	33	67	103	139	177	
													0	34	68	105	140	
														0	34	70	142	
															0	35	143	
																0	144	
																	0	145

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

-L'extrait brut de la souche « AgrocybeAegerita » est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation à différents paliers (0-40%, 40-80%), afin de séparer les protéines en différentes fractions. Une saturation initiale à 40% a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d'ammonium à l'extrait brut placé dans un bécher à 0°C, sous agitation constante.

-Après centrifugation à 4500 Tr/min pendant 45min, les protéines précipitées sont récupérées dans 5mL de tampon PBS (0.1M ; pH = 7.4) ensuite réalisé un test d'agglutination et le conserve à 4c°.

-Cette solution représente la première fraction protéique F1 (0-40%). Le surnageant obtenu est resoumis pour une autre précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation de 40 à 80% en suivant la même procédure.

➤ **Electrophorèse SDS-PAGE :**

- Utilisation de deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide 12%, permettant la séparation suivant la taille (**Annexe 4**), précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation) 4%, (**Annexe 5**) moins dense permettant au préalable de concentrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées.

- Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 70µl par pus, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8). Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie sous agitation continue pendant 24h (**Annexe 6**). La décoloration avec l'eau de robinet est faite le lendemain plusieurs fois.

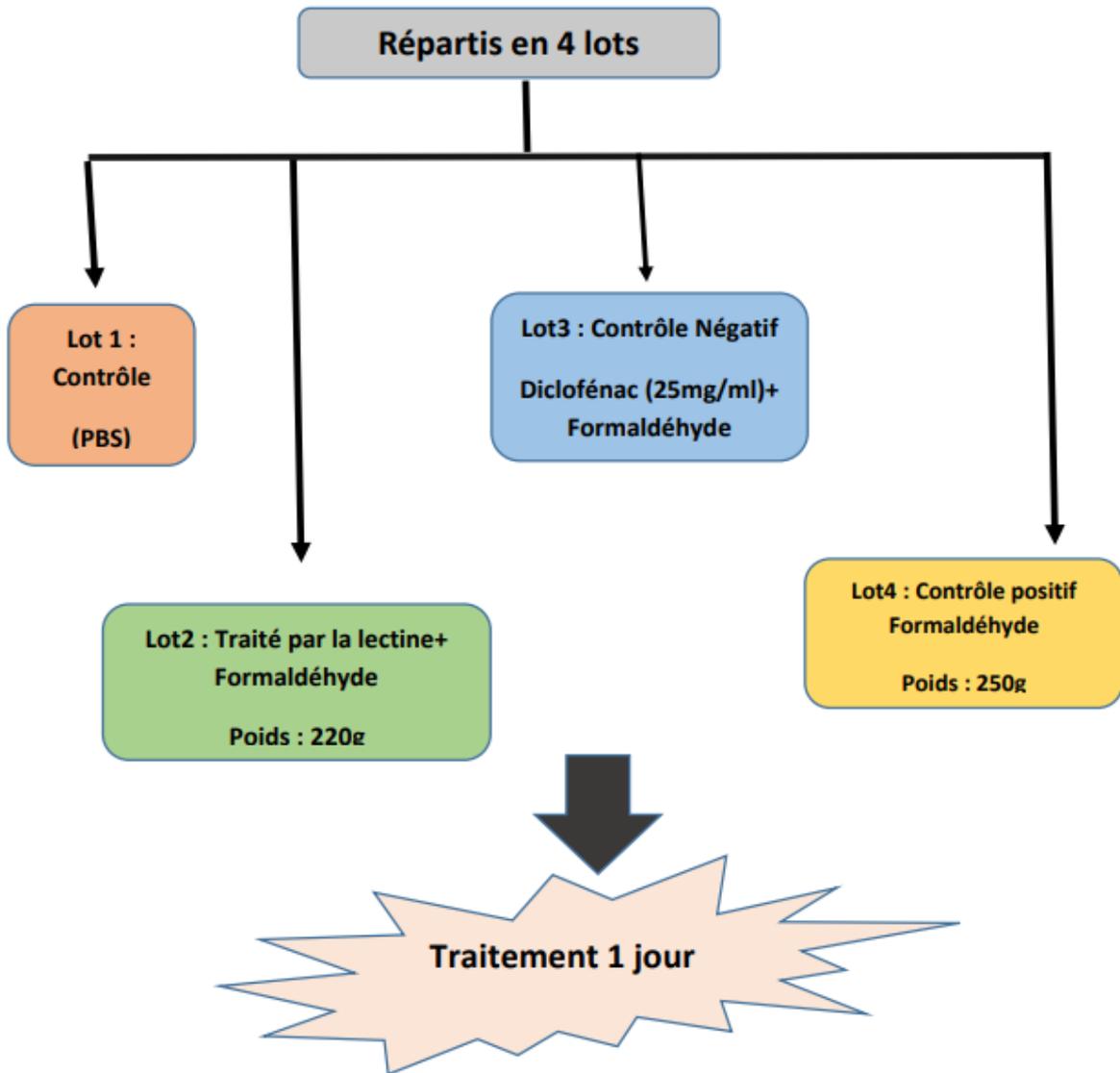
- Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa. Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électrophorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad

➤ **ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU
CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR
(Pharm. Méd. Trad. Afr. 2001, VoU 1, pp. 1-11,ETUDE DES
PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA RACINE DE
PLUCHEA OVALIS (PERS.) DC.(ASTERACEAE) CHEZ LE RAT)**

-Ils sont utilisé 20 rats blancs Rattus de la souche Wistar.

-Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux mois environ (régler le régime alimentaire, la température, l'humidité, environnement propre)

-Regrouper les rats en 4 lots, chaque lot contient 5 rats pour les injectés.



-L'œdème est provoqué par l'injection de 80µl de l'extrait (la lectine) par voie intrapéritonéale aux rats du 2ème lot 30 minutes avant l'injection du formaldéhyde à raison de 10µL /25g de poids corporel.

-Le 3ème lot est traité par le Diclofénac, **un anti-inflammatoire qui est utilisé comme référence à notre lectine**, une demi-heure avant l'injection du formaldéhyde de la même façon que le 2ème lot. --Le 4ème lot subira quant à lui seulement une injection sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite du rat du formaldéhyde **pour provoquer l'inflammation**.

MATERIELS ET METHODES

-Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0 ; 30 ; 60 ; 120 et 180 minutes après l'injection du formaldéhyde



Figure 12 : Mesure de l'œdème du pied du rat

-Le volume du pied est déterminé par immersion dans une petite éprouvette en verre avec un diamètre interne de 2cm et une hauteur de 5cm fixée dans une boîte de pétri de 20cm de diamètre qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée qui déborde est directement lu sur les petites seringues. Le volume de l'œdème VT à un temps t donné est :

$$VT = Vt - V_0$$

V₀ : le volume initial du pied,

V_t : le volume du pied au temps t .

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

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (VT_f - VT_a) / VT_f$$

VT_f : le volume de l'œdème chez les rats témoins ayant reçu uniquement le formaldéhyde,

VT_a : le volume de l'œdème chez les rats traités avec les extraits d'Agrocybe Aegerita..

Chapitre 3 : résultats et discussions

1. Dosage des protéines :

Dans le champignon :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

Tableau 8: résultats du dosage des protéines de champignon

	Absorbance (nm)		Concentration
	280	260	
S1	0.520	0.228	0.632
	F = 1/100	F = 1/100	

S1 : surnageant 1

F : facteur de dilution

Le tableau montre la concentration des protéines de champignon

- On observe que le surnageant présente une concentration en protéines non négligeable.

Dans la plante :

Tableau 9 : résultats du test de dosage des protéines de plante Spergularia-rubra-L Jet Pest

	Concentration (mg /ml)
Brute	1,42 +- 0,02
Lectine purifié	0,35 +- 0,01

Le tableau montre la Concentration des protéines brut extraire à partir de Spergularia-rubra-L Jet Pest, et d'autre part la concentration des lectines purifiée.

- La plante donne une concentration des protéines élevée 1,42 mg /ml pour l'extrait brute et
- 0,35 mg/ml pour lectine purifié

2. Test d'hémagglutination

Tableau 10 : résultats du test d'hémagglutination

Plante	Test d'hémagglutination
Agrocybe Aegerita	+++
Spergularia Rubra L jet Pest	++
Eucalyptus globulus	+++
Témoin négative	-

Très forte agglutination (+++)

Forte agglutination (++)

Faible agglutination (+)

Pas d'agglutination (-)

Photos d'agglutination des hématies :



Agrocybe Aegerita

Spergularia Rubra

Eucalyptus globulus

Un phénomène d'hémagglutination : formation d'un réseau entre les hématies et les lectines, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène

- Les résultats montrent une très forte agglutination (+++) dans le champignon et la plante eucalyptus globulus vis-à-vis les hématies du lapin C'est 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 (37)
- Par contre par contre l'extrait de Spergularia Rubra L jet Pest montre une forte agglutination

3. Test des limites d'hémagglutination :

Tableau 11 : résultats de test de la limite d'hémagglutination

Dilution / extrait	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Agrocybe Aegerita	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-
Spergularia Rubra L	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-
Eucalyptus globulus	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
Témoin négative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Agglutination absente /+ : faible agglutination. ++ Forte agglutination /+++ : très forte agglutination

- L'activité hémagglutinante des extraits de *Agrocybe Aegerita* (tableau 11) montre une très forte agglutination lors de sa dilution au niveau des 1^{er} jusqu'à 4^{ème} puits alors qu'elle diminue au niveau des 4 puits qui suivent (5^{ème} jusqu'à 8^{ème}) L'agglutination continue à diminuer mais persiste comme même jusqu'au huitième puits (dilution 1/256) puits et disparaît complètement au niveau des puits suivants (9 jusqu'à 12) 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 : 2.468 µg/ml.



Ces résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines contenues dans le champignon

- L'activité hémagglutinante des extraits de *Spergularia-rubra* L jet Pest montre une très forte agglutination lors de sa dilution au niveau des 1^{er} jusqu'à 4^{ème} puits alors

qu'elle diminue au niveau des 4 puits qui suivent (5ème jusqu'à 8ème) puits et disparaît complètement au niveau des puits suivants (9 jusqu'à 12)



- Dans la plante *Eucalyptus globulus* : l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml



4. Test de l'effet de la température sur l'hémagglutination :

Tableau 12 : résultats de test de l'effet de la température sur l'hémagglutination

Température / extrait	[30 – 50] °C	[60-80] °C	[90-100] °C
Agrocybe Aegerita	+++	++	+
Spergularia Rubra	++	+	+
Eucalyptus globulus	+++	+++	+++
Témoin négative	-	-	-

+++ : Très forte agglutination.

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination.

: Absence d'agglutination.

- Le traitement thermique des extraits bruts des : *Agrocybe Aegerita*, *Spergularia-rubra* L Jet Pest et *Eucalyptus globulus* ont différentes températures de 30°, 50°, 70°, 90...°C pendant 30min, n'est pas suffisant pour inactiver totalement l'activité

d'hémagglutinante. Donc ces Lectines présentent une forte résistance à haute température, (thermorésistante) , Le même résultat est prouvé également pour *Pterocladia capillacea* qui pousse jusqu'à 100°C (37).

- *Agrocybe Aegerita* et *Spergularia Rubra* L jet Pest → A 100°C, il y'a une absence partielle d'activité hémagglutinante, ce qui veut forcément dire que les lectines présentes dans l'homogénat ont commencé à être dénaturées lors de ces incubations, ceci confirme que les lectines sont des molécules thermorésistantes.

5. Test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination d'*Agrocybe Aegerita* :

Tableau 13 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination d'*Agrocybe Aegerita*

Dilution/température	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
30 °C	++ +	+ +	+ +	++	++	++	++	+	-	-	-	-
40 °C	++	+ +	+ +	++	+	+	+	+	+	-	-	-
60 °C	++ +	+ +	+ +	++	+	-	-	-	-	-	-	-
80 °C	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 °C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témoin négative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Très forte agglutination.

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination.

-: Absence d'agglutination.

- A 30°C, il y'a une très forte agglutination dans les trois premiers puits qui diminue ensuite dans le quatrième, cinquième, sixième et septième puits et qui commence à disparaître dans le huitième puits (dilution 1/256) correspondant à la concentration : 3.824µg/ml.
- A 40°C, il y a une forte agglutination au niveau des quatre premiers puits qui diminue au niveau du cinquième puits jusqu'au huitième et elle disparaît au niveau du neuvième puits (dilution 1/521) avec une concentration de : 1.8790µg/ml.
- A 60°C, il y a une très forte agglutination au niveau du premier puits qui commence à diminuer au niveau du 2ème et 3ème puits et qui diminue totalement dans le 3ème, 4ème et 5ème puits puis disparaît au niveau du 6ème puits (dilution 1/64) avec une concentration de : 15.2968µg/ml.
- A 80°C, le premiers puits montre une faible agglutination qui disparaît aussitôt dans le deuxième puits (dilution 1/4) correspondant à la concentration : 244.75µg/ml.
- 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, elles n'ont pas pour autant gardé l'intégralité de leur pouvoir hémagglutinante, 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.
- Du coup on déduit que la température optimale de la lectine de l'Agrocybe Aegerita est : 100°C
- Les lectines présentes dans le champignon Agrocybe Aegerita sont similaires aux lectines du champignon « Ganoderma capense », ces dernières ont une thermo-stabilité (thermorésistante) spectaculaire, leur activité hémagglutinante n'est pas affectée même après exposition à 100°C pendant 60 minutes

6. Test de l'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines :

Tableau 14 : Résultats du test de l'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

Sucres et glycoprotéines	Glucose	fructose	Glucosamine-Hcl	Manose	galactose	lactose	Rhamnose	muicine	fétuine	maltose	inositol	caséine
Agrocybe Aegerita	+	/	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Spergularia Rubra L Jet Pest	++	-	/	/	+	-	/	/	/	-	/	/
Eucalyptus globulus	++	++	+++	/	++	++	+	+++	-	/	/	-
Témoin négative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Très forte agglutination.

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.

D'après les résultats obtenus on observe :

(-) → ont influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines de l'extrait en inhibant l'hémagglutination des hématies en fixant eux-mêmes les sucres présents au niveau de ces dernières et ont empêché l'action hémagglutinante de lectines car ils présentent probablement une meilleure affinité pour les sucres présents à la surface cellulaire des érythrocytes. Ils sont attachés aux lectines et ont occupé le/les sites actifs (domaines de reconnaissance) censés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, sur ce, les lectines présentent une affinité pour ces sucres.

(+)→ Quant aux autres sucres et glycoprotéines, ils n'ont pas influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines ceci veut dire que ces dernières n'ont aucune affinité pour ces saccharides



7. Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine :

Tableau 15 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine

	Dilution / sucres	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	fructose	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
A	lactose	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
A	arabinose	-	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++
A	maltose	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++
B	caséine	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B	fétuine	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
C	mannose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Témoin négative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A : *Spergularia rubra* L jet

B : *eucalyptus globulus*

C : *Agroclybe Aegerita*

+++ : Très forte agglutination.

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination.

- : Absence d'agglutination.

(A)→L'extrait du *Spergularia-rubra* Ljet Pesta démontré une inhibition avec certains saccharides (fructose, lactose, arabinose, maltose) ce qui prouve la différenciation de ses récepteurs. La concentration minimale a été calculée avec le fructose et a été démontrée qu'elle été de l'ordre de 0,00625g/ml au niveau du 4^{ème} puits, en utilisant une concentration initiale de 0,1g/ml, alors que le lactose et l'arabinose prouve une concentration minimale de 0,05g/ml dans le 1^{er} puis, et pour le maltose la concentration minimale qui provoque l'inhibition d'agglutination est 0,000781g/ml dans 7^{eme} puits donc elle est **très fort inhibitrice que lactose et l'arabinose.**

(B)→ L'extrait d'*Eucalyptus globulus* a démontré une inhibition avec certaines glycoprotéines (Caséine, Fétuine) ce qui prouve la différenciation de ses récepteurs. la concentration minimale a été calculée avec ces glycoprotéines et a été démontré qu'elle été <0,05 g/ml, < 0,00003 g/ml au niveau du 1^{er} et 5^{émé} puits respectivement. En utilisant une concentration initiale de 0,1g/ml, ce qui indique que le Fétuine est une forte affinité par rapport à la caséine

(C) →Dans le cas de la raffinose, on remarque une agglutination qui a lieu au niveau du dixième puits (dilution 1/1024) [raffinose] = 0.009mg/ml, ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que la raffinose présente une bonne affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines contenues dans notre homogénat. Ceci indique que nos lectines ont une forte affinité avec la raffinose.

Concernant le Mannose, l'agglutination a lieu dans le huitième puits (dilution 1/256), [Mannose] = 0.014 mg/ml, ceci indique que nos lectines ont une moindre affinité avec le Mannose

Sur ce, parmi les 21 saccharides utilisés, nos lectines présentent une affinité pour seulement trois d'entre eux, ceci dit, le degré d'affinité pour chacun d'entre eux est différent, nos lectines sont donc spécifiques pour la raffinose car c'est celui avec lequel elles présentent une plus forte affinité.

8. Chromatographie :

8-1 chromatographies sur gel d'exclusion Séphadex G 50 :

La chromatographie sur colonne de Séphadex G50 permis de purifier votre échantillon Et d'en extraire 82 fractions. On a ensuite procédé au dosage des fractions à 280nm, les résultats obtenus :

Tableau 16 : Résultats du dosage des 82 fractions obtenues après purification des protéines

F	Volume	Abs									
1	2	0.029	22	44	0.179	43	86	0.018	64	128	0.014
2	4	0.067	23	46	0.129	44	88	0.011	65	130	0.014
3	6	0.725	24	48	0.087	45	90	0.022	66	132	0.014
4	8	0.723	25	50	0.093	46	92	0.032	67	134	0.014
5	10	0.879	26	52	0.070	47	94	0.010	68	136	0.044
6	12	0.763	27	54	0.069	48	96	0.006	69	138	0.016
7	14	0.548	28	56	0.056	49	98	0.013	70	140	0.016
8	16	0.443	29	58	0.046	50	100	0.013	71	142	0.015
9	18	0.365	30	60	0.035	51	102	0.012	72	144	0.029
10	20	0.318	31	62	0.035	52	104	0.004	73	146	0.015
11	22	0.287	32	64	0.019	53	106	0.010	74	148	0.015
12	24	0.229	33	66	0.037	54	108	0.004	75	150	0.015
13	26	0.238	34	68	0.030	55	110	0.003	76	152	0.005
14	28	0.178	35	70	0.030	56	112	0.004	77	154	0.004
15	30	0.215	36	72	0.030	57	114	0.011	78	156	0.027
16	32	0.142	37	74	0.031	58	116	0.011	79	158	0.001
17	34	0.465	38	76	0.030	59	118	0.011	80	160	0.008
18	36	0.560	39	78	0.017	60	120	0.011	81	162	0.007
19	38	0.325	40	80	0.033	61	122	0.003	82	164	0.006
20	40	0.279	41	82	0.007	62	124	0.014			
21	42	0.231	42	84	0.008	63	126	0.014			

F : fraction /Abs : Absorbance

A la fin, tracé la courbe représentant le profil d'élution : absorbance à 280nm en fonction du volume d'élution.

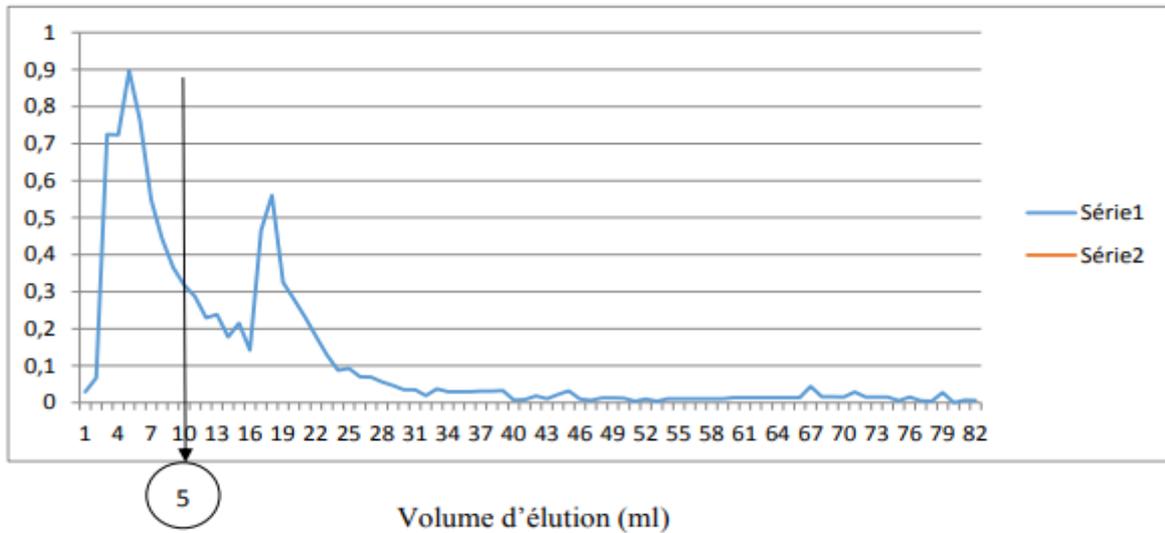


Figure 13 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction du volume d'élution des différentes fractions protéiques

8-2 L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de Séphadex

G 200

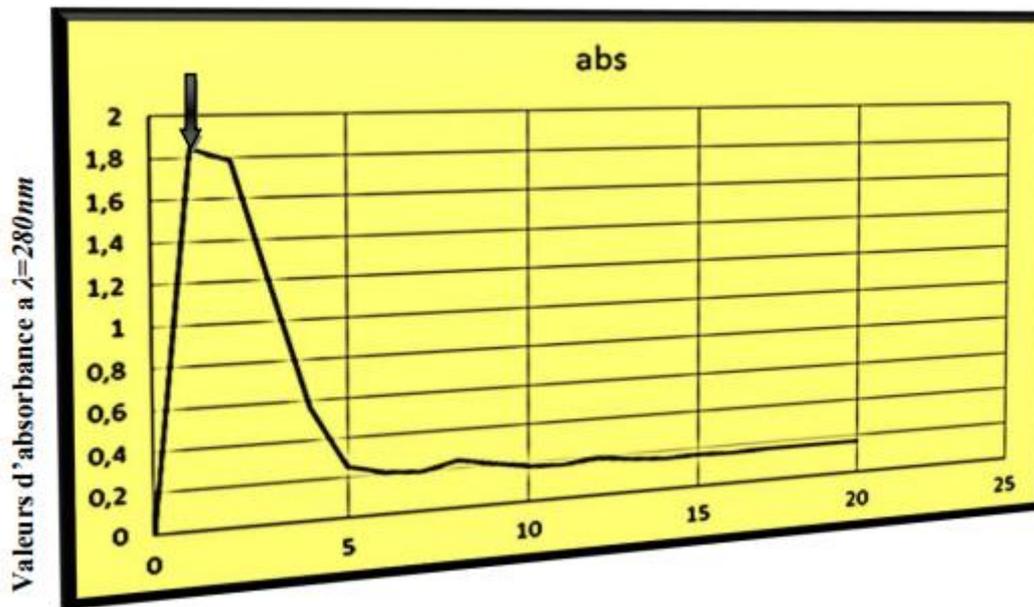


Figure 14 : la courbe d'Absorbance de l'extrait des Spermogonia-rubra L Jet Pest (a) après leur passage à travers la colonne de Séphadex G200. Les valeurs d'Absorbance à 280 nm se trouvent dans les tubes de 1 à 20

8-3 L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Séphadex G75

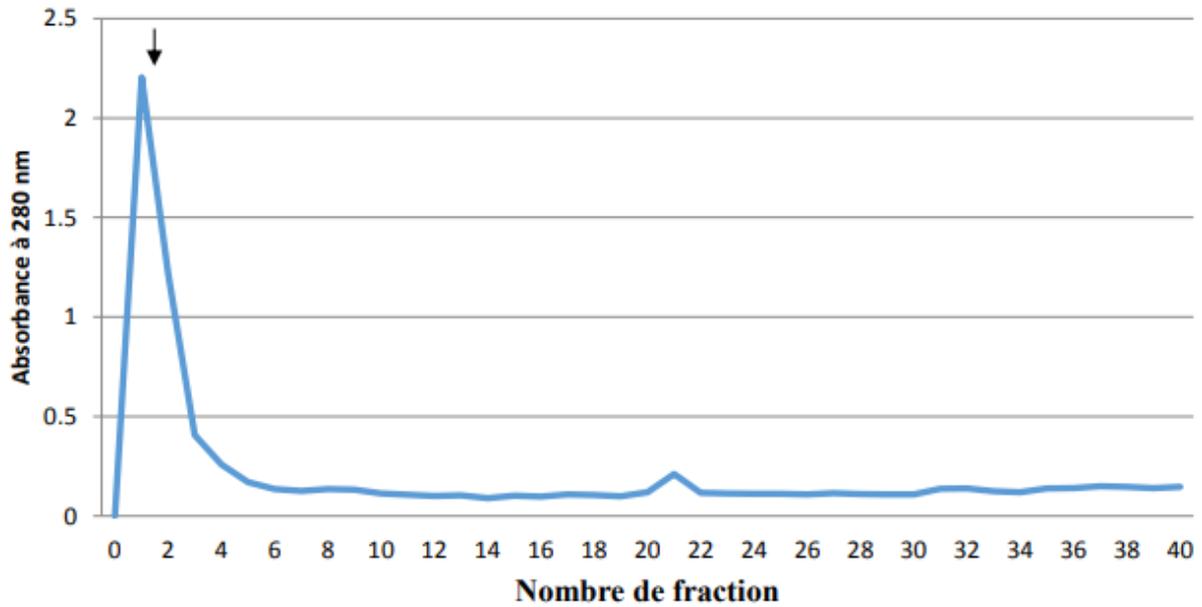


Figure 15 : Courbe représenté la Filtration d'extrait d'Eucalyptus globulus sur colonne de Séphadex G75.

- L'extrait de Spergularia-rubra-L jet Pest et eucalyptus globulus donnent un seul pic. Ces résultats sont similaires à ceux des lectines de Pterocliadiella capillacea et des lectines de Morus nigra séparées par chromatographie sur colonne de Séphadex G75 (37)

9. Test de L'effet du pH sur l'hémagglutination

9-1 de champignon :

Tableau 17 : résultats de l'effet du pH sur l'hémagglutination de «Agrocybe Aegerita »

P	1/2	1/4	1/8	1/1	1/3	1/6	1/12	1/25	1/51	1/104	1/204	1/409
h				6	2	4	8	6	2	2	8	6
3	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	++ +	++ +	++ +	++	++	++	+	+	-	-	-	-
5	++ +	++ +	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-

6	++ +	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	++ +	++ +	++ +	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+
9	++ +	++ +	++ +	++	++	++	++	++	++	+	+	-
10	++ +	++ +	++ +	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-
11	++ +	++ +	++ +	++	++	++	++	+	+	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Agglutination absente

+ Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination

T : témoin négative

* A pH = 3, il y'a une forte agglutination dans les deux premiers puits qui s'affaiblit dans le troisième puits jusqu'au septième, elle atteint sa limite dans le huitième puits (dilution 1/256) avec une concentration en lectines égale à : 1.99mg/ml, cette dernière ne change presque pas à pH = 4 où elle atteint sa limite dans le neuvième puits (dilution 1/512) avec une concentration en lectines égale à : 0.99mg/ml

*A pH = [5 ; 6] l'activité hémagglutinante atteint ses limites respectivement dans le septième (dilution : 1/128) et le huitième (dilution : 1/256) puits avec des concentrations égales à : 3.98mg/ml et 1.99mg/ml. Cette dernière est à son apogée

à pH = 8 qui montre une agglutination dans les douze puits et qui commence ensuite à diminuer progressivement à pH= [9 ; 10] avec la même agglutination dans les onze puits qui disparaît au niveau du douzième puits (dilution : 1/4096) avec une concentration de 0.12mg/ml.

* A pH= [11] l'agglutination de lectine persiste comme même jusqu'au neuvième puits qui disparaît au niveau de dixième (dilution : 1/1024) avec la concentration de 0.49mg/ml. Les pH très acides (entre 3, 4,5) affectent considérablement l'activité hémagglutinante,

Cependant au-delà d'un pH de 8, l'activité se stabilise, même à des pH très alcalins (pH 11). Ces résultats suggèrent fortement que la lectine a un pHi basique se rapprochant de 8.

L'activité hémagglutinante de ces lectines est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11. (Patrick H.K Ngai, 2004)

9-2 des plantes :

Tableau 18 : résultats de l'effet de pH sur les plantes

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Spergularia Rubra L	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++
Eucalyptus globulus	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Témoin négative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

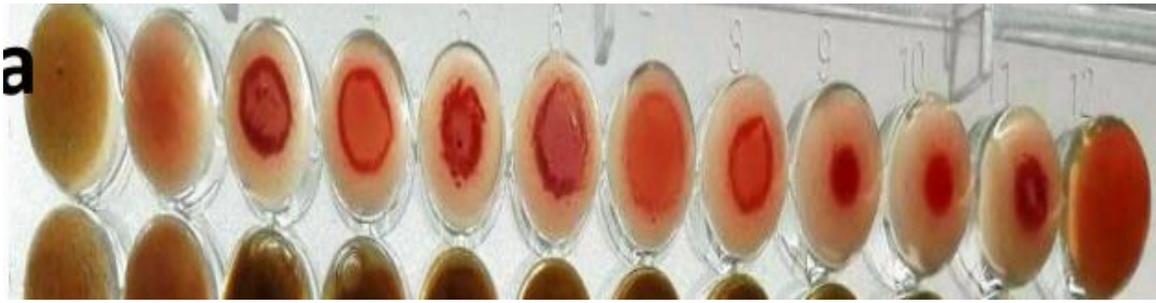
- : Agglutination absente

+ Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination

- L'activité d'agglutination des lectines de *Spergularia-rubra L* Jet Pest est forte et stable dans un intervalle allant de [3 à 8] et pH 12, alors qu'elle est faible de [1 à 2] par contre de [9 à 11] l'agglutination est nulle.



- L'extrait de d'Eucalyptus globulus, résistance à toute du long de gamme du pH testée de 1 jusqu'à 12.



10. Test concernant le champignon :

- Précipitation au sulfate d'ammonium

Tableau 19 : Résultats après précipitation au sulfate d'ammonium

fraction	F (0-40%)	F(40-80%)
Lecture	++/+/+	+++/>+++/>+++
Témoin négative	-	-

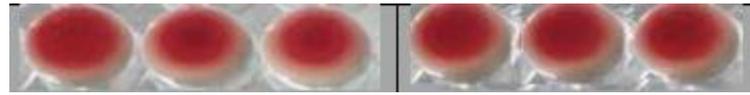
F : Fraction

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : absence d'agglutination

- Deux niveaux de saturation (NH₄)₂SO₄ ont été utilisés pour purifier partiellement l'extrait brute le test dévoile la présence des lectines dans les deux fractions et cela montre que le sulfate d'ammonium a précipité différemment dans notre champignon « Agrocybe Aegerita », mais **la fraction (40-80%) est la plus active de l'extrait.**



(0-40%)

(40-80%)

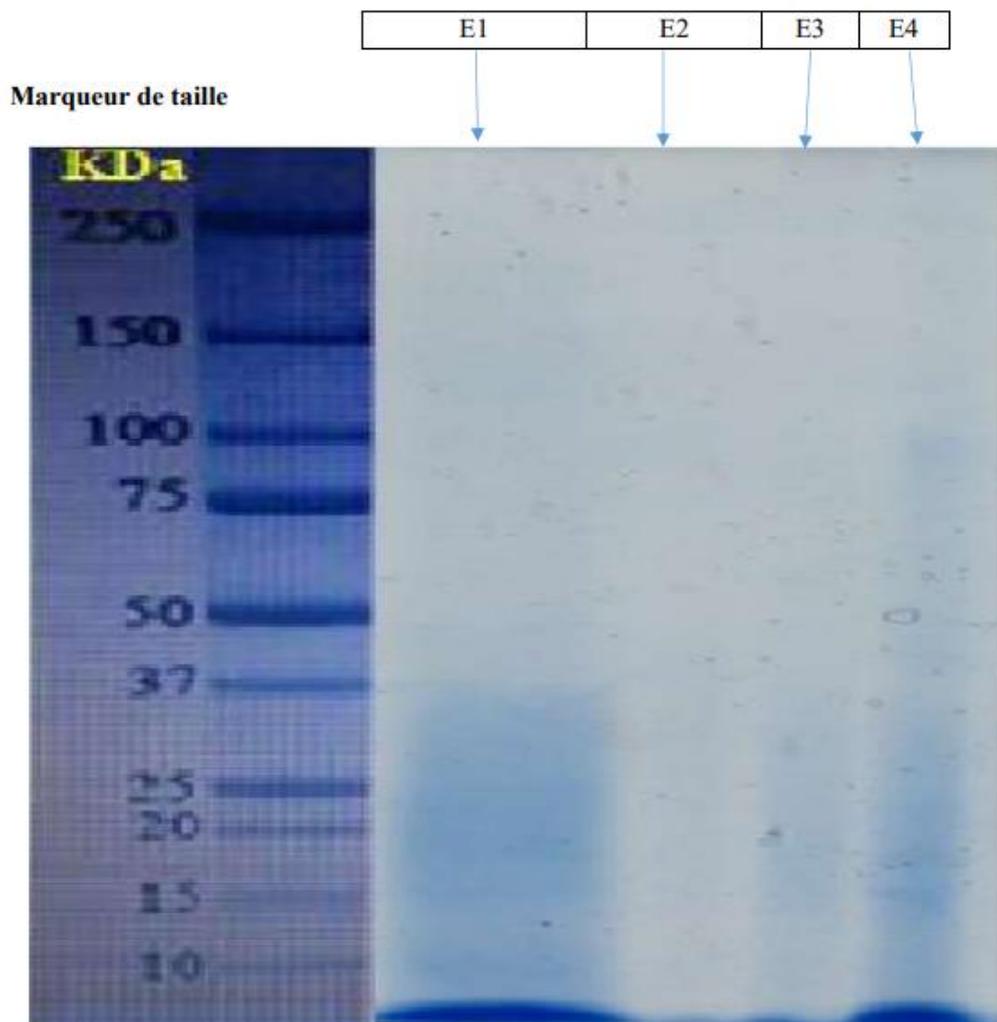
➤ **SDS-PAGE :**

Les échantillons soumis à l'électrophorèse sont : le lyophilisat dilué, le mélange des neufs tubes avant lyophilisation, l'extrait brut et le dialysat, leurs concentrations sont reprises dans le tableau.

Tableau 20 : Les échantillons soumis à l'électrophorèse et leurs concentrations

	Concentrations (mg/ml)
Lyophilisat	0.460
Mélange	0.482
Extrait Brut	0.632
Dialysat	0.510

Il donne le profil électro-phorétique suivant :



(E1) Lyophilisat

(E2) Mélange avant lyophilisation

(E3) Extrait Brut

(E4) Dialysat

- Le but du SDS PAGE : permet d'évaluer la pureté et la masse moléculaire de chaque protéine en comparant avec la migration électro phorétique et la masse moléculaire d'un standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire connu (Précision Plus, protéine non colorée, Biorad)
- Le premier puits semble avoir une bande localisée à environ 100KDa qui disparaît dans le lyophilisat et ceci est logique après une étape de purification relative à la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G50. Finalement il ne reste que cinq bandes certes difficilement observables avec tout de même une bande tranche à 8KDa qui est commune à toutes les lectines appartenant aux 4 échantillons analysés, et les quatre autres correspondent respectivement à des PM : 18, 20, 25 et 36KDa
- Il en ressort finalement que nos lectines soient composées de cinq sous unités complètement hétérogènes
- les poids moléculaires des lectines fongiques sont d'une grande variabilité, ils se situent généralement entre 15KDa et 90KDa mais la majorité se situe entre 23KDa et 36KDa avec une à six sous-unités (**Feroz khan, 2001**).

**• L'ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU
CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR :**

Tableau 21 : Variation du volume de l'œdème chez les rats témoins et traités

Lot	Temps	Rats				
		1	2	3	4	5
Témoin	0 min	1	1	1	1	1
Formaldéhyde	30 min	2.5	2.6	2.5	2.6	2.5
	60min	3	2.8	2.7	2.4	2.5
	120min	3	3.1	3	3	2.6
Diclofénac + Formaldéhyde	30min	2.5	2.7	2.1	2	2.1
	60 min	2.3	2.3	2.2	2.3	2.1
	120min	2.1	2.4	2	1.9	2.4
Lectine+ Formaldéhyde	0min	1	1	1	1	1
	30min	0.1	0.2	0.4	0.4	0.3
	60 min	0.5	0.9	0.9	0.6	0.5

Des comparaisons multiples entre les groupes ont été exécutées par des mesures répétées ANOVA

Tableau 22 : Résultats des statistiques significatives Anova de l'œdème

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Source de variation en groupe	58,5818333	11	5,3256212	169,51579	1,756E-34	1,99458001
A l'intérieur des groupes	1,508	48	0,03141667			
Total	60,0898333	59				

	120min	0.1	0.4	0.5	0.1	0.4
	180min	0	0.2	0.4	0.4	0.4

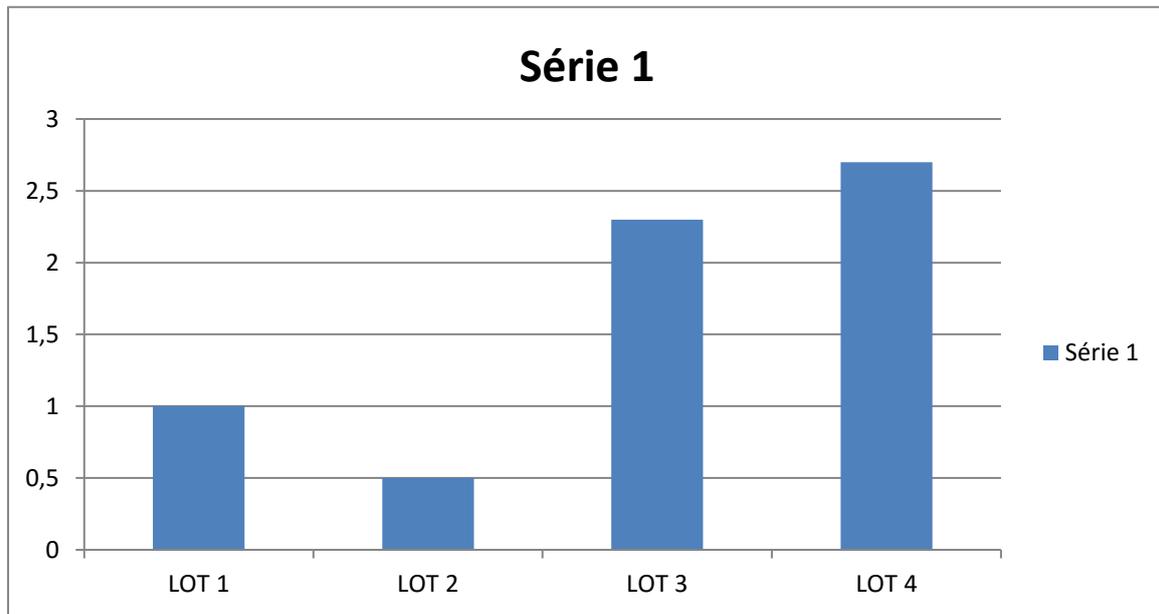


Figure 35 : histogramme de l'évolution de volume de l'œdème en fonction du temps

LOT 1 : témoin

LOT 2 : Lectine + formaldéhyde

LOT 3 : Diclofénac +formaldéhyde

LOT 4 : formaldéhyde

- Le lot traité par l'extrait +le formaldéhyde, on remarque qu'il a induit l'inflammation avec le temps de 20% par rapport au lot témoin, Après 120 min diminution de l'inflammation, à 180 min disparition de l'inflammation
- Pour le lot du Diclofénac + formaldéhyde, le volume de l'œdème augmente également proportionnellement avec le temps. Il est de 2,22ml après, avec 90 minutes avec un pourcentage d'augmentation de 47.5% par rapport au volume initial, et de 0.5 ml après 180 minutes avec un pourcentage de 45.6% .En comparant ces résultats avec ceux du lot témoin qui donne un volume de 1ml avec un pourcentage de 20%, on remarque clairement que l'injection du formaldéhyde seul provoque une très grande inflammation par rapport au lot négatif qui n'induit l'inflammation que de 10% grâce au Diclofénac (qui a été utilisé comme un anti inflammatoire)

MATERIELS ET METHODES

- Le volume de l'œdème (l'état inflammatoire) induit par le formaldéhyde augmente avec le temps. Après 90 minutes il est de 2.72 ml Cette valeur correspond à un pourcentage d'augmentation de 57,34% par rapport au volume initial du pied.
- L'analyse de ces résultats montre que l'extrait brut du champignon « *Agrocybe Aegerita* » a montré un effet anti-inflammatoire qui a induit une forte inhibition de l'inflammation à la première heure

Chapitre 4 : conclusion

A l'issue de ce travail, une étude comparative entre trois espèces :

- ❖ Le champignon : *Agrocybe Aegerita*.
- ❖ La plante : *Spergularia Rubra* L jet Pest.
- ❖ La plante : *eucalyptus globulus*,

Nous a permis de mieux connaître certains aspects importants que représente le monde des lectines. Qui 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. 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 qui doivent être pleinement exploitées

Tableau 23 : montre les différentes caractéristiques de comparaison entre les trois espèces.

Tests	Résultats obtenus	Observation
Hémagglutination	Très forte agglutination	-Formation de réseau entre les lectines et les hématies -Diminution de la concentration des lectines (dilution) → l'absence d'agglutination
Températures	[30-80 °C]	- une forte résistance à haute température, (thermorésistante)
Inhibition par les saccharides et les glycoprotéines	Présence d'agglutination à certains sucres et l'absence à certains d'autres	-affinité entre le sucre et la lectine → pas d'agglutination, et le contraire -les sucres qui n'ont pas d'agglutination à chaque fois dilué (diminution de la

		concentration)→présence d'agglutination
pH	<p>-le champignon L'activité hémagglutinante de ces lectines est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11.</p> <p>- L'activité d'agglutination des lectines de <i>Spergularia-rubra</i> L Jet Pest est fort et stables dans un intervalle allant de [3à 8]</p> <p>- L'extrait de d'<i>Eucalyptus globulus</i>, résistance à toute du long de gamme du pH testée de 1 jusqu'à 12.</p>	Le PH optimum est spécifique de chaque espèce
Chromatographies	Un à plusieurs pics	
précipitation au sulfate d'ammonium	Active dans la fraction (40-80%)	
SDS-PAGE «Agrocybe Aegerita»	les lectines soient composées de cinq sous unités complètement hétérogènes	
Poids moléculaires	23 et 36 KDa	
Test biologique de l'Agrocybe Aegerita	Un effet anti –inflammatoire	- un effet anti-inflammatoire qui a induit une forte inhibition de l'inflammation à la première heure

REFERENCES

- (1) goldstein and al 1980 whatshouldbecalled a lectin ?
- (2) Karoline S.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de Dictyosteliumdiscoideum. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Université Grenoble 1- Joseph Fourier.
- (3) ghopkins and evrard 2003
- (4) liener and al 1986 the lectinpropertiesfunctions and applications in biology and medicine
- (5) goldstein and hayes 1978 advances in carbohydrate chemistry and biochemistry
- (6) .Rüdiger, H. &Gabijs, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconj. J. 18, 589–613 (2001). (7)
- Guillot, J. et al. [Modification of glycoconjugatesduring the carcinogenesis: the case o of mammarycarcinomas]. Bull Cancer 91, 141–158 (2004).
- (8) SHARON, N. and LIS, H. (2004). History of lectins: fromhemagglutinins to biological recognitionmolecules. Glycobiology, 14, 53R-62R.
- (9) Lenka s.,Imberty A., Jaroslav,k., 2006: Modelisationmoleculaire des lectines et des glycosyltransferases. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph fourier. universitegrenoble i – joseph fourier.
- (10) SHARON. N., LIS. H. Legumelectins-A large family of homologousproteins. FASEB J, 1990.
- (11)Lis, H. and Sharon, N. (1998) Lectins carbohydrate-specificproteinsthatmediate cellular Recognition.Chem.Rev., 98,637-674.
- (12) Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008) Chemicaltools for functionalstudies of glycans. Chem. Soc. Rev., 37, 1579-1591
- (13)Dam TK and Brewer CF. (2002) .Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. Chem. Rev.102, 387-429
- (14)Gianluca Cioci ; Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongigiques. Biomolecules. Université Joseph-Fourier -Grenoble I, 2006. French. <tel00081084>
- (15) Karoline S.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de Dictyosteliumdiscoideum. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Universoté Grenoble 1- Joseph Fourier.
- (16)ETZLER, M.E. (1986). Distribution and function of plant lectinsinThelectins:

REFERENCES

- properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J. ,Academic Press, Inc., p. 371-437.
- (17) Peumans W.J., Van Damme J.M. (1995)-lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109,347-352
- (18) Sharon, N. (1996) Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*,408, 1-8.
- (19) Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M. (2005) Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 525-534.
- (20) Low, D., Braaten, B. and Van der Woude, M. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology Press A, Washington D.C.
- (21) Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.*, 181, 1059-1071.
- (22) Merritt, E.A., and Hol, W.G.J. (1995) AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 165-171
- (23) Kostlanova, N., Mitchell, E.P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gilboa-Garber, N., Chambat, G., Wimmerová, M. and Imberty, A. (2005) The fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum*: a new type of beta-propeller architecture formed by
- (24) Ng T.B., 2004: Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073. Nussenzweig, R. S. (1967) *Exp. Parasit.*, 21, 224
- (25) Ng T.B., 2004: Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073. Nussenzweig, R. S. (1967) *Exp. Parasit.*, 21, 224
- (26) She, Q.B., Ng, T.B. and Liu, (1988). A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 247, 106-111
- (27) Size, S.C.W., H.O., J.C.K. and Liu, W.K. (2004). *Volvariella volvacea* lectin activities on T lymphocytes by calcium dependent pathway. *J. Cell. Biochem.*, 92, 1193-1202.
- (28) Guillot, J., Kanska G., 1997 : Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Ecol.*, 25, 203- 230.
- (29) Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de langerhans : la langéine. *Chimie et sciences du vivant*. Université de Grenoble. 2012. pp 63-64
- (30) Myoshim. et Al (1982). The lethal protein from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. vitaminol.*, 28, 255-264

REFERENCES

- (31) Peumans W. J. and Damme E. J. M. V. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-352.
- (32) Babosa T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95 (5), 673-678
- (33) 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
- (34) Nachbarn 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
- (35) Wang H., NG T.G. (1998) - Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*, , 253, 143- 146
- (36) Dole A., Lindeberg S. (2005). Agrarian diet and diseases of affluence - do evolutionary novel dietary lectins cause leptin resistance. *Bio, med central* [doi .10.1186 ,1472-6823-5-10](https://doi.org/10.1186/1472-6823-5-10) .
- (37) Necib. Y., Bahi A., Derri. N, Fateh Merouan. F, Bouadi. H., Boulahrouf. K. Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2014. 4(1):1707-1719.
- (38) Mémoire 1 : Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines extraites du champignon « *Agrocybe Aegerita* » encadrant : Mr zitouni A
- (39) Mémoire 2 : L'extraction des lectines à partir des racines de deux plantes médicinales (*Eucalyptus globulus* et *Pinus sylvestris*) rapporteur : Ms Bahi A
- (40) Mémoire 3 : l'étude comparative de lectine extraite à partir de trois plantes *Spergularia rubra-L* et *Pest inula viscosa leaves* et *linum usitatissimum* rapporteur : Bahi A

Annexe 1 : Préparation des hématies à 3%

Un prélèvement de sang oculaire a été effectué sur un lapin de 3kg. Le sang est prélevé directement dans un tube héparine (5 ml), il est ensuite soumis à une première centrifugation à 4000Tr/min pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant issu de cette centrifugation est versé dans un évier tandis que le culot (1.5ml) est ajouté à une solution de NaCl 0.9% (3.5ml), le tout est mélangé délicatement puis soumis à une deuxième centrifugation toujours à 4000Tr/min pendant 10 minutes, et ainsi de suite jusqu'à arriver à 3 centrifugations (l'opération a été répétée à 3 reprises, jusqu'à obtention d'un surnageant clair). A la fin de la troisième centrifugation, le culot est dilué dans la solution de NaCl 0.9% à raison de 1.5 ml d'hématies par 48.5ml de NaCl dans le but d'obtenir une suspension d'hématies à 3%.

Annexe 2 : 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	1,44g
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 3 : Préparation des monosaccharides et des glycoprotéines.

Sucre	NaCl
0,1g	1ml

Annexe 4 : Préparation du gel de séparation (T : 12,52% ; C : 0,97%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2.4
Eau distillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	1
TEMED	0.02

Annexe 5 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1
Bisacrylamide 2%	0.3
Eau distillée	10.2
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14
APS 1%	0,7
TEMED	0,014

Annexe 6 : Préparation d'une solution de Coloration pour le gel d'électrophorèse

TCA 60%	Solution mère de bleu de Coomassie R250	Eau distillée
50ml	12,5ml	250ml

➤ Solution mère de Bleu de coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	5g
Ethanol 95°	500ml

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : MORDJANA Nihad
BECHARA Mimouna

Les lectines dans le monde de la glycobiologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

RESUME

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.

Les lectines appartiennent à une division importante d'organismes et elles présentent un large éventail d'activités biologiques importantes pour le fonctionnement de la cellule et de l'organisme entier, et ce, en raison de la haute spécificité de la liaison réversible aux hydrates de carbone. Elles sont des outils précieux largement utilisés en biologie et en médecine et aussi en diverses applications biotechnologiques.

Ici, nous passons revue une caractérisation partielle des lectines isolées à partir du champignon *AgrocybeAegerita* et les plantes : *Spergularia Rubra* L et *Pest* et *Eucalyptus globulus*, y compris leur localisation, leurs propriétés et leurs spécificités glucidiques.

Ces protéines sont généralement extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, de leur thermo-stabilité, leurs interactions et affinités avec les sucres. Elles sont ensuite partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur gel d'exclusion. La pureté de la lectine est ensuite vérifiée par une (SDS-PAGE) dans des conditions dénaturantes.

Les effets anti-inflammatoires du champignon « *AgrocybeAegerita* » sont évalués sur les rats wistar. Une des méthodes utilisées consiste à administrer l'extrait brut de champignon par voie intra péritonéale 30 minutes avant l'induction de l'inflammation (l'œdème du pied) par 0.1ml de formaldéhyde à 2%. La drogue de référence est un anti-inflammatoire : le "Diclofenac" 25mg..

Mots-clefs : Lectines ; affinité ; Agglutination ; Purification

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biochimie (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Mr Zitouni.A (Maitre de conférences B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr Naccib.Y (professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mr Boulahrouf.k (Maitre de conférences B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).