

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
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء الحيوية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

*L'extraction des lectines à partir d'une plante médicinale
«Punica Granatum » avec des tests biologiques.*

Présenté par : FILALI CHOUBEILA
LEULMI SOULEF

Le 19/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme BAHIA (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 1 : Mr NECIB.Y (Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 2 : Mme LOUAAR.I (Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021- 2022

Remerciements



Avant tout, 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 Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre Encadreur Dr BAHI Ahlem Maître de conférences au département De Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine, qui nous a encadrées et dirigées ce Travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ces encouragements, sa gentillesse Nous sommes très honoré de travailler avec elle Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire Sans oublier de remercier vivement les membres de l'équipe laboratoire.

Dédicace (FilaliChoubeila)

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

À ma chère mère pour tous ses sacrifices, son amour, sa tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études.

À ma chère sœur (Imene) pour ses encouragements constants et son soutien moral.

À mes chers frères. (Mohammed, hamza, KfirEddine, Yahia) pour leur soutien et leurs encouragements,

À ma chère amie soulef.

À tous les professeurs et responsables avec nous sur cette note Que ce travail soit l'accomplissement de mes désirs et le fruit de votre soutien constant.

Merci d'être toujours à mes côtés.

Dédicace (Leulmi soulef)

Je dédié ce travail à tous ceux qui me sont chers.

À mes chers parents (Ahmed, zebida), qui toujours m'aider et m'a donné les forces et la patience d'accomplir ce modeste travail et ont faisant de moi que je suis aujourd'hui

À mon frère (Mohammed lamine) et sa femme(Racha), mes sœurs (Lamia, Soumia, Kenza, Asma) et leurs enfants présents dans tous mes moments par son soutien moral

À mes chères amies(djouheina, rayene, Choubeila)

À tous mes professeurs qui m'ont enseigné dans mon parcours académique du primaire à l'université.

Table de la matière

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction1

Section1 : EtudeBibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur les lectines

1. Définition des lectines.....	3
2 .Historique.....	3
3. la structure des lectines.....	5
3-1.les lectines simples.....	5
3-2.les lectines en mosaïques.....	5
3-3 .les assemblages macromoléculaire.....	6
3-4.la structure tridimensionnelle.....	6
4. La Classification des lectines	7
4-1.che les animaux.....	7
4-1-1:les lectines extracellulaires.....	7
4-1-2 : les lectines intracellulaires.....	7
4-2.Chez les végétaux	7
4-2-1 : les mérolectines.....	7
4-2-2 : les hollectines	8
4-2-3 : les chimérolectines	8
4-2-4 : les superlectines.....	8
5 :.les site des liaisons des lectines	8
6. la spécificité et affinité des lectines	9

7. les fonctions biologiques des lectines	11
8. la distribution des lectines dans le monde vivant.....	11
8-1 : les lectines des microorganismes.....	12
8-1-1 : les lectines bactériennes.....	12
8-1-2 : les lectines viral	12
8-1-3 : les lectines des champignons.....	13
8-2 : les lectines animales.....	13
8-3 : les lectines végétales.....	13
9 .les propriétés des lectines.....	14
9-1 : propriétés biologiques	14
9-1-1 :l'interaction lectine-glucide.....	14
9-1-2 :L'agglutination des cellules.....	14
9-2: Autrepropriétés.....	14
10 :l'intérêt des lectines	15
10-1 : En biochimie et protéomique.....	15
10-2 : Dans le domaine biomédical	15
10-2-1 : hématologie.....	15
10-2-2 : Immunologie.....	15
10-2-3 : Biologie cellulaire	16
10-2-4 : Cancérologie	16
10-3 : Dans le domaine agronomique	16
 Chapitre 2 : Le système sanguin	
1 : Définition	17
2 : Historique	17
3 : Système des groupes sanguins.....	17

3-1 : Le système ABO	17
3-2 : Facteur Rhésus (Rh)	18

Chapitre 03 : Généralité sur la plante médicinale utilisée

1 : Généralité	19
2 : Historique	19
3: Nomenclature	19
4 : La classification botanique	20
5 : La présentation et description botanique du grenadier	20
6: Utilisation traditionnelle	21
7 : Propriété thérapeutique des grenadiers	21

Section 02 : Matériel et méthode

I. Matériel.....	23
I.1. Le matériel vivant.....	23
I.2. Le matériel végétal.....	23
II. Méthodes.....	23
1. La Préparation des plantes	23
2. L'extraction des plantes.....	24
2.1. Le principe.....	24
2.2 .La Technique d'extraction.....	24
3. Le test d'héماغglutination.....	25
3.1 .La Préparation des hématies à 3%.....	25
3.2. Lavage des hématies.....	25
3.3 .La dilution des hématies.....	25
3.4. La technique d'héماغglutination.....	25

4. La limite d'héماغglutination.....	25
5. L'effet de la température sur l'agglutination.....	26
6. L'effet du pH sur l'agglutination.....	26
7. Le test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines....	26
8. Le test d'agglutination sur les héματος humaines ABO.....	27
8.1. Principe.....	27
9. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.....	27
9.1 La préparation de la colonne de Sephadex G75.....	27
9.2 La filtration des lectines.....	27

Section 0 3 : Résultats et interprétation

1. Le test d'héماغglutination.....	28
2. La limite d'héماغglutination.....	28
3. L'effet de la température sur l'agglutination.....	29
4. L'effet du pH sur l'agglutination.....	29
5. Le test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines....	30
6. Le test d'agglutination sur les héματος humaines ABO.....	31
7. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.....	32
Discussion.....	34
Conclusion générale et perspective.....	37
Références bibliographique	38
Annexes.....	48

Liste des abréviations

Con A : convaline Alectine.

Con B : lectine de convaliabrasiliensis.

VIH : Human immunodeficiency type 1.

PA : IL de pseudomonase.

ABO : groupe de Système sanguine.

RH : Rhésus.

RIPs: Ribosome inactivant les protéines.

LecRks : lectines récepteurs des kinases.

LTLs : lectines humain de type L.

AC: Anti corps.

Ag: Anti gene.

Gal: Galactose.

Man: Mannose.

GLC: Glucose.

Gal NAC: N-acetyl Galactosamine.

Ca²⁺: Ion calcium.

Mn²⁺ : Ion Manganèse.

PG: Punica granatum.

TCA: Trichloro Acetic Acid.

PBS: Phosphate Buffer saline.

Liste des figures

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

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

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

Figure 04 : Structure tridimensionnelle de la concanavaleine A. Une lectine d'origine légumineuse de *Canavalia ensiformis* (source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., *et al.* 1999)

Figure 05 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides
(Sharon *et Lis*, 1993).

Figure 06 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides
Monosaccharides et oligosaccharides (Ghazarian *Het all*, 2011).

Figure07 : Représentation schématique de la distribution de group ABO et Rhésus sur laMembrane d'une hématie (David Germanaud, *et all.*, 2003).

Figure 08 :*P. granatum*.

Figure 09 : Caractéristiques botaniques du grenadier (Yssad, 2019).

Figure 10 : Maladies traitées par *punica granatum* (Heber *et al.*, 2006).

Figure 11 :Schéma d'extraction des lectines à partir de poudre de pelure de plante.

Figure 12: La courbe d'Absorbance de l'extrait *Punica granatum* après leur passage à travers la colonne de Sephadex G75.

Liste des tableaux

Tableau 01 : historique de découverte des lectines.

Tableau 02 : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines (**Renato, et coll. 1**).

Tableau 03 : Exemples des Lectines et leur distribution dans le monde vivant.

Tableau 04 : Activité de la limite d'agglutination d'*Punica granatum*.

Tableau 05 : Effet de la température sur l'activité d'hémagglutination des lectines d'extraite brut d' *punica granatum*.

Tableau 06: L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits *Punica granatum*.

Tableau 07:Inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine extraite de la pelure de *Punica granatum* par des saccharides et glycoprotéines.

Tableau 08:L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d' *Punica granatum*.

Tableau 09:Résultats de l'absorbance de 40 fractions obtenues après la purification partielle des Protéines par chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G75.

Tableau 10: résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics Obtenues après chromatographie.

Tableau 11: Résultats de l'absorbance de 40 fractions obtenues après la purification partielle des Protéines par chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G75.

Liste des photos

Photo 01: les pelures de *Punica granatum*.

Photo 02: l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Punica granatum*.

Photo 03 : test de la limite d'hémagglutination de *Punica granatum*.

Photo 04: l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.

Photo 05 : l'effet du PH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.

Photo 06 : Le test d'inhibition d'agglutination par les saccharides et les glycoprotéines.

Photo 07 : L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut de *Punica granatum*.

Résumé

Les lectines sont une famille de protéines polyvalentes et polyvalentes et de glycoprotéines de nature non immunogène qui se lient de manière spécifique, non covalente et réversible aux fractions glucidiques.

L'objectif de cette étude est de rechercher les lectines présentes dans les écorces de la plante médicinale (*Punica granatum*) à travers le test d'agglutination et l'étude biologique de ses différentes propriétés afin de rapporter le pH approprié, la stabilité thermique, les interactions avec les sucres et avec l'activité d'hémagglutination ABO. Puis broyage, trempage dans du sérum physiologique, détection qualitative et quantitative, agglutination avec du sang de lapin, double dilution, puis passage en chromatographie verticale.

L'activité d'agglutination de l'extrait (*Punica granatum*) avec du sang de lapin a montré une intensité d'agglutination estimée à (1/14096) et ces lectines ont montré une activité d'hémagglutination avec tous les groupes sanguins (il a été donné une sélectivité élevée avec tous les groupes sanguins AB, A, B, O) pour le traitement thermique l'agglutination a été dans les deux La température est (20°, 40°, 60°, 80°, 100°) mais la température optimale est (60) (après une période d'incubation de 30 minutes) .

Extrait de lectines (*Punica granatum*) à différents pH pendant une heure Avec cela, l'activité agglutinante optimale est (Ph=13 et Ph=1,31) ci-dessous caractérisée par un pH acide et alcalin (après une période d'incubation de 30 minutes).

Dans le test d'inhibition avec différents glucides, aucune inhibition n'a été montrée

L'application de la chromatographie verticale à l'aide de Sephadex G75 en a donné un 4pic élevé.

Les mots clés

Lectines, extraction, activité d'hémagglutination, plante médicinale, sucres, glycoprotéines, système ABO, inhibition.

Abstract

Lectins are a family of general-purpose, general-purpose proteins and glycoprotein that are non-immunogenic in nature that bind specifically, non-covalently, and reversibly to carbohydrate moieties.

The objective of this study is to research the lectins present in the bark of the medicinal plant (*Punica granatum*) through the agglutination test and the biological study of its different properties in order to report the appropriate pH, thermal stability, interactions with sugars and with ABO hemagglutination activity. Then grinding, soaking in physiological saline, qualitative and quantitative detection, agglutination with rabbit blood, double dilution, then passage in vertical chromatography.

The agglutination activity of the extract (*Punica granatum*) with rabbit blood showed an agglutination intensity estimated at (1/14096) and these lectins showed hemagglutination activity with all blood groups (it has been given high selectivity with all blood groups AB, A, B, O) for heat treatment agglutination was in both Temperature is (20°, 40°, 60°, 80°, 100°) but optimum temperature is (60°) (after a period of 30 minute incubation).

Lectins (*Punica granatum*) extract at different pH for one hour 30 min incubation).

In the inhibition test with different carbohydrates, no inhibition was shown

Applying vertical chromatography using séphadex G754 gave a high peak of it.

Keywords

Lectins, extraction, hemagglutination, activity, medicinal plant, sugars, glycoprotein, ABO system, inhibition.

المخلص

تعد الليكتينات من عائلة البروتينات والجليكوبروتينات متعددة الوجود ومتعددة التكافؤ ذات طبيعة غير مناعية والتي ترتبط بطريقة محددة وغير تساهمية ، وقابل للانعكاس مع أجزاء الكربوهيدرات.

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الليكتينات الموجودة في قشور النبات الطبي (*Punica granatum*) من خلال اختبار التراص والدراسة البيولوجية لخصائصها المختلفة من أجل الإبلاغ عن درجة الحموضة المناسبة ، والاستقرار الحراري ، وتفاعلاتها وصلتها مع السكريات ، ومع نشاط التراص الدموي ABO. وجاء هذا الاستخراج عن طريق التجفيف ثم الطحن ، والنقع في المحلول الملحي ، والكشف النوعي والكمي ، بتراص مع دم الأرنب ، والتخفيف المزدوج ، ثم التمرير في الكروماتوغرافي العمودي.

أظهر نشاط ترavas المستخلص (*Punica granatum*) بدم الأرنب كثافة ترavas تقدر بـ (14096/1) وأظهرت هذه الليكتينات نشاط التراص الدموي مع جميع فصائل الدم (أعطيت انتقائية عالية مع جميع فصائل الدم A، AB، B، O) بالنسبة للمعالجة الحرارية ، كان التراص في كل من درجة الحرارة (20 درجة ، 40 درجة ، 60 درجة ، 80 درجة ، 100 درجة) ولكن درجة الحرارة المثلى هي (60) (بعد فترة حضانة مدتها 30 دقيقة).

مستخلص الليكتين (*Punica granatum*) عند درجات حموضة مختلفة لمدة ساعة واحدة وبهذا يكون نشاط التراص الأمثل هو (Ph = 13 و Ph = 1.31) ومنه يتميز بدرجة الحموضة الحمضية والقلوية (بعد فترة حضانة 30 دقيقة).

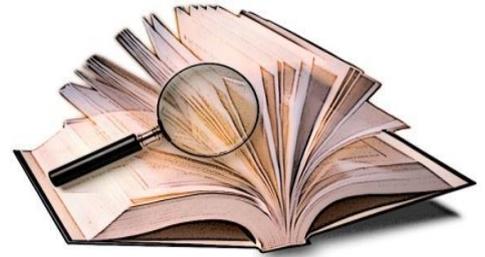
في اختبار التثبيط مع الكربوهيدرات المختلفة ، لم يظهر أي تثبيط.

أعطى تطبيق الكروماتوغرافي العمودي باستخدام Sephadex G75 أربع ذروات عالية.

الكلمات الدالة

الليكتين ، الاستخراج ، نشاط التراص الدموي ، النباتات الطبية ، السكريات ، البروتينات السكرية ، نظام ABO ، التثبيط.

• *Introduction*



Introduction

Les lectines sont une classe de protéines, leur seule caractéristique commune étant la capacité de se lier spécifiquement aux hydrates de carbone de manière réversible, et d'agglutiner les cellules (**Sharon, 1993**). Elles sont présentes en quantité plus importante chez les végétaux que les animaux. Elles possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment: l'agglutination des cellules, l'activité mitogène (stimulation lymphocytaire), l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antivirales et les effets immunitaires. Ces diverses propriétés sont à la base de l'utilisation des lectines dans le domaine biomédical (hématologie, immunologie, oncologie, biologie cellulaire et agronomie «défense des plantes contre les agents pathogènes ».) (**Meite et al., 2006**).

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 de la glycobiologie.

En 1970, les lectines sont devenues des outils extrêmement utiles pour l'étude des hydrates de carbone sur la surface des cellules.

Dans les années suivantes de nombreuses lectines ont été isolées à partir de plantes ainsi que des micro-organismes et des animaux, au cours des deux dernières décennies, les structures de certaines d'entre elles ont été mises en place. En même temps, il a été montré que les lectines fonctionnent comme des molécules de reconnaissance dans les interactions cellule-molécule et la cellule-cellule.

Les lectines comportent généralement plusieurs sites de liaisons, par conséquent, leur interaction avec les glucides à la surface des érythrocytes cause l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Ce phénomène, qui est appelé **hémagglutination**. Il est possible d'inhiber les réactions d'agglutination et de précipitation des lectines par les glucides spécifiques pour ces protéines. Les lectines sont présentes dans tous les organismes vivants.

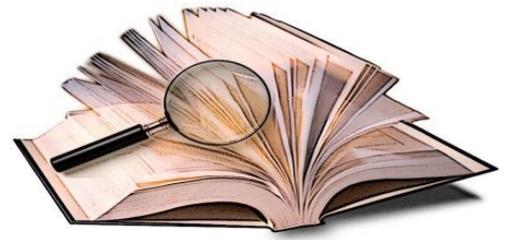
Introduction

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 groupe 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 (**Sharon et Lis, 2004**).

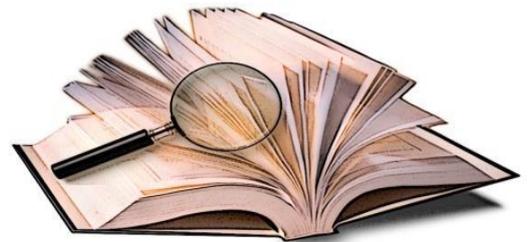
L'objectif principal de ce travail est de chercher la présence de lectine dans les Pelure de grenade, l'extraction des lectines à partir de plante médicinale et leur biologie :

- Etude la présence des lectines par le test hémagglutination avec le sang des lapins.
- Etude l'effet de la température, Ph sur l'activité de ces lectines.
- Etude l'affinité de ces lectines vers le glucide par le test d'inhibition d'une part et vers les globules rouge de l'être humain par le test ABO d'autre part.

Section01 :
EtudeBibliographique



Chapitre I :
Généralités sur Les
lectines



1 : Définition des lectines

et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire. Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (Lis and Sharon 1998). L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries.

2 : Historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes [73]. À partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1954, [9] ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné. Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin " *legere* " qui veut dire : sélectionner. Le (**Tableau 1**) montre l'historique de découverte des lectines.

Tbleau01 : historique de découverte des lectines

ANNEE	AUTEURS	DECOUVERTES
1884	Warden &Waddel /Bruyllant &Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i> .
1988	Stillmark	Activité hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> . Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Activité hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> . Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine.
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par laChaleur.
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hemagglutinante par un traitement thermique de sérum.
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A).
1926-27	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins.
1947-29	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a Hémagglutinines.
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines.
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i> .

3 .Structure des lectines

Les lectines sont classées en quatre grandes classes :

3 .1. Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (identiques ou non), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 40KDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Lenka, 2006) (Figure 01).

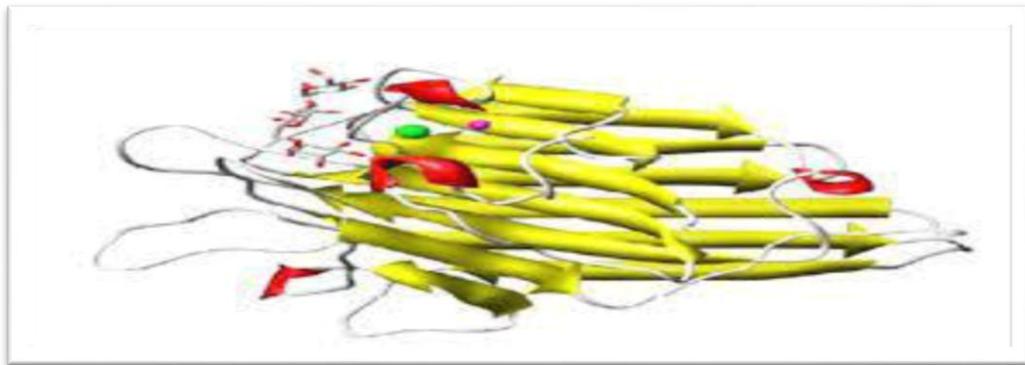


Figure 01 :Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de canavalia ensiformis en complexe avec le tri mannoside (Lenka, 2006).

- **La protéine** est représenté par : un ruban rouge pour les hélices α , un ruban jaune pour les brins β et un fil pour les autres zones.
- **Le sucre** est représenté sous forme de bâton, et les cations en boule (Lenka, 2006).
- **3.2 .Les lectines en mosaïques**
- Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animales, virus) il s'agit de molécules complexes composées de plusieurs type de domaines où modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al*, 2006) (Figure 02).

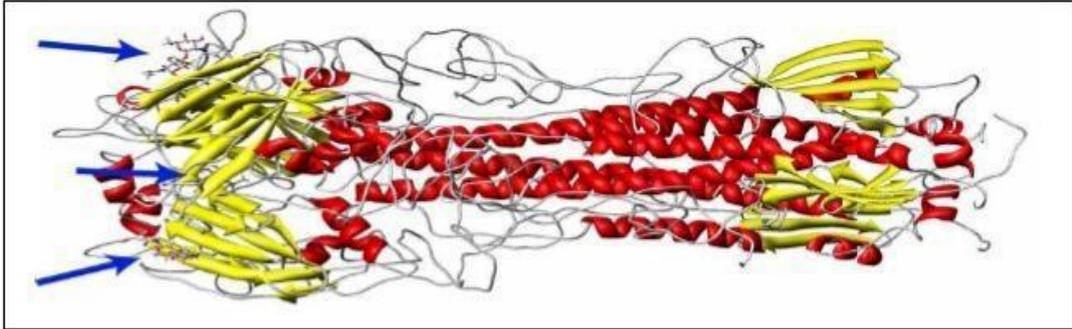


Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al, 2006).

3.3. Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pilé. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (**Lenka, 2006**), (**Figure03**).

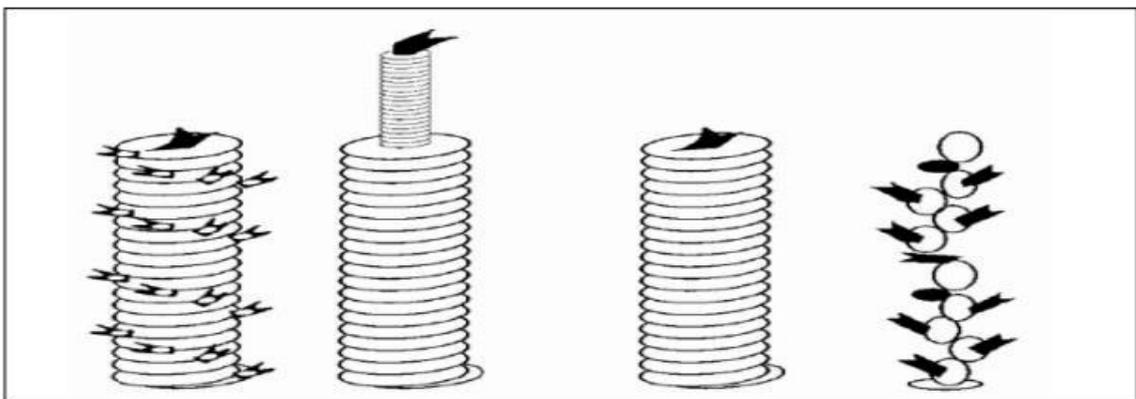


Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia coli* (Lenka, 2006).

3.4. La structure tridimensionnelle

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

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

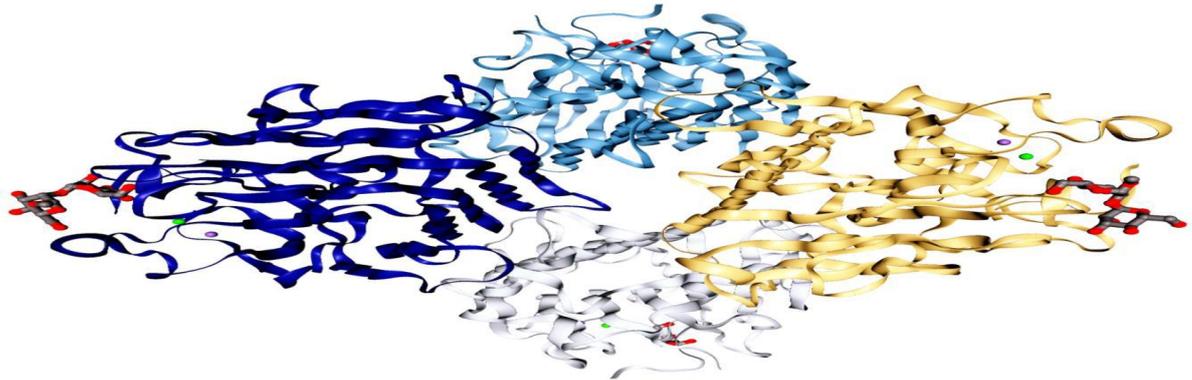


Figure 04 : Structure tridimensionnelle de la concavaline A. Une lectine d'origine légumineuse de *Canavalia ensiformis* (source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., *et al.* 1999).

4. La Classification des lectines

4.1. Chez les animaux

4.1.1. Les lectines extracellulaires

Les lectines extracellulaires comprennent toutes les autres familles, comme les lectines de type C et R, ainsi que les galectines. Ces lectines sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance des pathologies (Chabrol *et al.* 2012).

4.1.2. Les lectines intracellulaires

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

4.2. Chez les végétaux

4.2.1. Les mérolectines

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides, dit monovalentes (exemple : hévéineprotéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans et Van Damme, 1995**).

4.2.2. Les hololectines

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

4.2.3. Les chimérolectines

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

4.2.4. Les superlectines

Les superlectines sont des oligomères poly-spécifiques constitués de plus de quatre monomères, elles sont considérées comme un groupe spécial de chimérolectines composé de deux domaines différents structuralement et fonctionnellement (**Van Damme et al. 1998**).

5. Les sites de liaisons des lectines

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine

Interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (Goldstein et Portez, 1986). Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (Pontet, 1996). Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone auxquels se lient (Gabiuss, 1995).

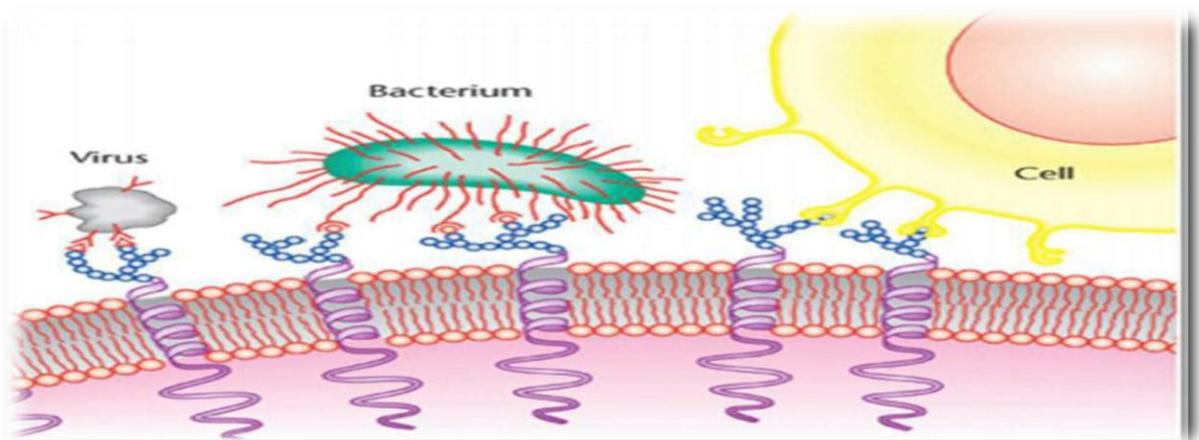


Figure 05: Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides

(Sharon *et* Lis, 1993).

6. La spécificité et l'affinité des lectines

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (Robert, 2008). La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugés. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Sharon, 2003). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acétylneuraminique, NeuAc) (Lis and Sharon, 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme (la spécificité primaire) des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains.

Tableau 02: La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines (Renato, et coll. 1) oligosaccharides. (Dam and Brewer, 2002). (Figure 06).

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adeniadigitata</i>	Gal
<i>Aleuriaaurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasilensis</i>	Man >Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichosbiflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordicacharantia</i>	GalNAc
<i>Cytissussessilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNac

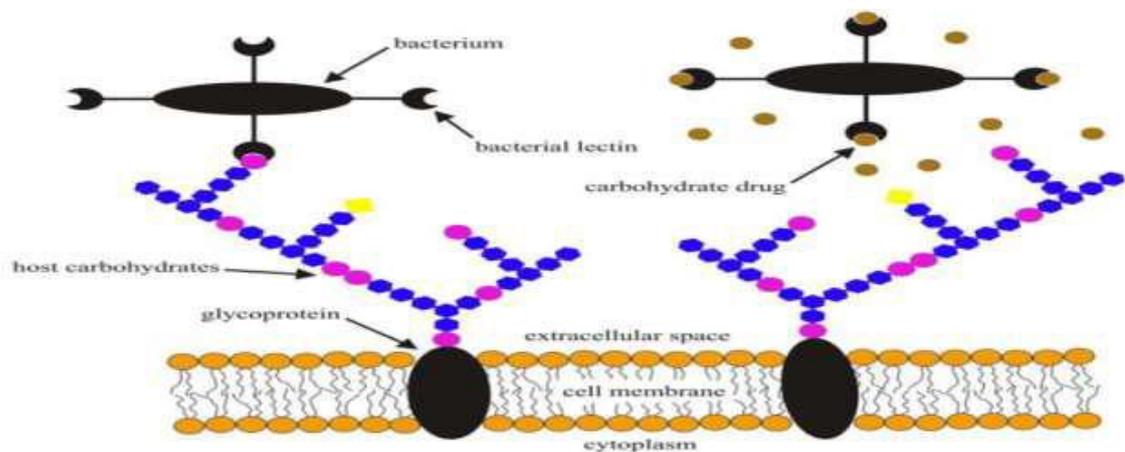


Figure 06 : Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides monosaccharides et oligosaccharides (Ghazarian Het all. 2011).

7. Fonction biologique des lectines

7.1 .Chez les plantes

Fonction dans l'élongation des parois cellulaires ; fonction de cofacteurs enzymatiques agissant avec des enzymes glycoprotéiques ; intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines ; contrôle de la division cellulaire (mitogenécité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (Etzler, 1986 ; Kaminski et coll., 1987). d'autres études, suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (Etzler, 1986).

7.2. Chez l'homme

Les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Elles sont utilisées lors du test d'hémagglutination en pratique clinique pour distinguer les types du sang (AB, A, B et O), exemple : la lectine de haricot de lima (*Phaseolus lunatus*) se lie à N-acétyl-D galactosamine et agglutine seulement des globules rouges de type A (Goker et al, 2008). Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar et al, 2005 ; Gomes et al, 2012). Elles contrôlent les niveaux des protéines dans le sang (Rydz et al. 2013) car elles sont responsables au transport des protéines, peptides et les médicaments natifs (Sutapa et Gopa, 2013). Les lectines ont la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses, La récente découverte suggère que les cellules malignes sont plus facilement agglutinées par des lectines que les cellules normales. Ces agglutinations sélectives pourraient être utilisées dans le traitement du cancer (Voet et Voet, 2005).

8. La distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se trouvent dans tous les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plants, les insectes et les animaux (Van Damme et al. 1998). Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures

crystallographiques de lectines est toujours en croissance et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines (Aragao, 2009).

La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont six d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, cinq familles d'origine virale, huit d'origine fongique et 1 famille d'algues, (Tableau3).

Tableau 03 : Exemples des Lectines et leur distribution dans le monde vivant.

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

8. 1 .Les lectines des microorganismes

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

8.1.1 .Les lectines bactériennes

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

8.1.2. Les lectines viral

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface

des cellules hôtes, qui est l'acide 5-N-acetylneuraminique (l'acide sialique) (**Weis et al. 1990**).

8.1.3 .Les lectines des champignons

L'abondance des lectines dans les champignons est tout à fait remarquable. Elles ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (**She et al, 1998 ; Sze et al. 2004**).

8.2 .Les lectines animales

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

1) Les lectines de type C, elles sont soit circulants dans le plasma, ou attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire (**Somers et al. 2000**), dont l'interaction glucide-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (**Drickamer, 1999**).

2) La famille des galectines, elle regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le β -Gal, et sont caractérisées par la présence d'un domaine bien conservé appelé S-type *carbohydrate recognition domain* (S-CRD) (**Leffler et al. 2004**).

3) Les Sigles, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (**Crocker, 2002**). La plupart des lectines des vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire (**Aragao, 2009**).

8.3. Les lectines végétales

Dans les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermaphytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (**Grant, 1991 ; Renkonen, 1948**). La famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales, telle que la ConA se

retrouvent dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de subir une attaque par des organismes étrangers (**Nachbar et Oppenheim, 1980**). Les lectines répartis dans tout l'appareille végétative car elles sont présentes dans les racines, les tiges et les graines. Dans ces derniers elles présentent de 1-10% des protéines totales et dans certaines d'elles jusqu'à 50 %, dans les tissus végétatives les lectines forment de 1-20% de leur contenu en protéines totales (**Peumans et Van Damme, 1995**). Les lectines des plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Macedo et al. 2015**).

9. Propriétés des lectine :

9.1. Les propriétés biologiques :

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées :

9.1.1. L'interaction lectine–glucide

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

9.1.2 .L'agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998**).

9.2. Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation

desimmunoglobulines (**Nachbar et coll., 1980**), l'induction de la libération de l'histamine a

partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes, 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy, 1997**) l'induction de l'apoptose (**Kulkarni, 1998**).

10 .L'intérêt des lectines

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

10.1. En biochimie et protéomique

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps, cytokines, hormones, facteur de croissance, enzymes, récepteurs et même toxines et virus), pour les purifier (par affinité, une fois couplés à un support chromatographique), pour les détecter (une fois marqué par un fluorochrome ou une enzyme..). Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique, peuvent ainsi être caractérisées quantitativement. (Structure des complexes et interaction). (**Dole.A.et Lindeberg. S. ,2005**).

10.2 .Dans le domaine biomédical

10.2.1. Hématologie

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

10.2.2. Immunologie

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

déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immun thérapeutiques (**Jaffe, 1980**).

10.2.3. Biologie cellulaire

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

10.2.4. Cancérologie

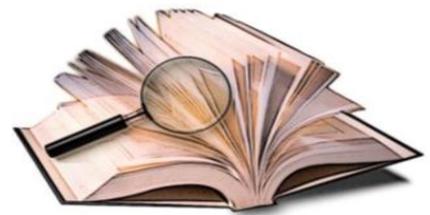
Les lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées une modification des glycannes présents sur les cellules (**Guillot et coll., 2004**). **Kenoth et al (2001)** rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

10.3 .Dans le domaine agronomique

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

Chapitre II :

Le système sanguin



Le Système ABO

1. Définition

Le système des groupes sanguins ABO est un système de reconnaissance des globules rouges étrangers à l'organisme grâce à la présence de structures antigéniques à la surface de ces cellules. En 1900, Landsteiner observe que les globules rouges de certains individus sont agglutinés par le sérum de certains autres ; il découvre ainsi les antigènes A et B et leurs anticorps respectifs.

- En 1902 : Decastello et Sturli reconnaissent un 4ème groupe plus rare : AB.
- En 1924 : Bernstein montre que les groupes constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de Mendel.

2. Historique

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

3. Le système des groupes sanguins

Un système de groupes sanguins est un ensemble d'allo-antigènes portés par la membrane du globule regroupés en systèmes génétiquement déterminés et indépendants les uns des autres. Parmi les systèmes de groupes sanguins connus chez l'homme, les systèmes de groupes sanguins érythrocytaires sont actuellement les mieux connus, les principaux sont : les systèmes ABO et RH.

3.1. Le système ABO

Le système de groupe sanguin ABO se définit à la fois par la présence d'antigène sur les hématies et par la présence d'anticorps naturels réguliers dans le plasma. La présence sur les globules rouges d'un antigène exclut la présence dans le plasma de l'anticorps qui lui correspond, exemple: si, dans le sang d'un individu, les hématies sont porteuses

de l'antigène A, le plasma ne peut pas posséder d'anticorps anti A. sinon la réaction antigène-anticorps provoquerait une agglutination (**Ramè et Naccache, 2001**).

Les antigènes A et B détectés par des anticorps spécifiques définissent quatre groupes sanguins principaux : A, B, AB, O (**Ramata, 2010**) (**Tableau:04**).

Tableau 04: Les 4 phénotypes courants du système ABO (**Béziat et al. 1996**).

Groupe ABO	Antigène sur globules rouges	Anticorps dans le plasma
Groupe A (42%)	Ag A	AC anti B
Groupe B (11%)	Ag B	AC anti A
Groupe AB (4%)	Ag A et Ag B	Aucun
Groupe O (43%)	Pas d'antigène	AC anti A et AC anti B

3.2 Facteur rhésus

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

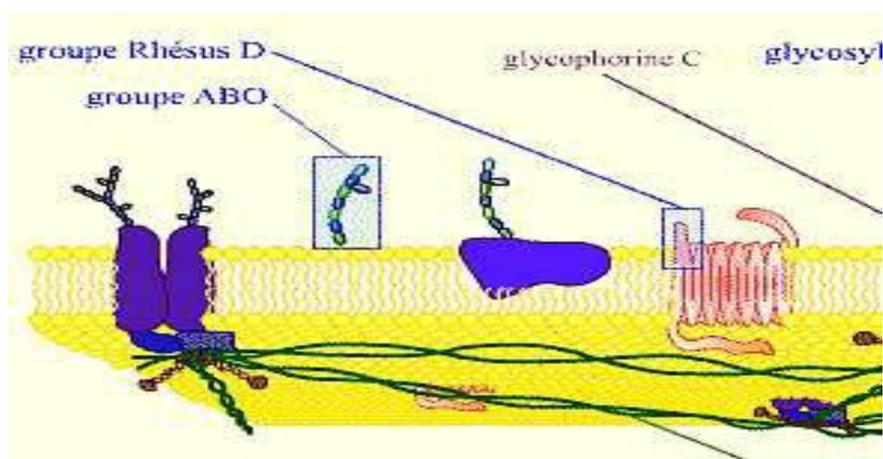
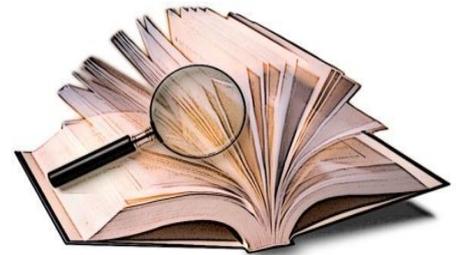


Figure 07: Représentation schématisée de la distribution de group ABO et Rhésus sur lamembrane d'une hématie (David Germanaud, *et all.*, 2003).

Chapitre III :
Généralités sur la plante
« Punica granatum »



Punica Granatum «Le Grenadier»

1. Généralités :

Le grenadier (*Punica granatum* L.), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des *Punicaceae*, division *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida* et à l'ordre des *Myrtales*. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (**Sarkhosh et al.2006**).

2. Historique :

Depuis des milliers d'années, le grenadier "*Punica granatum*", ses fruits, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales (**Gubernatis, 1882**).

L'histoire de la grenade est liée au développement de l'humanité d'une manière impressionnante. La grenade a une place importante dans le Judaïsme, le Christianisme, l'islam, le Bouddhisme et le Zoroastrianisme (**Lansky et Newman, 2007**). Il est dit qu'elle avait 613 graines qui représentent les 613 commandements de la Torah, même si cela n'a pas été confirmé dans les temps modernes (**H** La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide (**Calin Sanchez et al.2005**). **Ebert, 2006**).

3 .Nomenclature

- Nom scientifique : *Punica granatum*.
- Nom français : grenadier.
- Nom anglais : pomegranate.
- Nom espagnol : Granada.
- Nom italien : Granato.
- Nom arabe : Romane.

4. Classification botanique :

- **Embranchement:** Angiospermes.
- **Sous -embranchement:** Dicotylédones vraies.
- **Classe :** Gamopétales.
- **Ordre :** Myrtiflorales.
- **Famille :** Punicacées.
- **Genre :** *Punica*.
- **Espèce :** *Punica granatum*.



Figure08: *P.G granatum*.

5. Présentation et description botanique du grenadier :

Le grenadier est un arbuste de 2 à 5m très rameux. Feuilles opposées oblongues, entières et luisantes de 3à 7 sur 0.5 à 1.5cm. Fleur d'un rouge écarlate, grande 2 à 2.5cm de diamètre par 1 à 3 à l'aisselle des feuilles. Calice longuement campanulé coriace à tube soudé à l'ovaire et à 5à7 lobes persistants 5à7 pétales rouge brillant. Etamines très nombreuses. Fruit subi-globuleux de 2.5 à 4cm de diamètre, à graines nombreuses anguleuses, pulpeuses et acidulés (Beloued, 2005 ; Quezel et Santa, 1963). Son écorce est gris beige et à tendance à se crevasser et à desquamer avec l'âge (Quezel et Santa, 1963).

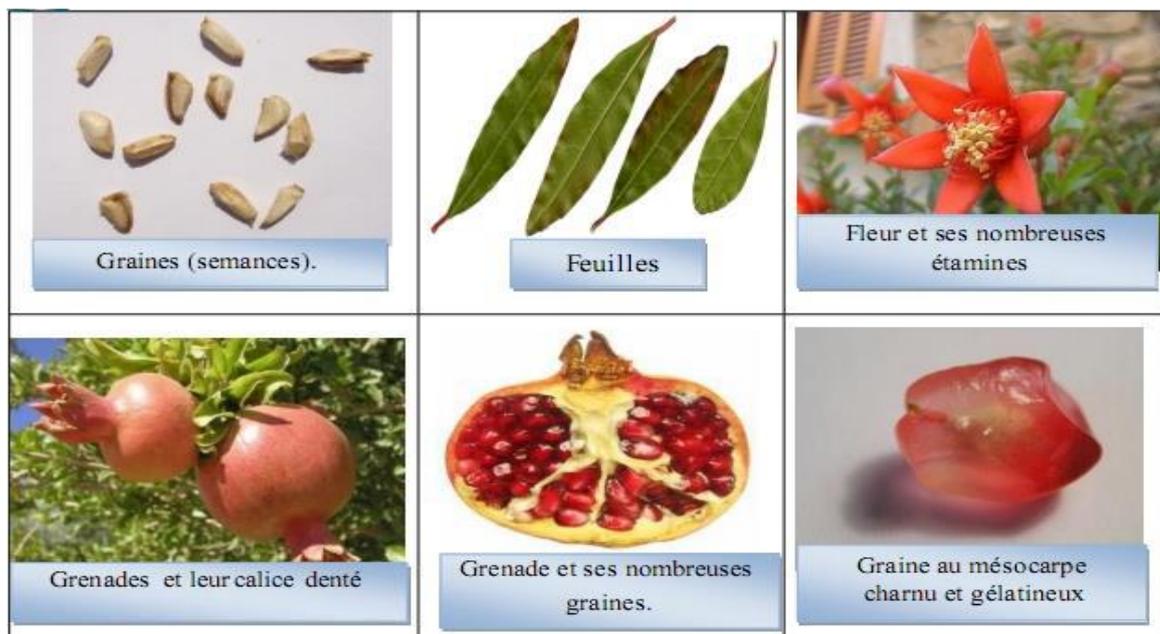


Figure09 : Caractéristiques botaniques du grenadier (Yssad, 2019).

6. Utilisation traditionnelle

L'arbuste a de nombreuses utilisations médicinales et cosmétiques: les fleurs fournissent un colorant pour les cheveux, les feuilles et les fleurs donnent des potions pour les gargarismes, l'écorce de fruits astringent et racines fraîches ont des propriétés toniques qui aident dans le traitement des troubles digestifs et intestinaux sévères (Clay et al. 1987).

La grenade est utilisée historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, elle attire, depuis quelques années, l'attention des scientifiques en tant qu'agent protecteur contre les maladies cardiovasculaires et le cancer (Edeas, 2010). Ce fruit a une longue histoire d'utilisation en médecine naturelle et holistique. En effet, elle a été utilisée pendant des milliers d'années pour guérir un large éventail de maladies dans le monde entier (Wald, 2009).

Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, attribué au grenadier de nombreuses propriétés. Il recommande le jus et l'écorce de la grenade contre plusieurs maladies liées aux femmes. De plus les médecines traditionnelles égyptiennes considéraient l'écorce comme anthelminthique et mettaient à profit l'effet astringent du tanin contenu dans la grenade. Ainsi, le tanin des fruits aigres était prescrit comme fébrifuge et anti vomitif, celui des fruits sucrés comme adoucissant pour la toux (Wald, 2009).

De l'Afrique du Nord jusqu'en Inde, le jus de grenade, couramment utilisé dans les médecines indigènes, à la réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité. La pharmacopée et la médecine traditionnelle chinoise font aussi référence au grenadier pour guérir les maladies touchant les intestins (Wald, 2009).

7. Propriétés thérapeutiques des grenades (*Punica granatum L*) :

La grenade a été longtemps approuvée comme alimentent médicament. La partie officinale, l'écorce du fruit (Sivarajan & Balachandran, 1994). Elles sont parmi les fruits les plus riches en vitamine C et en composés phénoliques (El-Nemr et al. 1992).

La composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de poly phénols ayant des propriétés antioxydants très importantes à savoir les tanins que l'on trouve en concentration très élevée dans l'écorce du grenadier (Heber et al., 2006), la peau de grenade possèdent de diverses activités biologiques (Reddy et al., 2007).

- Activité antioxydante.
- Activité anti-inflammatoire.
- Activité anticarcinogénique.
- Activité anti diabétique.
- Activité antibactérienne.
- Activité Antivirale.

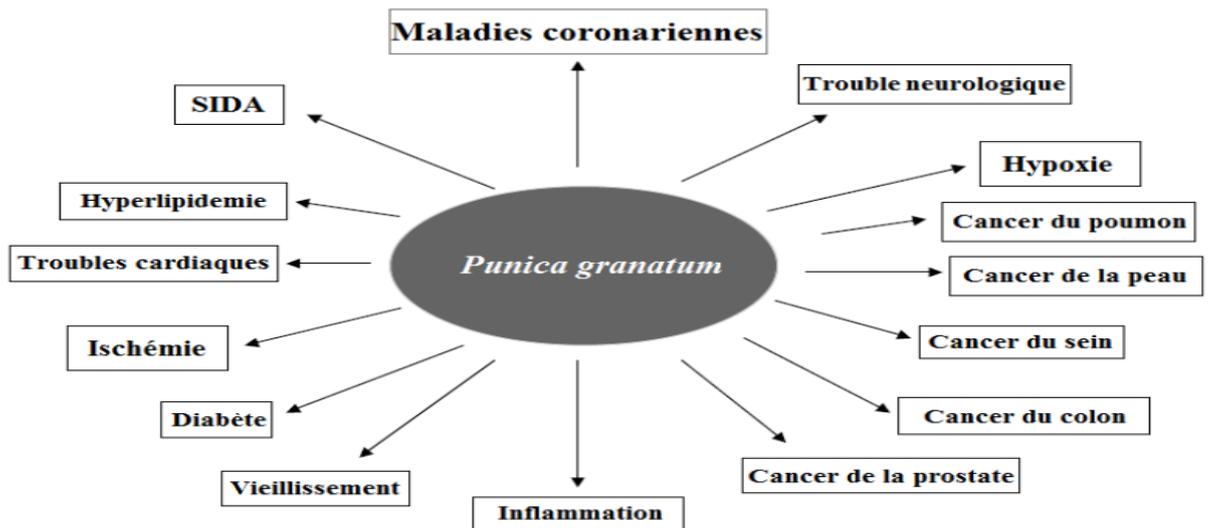
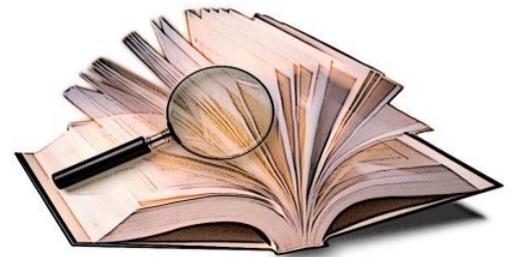


Figure 10: Maladies traitées par *punica granatum* (Heber et al. 2006).

Section02 :

Matériels et méthodes



Matériel et méthode

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

I. Matériel

I.1.Le matériel vivant :

Les hématies utilisées sont issues de :

- ✓ Le sang du lapin est collecté à partir des lapins provenant au niveau de l'animalerie de L'Université de Constantine1.
- ✓ Le sang humain collecté à partir de laboratoire d'analyse médicale de polyclinique, Constantine.

I.2.Le matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les pelures de punica granatum.



Photo 01:lespelures de punica granatum.

II. Méthodes

1. La Préparation des plantes :

- ✓ **Lavage :** les pelures ont été bien rincées avec l'eau et débrassé de toute impureté.
- ✓ **Séchage :** les pelures des plantes ont été séchées à température ambiante pendant 10 jours.
- ✓ **Broyage :** les pelures ont été coupées, puis ils sont broyés dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.

2. L'extraction des plantes

2.1 Le principe :

C'est une opération visant à récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de plant *Punica granatum* à l'aide d'une solution Tampon.

2.2 La Technique d'extraction :

6g des poudres obtenues à partir de plantes ont été mises dans des flacons contenant chacune 20ml solution tampon (0.01M pH=7.3) (**annexe 1**) pendant 24h. Après la centrifugation de la suspension à 6000tr/min pendant 30min, le surnageant est récupéré et conservé pour la réalisation des tests souhaités.

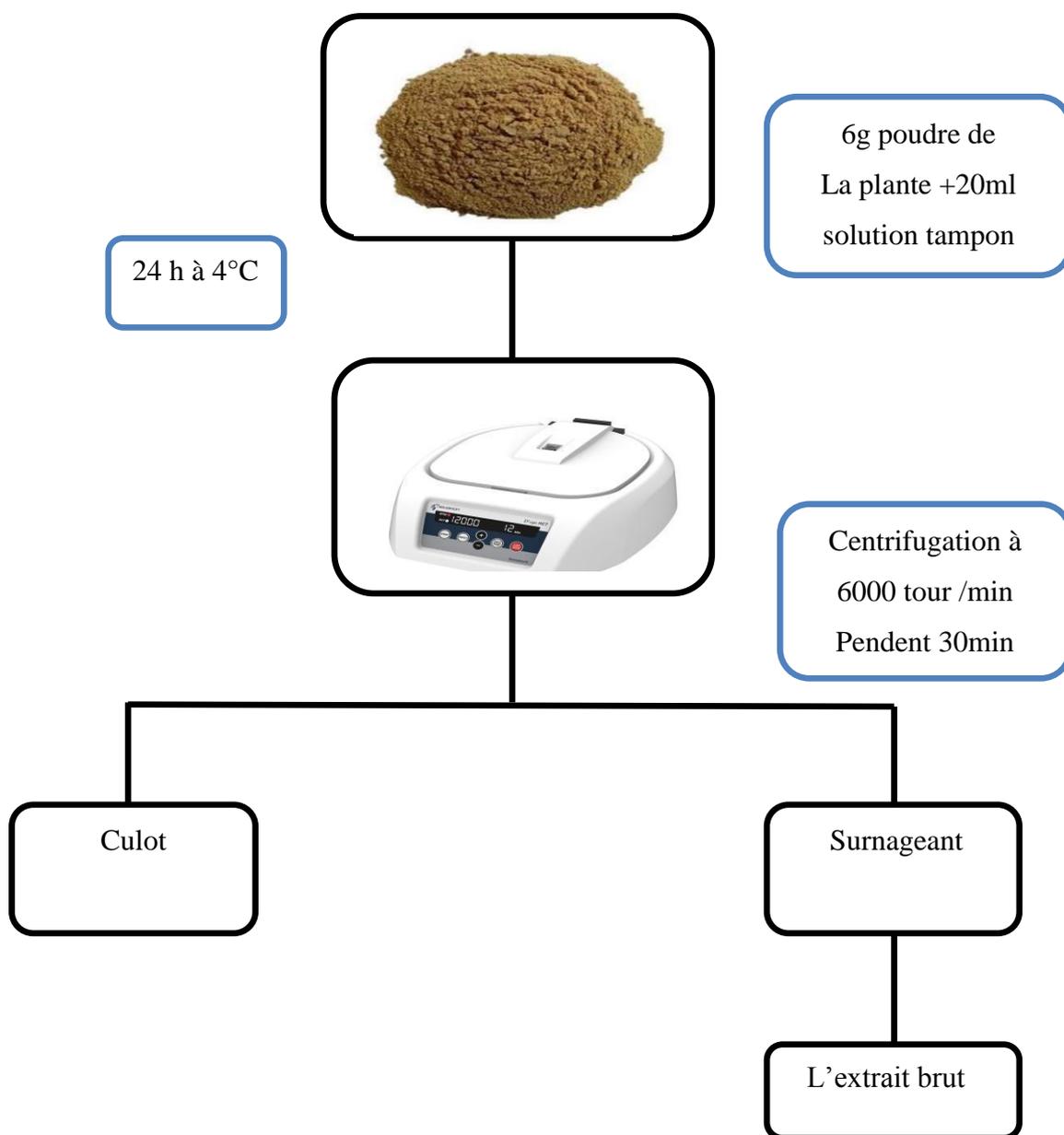


Figure 11 : Le schéma d'extraction des lectines à partir de poudre de pelure de plante.

3. Le test d'hémagglutination

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

3.1 La Préparation des hématies à 3%

Le sang humain est collecté à partir du laboratoire d'analyse médicale de l'hôpital HUC Constantine, le sang du lapin est collecté à partir des lapins provenant au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine¹. Les hématies du lapin sont collectées pour la mise en évidence la présence des lectines dans les extraits, et les hématies de groupe sanguins humains ABO pour tester la spécificité des lectines des extraits au groupe sanguin ABO. Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

3.2 Lavage des hématies

Le tube contenant une quantité de sang (1.5 ml) a été centrifugé à 5000tr /min pendant 10 min, le surnageant résultant est versé et une solution de Na Cl 0.9% est ajoutée au culot ; après avoir bien mélangé le tube est soumis à nouveau à une centrifugation. L'opération est répétée 3 fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair.

3.3 La dilution des hématies

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

3.4 La technique d'hémagglutination

Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl d'extrait brut de nos plantes ont été déposés tout en ajoutant 50 µl des hématies du lapin. Après 30min, l'agglutination est observée à l'œil nu. D'obtenir des hématies à 3%.

4. La limite d'hémagglutination

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brute (*Punica granatum*) qui lui, est placé uniquement au niveau du premier puits. Puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits.

L'observation de l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

5. L'effet de la température sur l'agglutination.

Les aliquotes de l'extrait brute ont été versés dans 5 tubes à essai, ces derniers ont été incubés à des degrés différents de température (40, 60, 80 et 100°C) dans un bain marie durant 1h de temps. Après le temps requis, l'extrait brut chauffé a été refroidi à température ambiante (25°C). Enfin le test d'agglutination a été effectué.

6. L'effet du pH sur l'agglutination.

Ce test a été effectué afin de déterminer le PH favorable pour l'activité hémagglutination. Dans 13 tubes à essai une petite quantité de notre plante estimée de 250mg a été mis dans un volume de 700 µl de tampon à différents valeurs de PH (1,31 / 2,37 / 3,39 / 4,04 / 5,07 / 6,34 / 7,32 / 8,04 / 9 / 10,15 / 11 / 12 et 13), Après 24 heures d'incubation à 4°C, une centrifugation a été réalisée (5000 tours pendant 5 minutes) d'où le surnageant a été récupéré, Après un test d'hémagglutination a été effectué sur le surnageant.

7. Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.

Ce test a été effectué sur les extraits bruts ayant présentées une spécificité pour un ou plusieurs saccharides qui inhibent leur activité d'hémagglutination. Il a été réalisé à fin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'hémagglutination.

La technique.

Dans chaque puits d'une microplaque 50 µl de l'extrait a été déposé, tout en ajoutant 50 µl de solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de Na Cl 0,9%) [Fructose, inositol, inuline, Maltose, Lactose, Mannose, Rhamnose, sorbitol, α-M-D.Mannose pyranoside, Albumine BSA, Mannitol]. Le mélange a été incubé pendant 1h à température ambiante, cela permet de reconnaître le sucre 50 µl des hématies du lapin à 3% ont été rajoutées. Après une heure la lecture a été faite à l'œil nu.

8. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.

Ce test a été effectué pour déduire la spécificité des extraits aux groupes sanguins, il a été réalisé sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO en utilisant les érythrocytes des différents groupes sanguins.

- S'il y a une activité d'agglutination de la lectine avec les différents groupes sanguins: **lectine non spécifique.**
- S'il y a une activité d'agglutination de la lectine avec un seul groupe sanguin: **lectine spécifique.**

Principe :

Dans un puits d'une microplaque, 50 µl des hématies de chaque groupe ont été ajoutés à 50 µl d'extrait de plante. Après 1 heure d'incubation, la lecture a été faite à l'œil nu.

9. L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.

9.1 La préparation de la colonne de Sephadex G75.

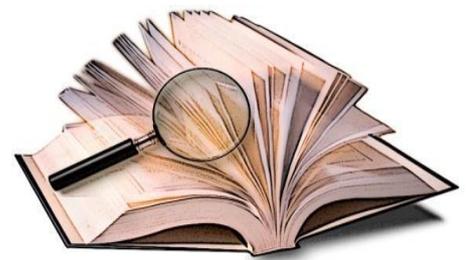
4 g de Sephadex G75 a été mis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,3). Le mélange a ensuite été incubé pendant 48 h à température ambiante. Enfin il a été coulé dans une colonne. Placée sur un support (jusqu'à la moitié de la colonne). La colonne doit être homogène et dépourvue des bulles d'air.

9.2 La filtration des lectines

Après la stabilisation de la colonne et le lavage avec le tampon PBS (0.1 M, pH 7.3) le surnageant de l'échantillon des pelures de *Punica granatum* ont été récupérés puis une quantité de 1 ml de l'extrait brut a été versée lentement dans la colonne de Sephadex G75 et équilibrée avec un tampon phosphate avec lequel elle a été recueillie par élution dans 40 tubes secs (5ml/tube) placés respectivement dans un portoir. L'extrait récupéré a été testé sur les hématies du lapin pour assurer la présence de l'activité hémagglutinante de notre extrait.

Section 03 :

Résultats et Interprétation



1. Le test d'hémagglutination :

L'extrait de pelure d'*Punica granatum* sur la photo suivante, montre une très forte agglutination vis-à-vis les hématies du lapin, il s'agit et donc d'une hémagglutination positive. En absence de lectines, les cellules roulent au fond du puits où elles s'accumulent en un bouton rouge dense qui donne au contraire une hémagglutination négative.

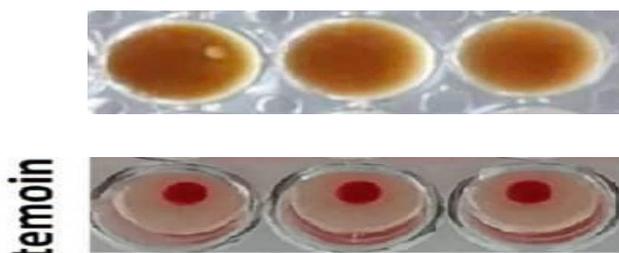


Photo 02 : l'agglutination des hématies du lapin par l'extrait de *Punica granatum*.

2. La limite d'hémagglutination :

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

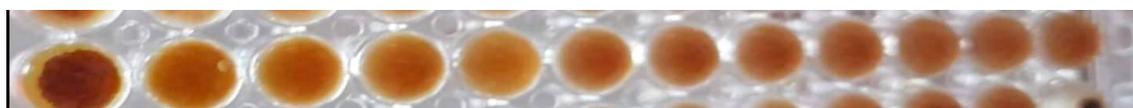


Photo 03: test de la limite d'hémagglutination de *Punica granatum*.

Tableau 05: Activité de la limite d'agglutination d'*Punica granatum*.

Dilution d'extrait	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
<i>Punica granatum</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+

+++ : Très forte agglutination.

++ : Forte agglutination.

Nos résultats sur la **photo 03** ont montrés que l'activité très forte agglutinante des extraits d'*Punica granatum* jusqu'au 9^{eme} puits ($1/512$), puis l'activité commence à diminuer jusqu'au 12^{eme} puits ($1/4096$).

3. L'effet de la température sur l'hémagglutination :

Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différentes températures sont présentés dans la photo et le tableau suivants :

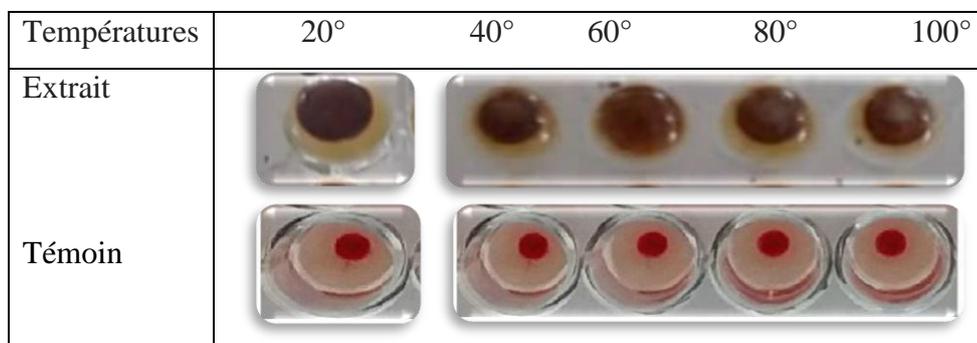


Photo 04: l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.

Tableau 06: Effet de la température sur l'activité d'hémagglutination des lectines d'extraite brut d' *Punica granatum*.

T°C	20°	40°	60°	80°	100°
Plante					
Activité d'agglutination DePG	++	++	+++	++	++

- +++: Très forte agglutination.
- ++: Forte agglutination.

Le traitement thermique des extraits bruts des pelures de *Punica granatum* à différentes températures de (20°, 40, 60, 80 ,100°C) pendant 30 min. Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistantes à la température (thermorésistante), comme est le cas de température 60° elle atteint l'activité lectines maximale, et à des températures (20°, 40°, 80° ,100°), il y a une activité résiduelle d'agglutination diminuée.

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

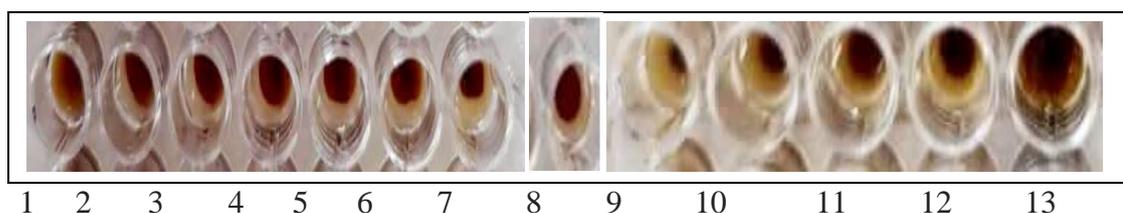


Photo 05: l'effet du PH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait.

Tableau 07 : L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des extraits *Punica granatum*.

PH Extrait	1.31	2.37	3.39	4.04	5.07	6.34	7.32	8.04	9	10.15	11	12	13
PG	+++	++	+	+	++	++	++	++	-	-	-	+	+++

- +++:Très forte agglutination.
- ++: Forte agglutination.
- + : Faible agglutination.
- - : Absence d'agglutination.

L'activité d'agglutination des lectines d'*Punica granatum* (plante) est stable dans un intervalle allant de [5.07 à 8.04] et pH=1.31 et pH=2.37 et pH=13 alors qu'elle est plus faible de pH=3.39 et pH=4.04 et pH=12 avec une perte totale d'activité à [9 à 11].

5. Le test de limite d'inhibition d'agglutination par les saccharides :

Le test d'inhibition a été effectué avec certains saccharides, pour déterminer la spécificité d'extrait aux glucides. L'agglutination est absente dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que les hématies, les résultats obtenus ont été décrits dans le (tableau08).



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----

Photo06 : Le test d'inhibition d'agglutination par les saccharides et les glycoprotéines.

Tableau 08: Inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine extraite de la pelure de *Punica granatum* par des saccharides et glycoprotéines.

Saccharides et glycoprotéines	1 : Fructose	2 : inositol	3 : Inoline	4 : Maltose	5 : lactose	6 : Mannose
Extrait	-	-	-	-	-	-

- : Pas d'inhibition.

Saccharides et glycoprotéines	7 : Rhamnose	8 : sorbitol	9 : α M-D-mannose pyranoside	10 : Albumine BSA	11 : Mannitol
Extrait	-	-	-	-	-

Les études d'inhibition de l'hémagglutination réalisées avec des protéines purifiées des racines de plantes : *Punica granatum*, ils n'ont pas été influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines provenant (autrement dit, les lectines ne sont pas inhibée à la fois par les saccharides et les glycoprotéines).

6. Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO :

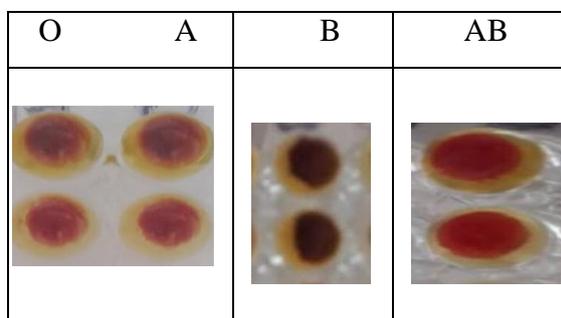


Photo 07: L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d'*Punica granatum*.

Les résultats d'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut de notre plante ont été décrits dans le tableau suivant :

Tableau 09: L'agglutination des hématies humaines (A, B, O, AB) par l'extrait brut d'*Punica granatum*.

<i>Groupe sanguine</i> <i>Extrait</i>	A	O	B	AB
<i>Punica granatum</i>	+++	+++	+++	+++

+++ : Forte agglutination.

Les résultats de **tableau (09)** montrent que la lectines *d'Punica granatum* est donnée une très forte agglutination avec tous les hématies de système ABO. Alors nous pouvons classer les lectines de *Punica granatum* dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique.

7. L'extraction des lectines par chromatographie sur colonne de Sephadex G75 :

La chromatographie sur colonne de Sephadex G75 a été permise à fin de déterminer la purification partielle de notre échantillon et extraire dans 40 tubes. Après, les fractions ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre à 280nm,

- Afin d'obtention des résultats de l'absorbance par le spectrophotomètre à UV des fractions séparées de l'échantillon, la courbe a été tracée (**Figure 12**).

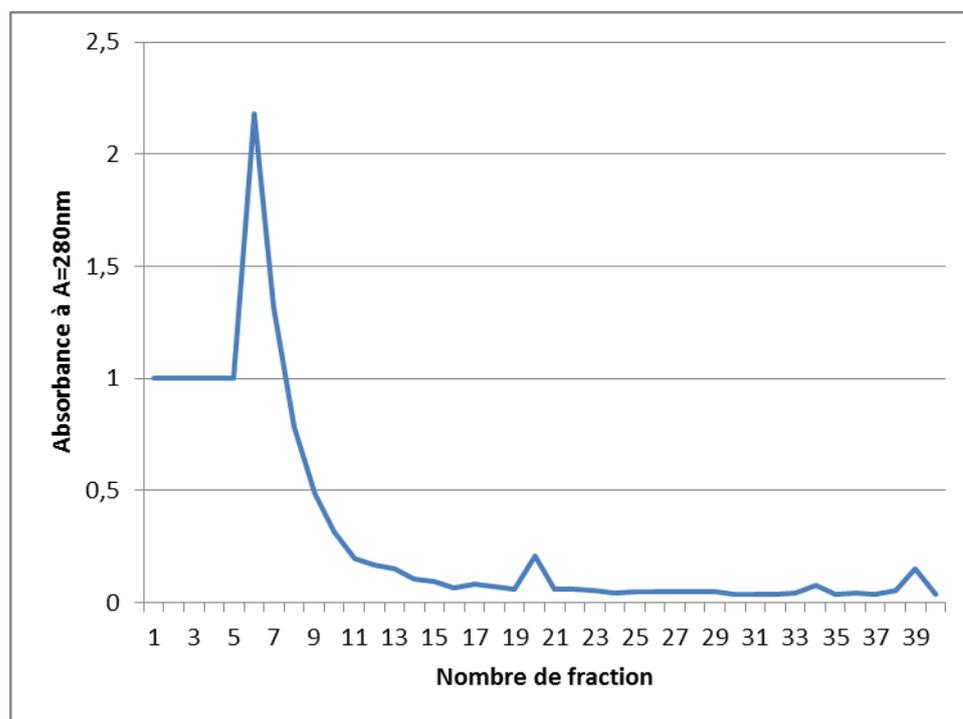


Figure 12: La courbe d'Absorbance de l'extrait *Punica granatum* après leur passage à travers la colonne de Sephadex G75. Eluant : Tampon PBS (0.1 M, PH 7,4).

Volume de fraction : 5ml/tube.

Volume d'extrait : 1 ml.

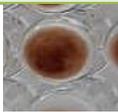
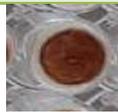
Absorbance : 280 nm.

La filtration des extraits de *Punica granatum* (figure13) sur colonne de Sephadex G75 et la lecture à 280nm a donné lieu à quatre pics dans la courbe :

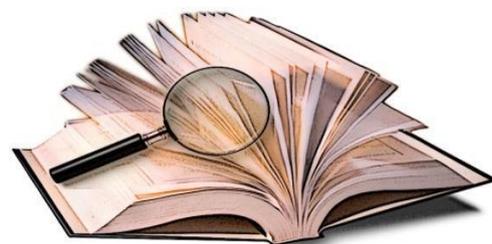
- Un 1er pic fort dans le 6ème fraction.
- Un 2ème pic faible dans la 20ème fraction.
- Un 3ème pic plus faible dans le 34ème fraction.
- Un 4ème pic faible dans le 39ème fraction.

D'après ce qui a été indiqué dans le chromatogramme, un test d'hémagglutination a été réalisé sur les tubes correspond aux pics formés pour identifier l'existence des lectines dans les fractions obtenues.

Tableau 10: résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics Obtenues après chromatographie.

Fractions	6	20	34	39
Absorbance	2,182	0,207	0,078	0,149
Test d'hémagglutination				

Discussion



DISCUSSION

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.

Au cours des dernières années, les lectines ont été reconnues comme des sondes utiles pour les enquêtes structurales des polysaccharides et les glucides complexes sur la surface des cellules, certaines lectines sont hautement spécifiques de certains groupes sanguins et peuvent donc être utilisés pour la détermination du groupe sanguin, elles sont aussi utilisées dans différents domaines biologique et médical (**Levene et al, 1994**).

Le travail que nous avons réalisé, rentre dans le cadre de chercher la présence de lectine et aussi l'étude biologique des phytoagglutinines qui sont les lectines.

Les lectines ont été découvertes par leur capacité à agglutiner les érythrocytes, et reste toujours la méthode la plus simple et la plus pratique pour détecter la présence des lectines (**Laija et al. 2010**).

Au début de temps nous avons testé l'existence de lectine au niveau de pelure du *Punica granatum*, nous avons utilisé les hématies de lapin incubée avec l'extrait brut que nous avons récupéré à partir de pelure de punica granatum à l'aide de solution tampon (schéma 12).

Nous avons procédé à la chromatographie sur colonne et puis ont effectué par des tests biologiques.

Nous avons observé l'activité hémagglutinante de l'extrait *P. granatum* ont donné un test positif. Ces résultats indiquent que *Punica granatum* contiennent effectivement des substances à activité agglutinante sur les hématies.

Dans le but d'évaluer l'activité hémagglutinante des extraits de plante nous avons réalisé le test de limite d'hémagglutination.

Nos résultats ont montrées que l'activité hémagglutinante de l'extrait de punica granatum a été de 1:12 (4096), dans une autre étude réalisée sur la lectine EHL isolé à

Discussion

partir d'*Euphorbia helioscopia*, l'activité hémagglutinante a été stabilisée dans une concentration minimale de 15µg/ml (**Shaista et al, 2014**).

La plupart des molécules protéiques ne conservent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle qu'à l'intérieur d'une étroite limite de pH et de température en particulier (**Cuq, 1992**). Les températures élevées rompent les interactions faibles qui stabilisent la forme repliée ou native d'une protéine et convertissent cette structure en un état dénaturé (**Ringe, 2009**). Les pH extrêmes peuvent modifier la charge des chaînes latérales d'acide aminé et rompre les liaisons ioniques et hydrogènes (**Baltimore et al, 1997**). L'état dénaturé est généralement défini de manière empirique soit par la perte de l'activité biologique ou biochimique de la protéine (**Cuq, 1992**). Cette dénaturation entraîne la perte totale ou partielle de l'activité biologique (**Eckert et al, 1999**).

L'extrait de *Punica granatum* est stable à température 60°C pendant 30 min. Ce résultat est en accord avec la lectine de *Pterocladia capillacea* est stable à 60°C pendant 30 min. (**Oliveira et al, 2002**), Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistantes à la température (thermorésistant).

Dans l'autre côté nos résultats ont montré que l'extrait de *Punica granatum* a été stable dans la gamme du pH de 1 à 8, il a perdu sa totale activité de pH 9 à 11. Les autres lectines comme celles de *Euphorbia helioscopia* perdent leur activité d'hémagglutination plus rapidement, elles restent actives dans un intervalle de pH de 6-8 (**Shaista et al., 2014**).

L'effet d'inhibition sur l'activité d'hémagglutinante des lectines par les glucides est due à leur compétition avec les érythrocytes sur les sites de liaison de la molécule de lectine. Ce qui interfère l'attachement de ces dernières sur la structure glucidique présente à la surface des hématies (**Daoudi et al, 2014**).

Dans le but d'étudier la spécificité de nos extraits vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides. Sur le plan qualitatif ce test a permis d'évaluer la spécificité de ces lectines aux glucides et aussi pour identifier le saccharide qu'on peut utiliser pour sa purification.

L'extrait *Punica granatum* ne présente aucune spécificité pour les saccharides testés ce qui résulte par la suite leur agglutination aux hématies. Ces résultats ont été similaires à ceux des lectines purifiées à partir des graines de *Phaseolus acutifolius* (**Valadez et al.**

Discussion

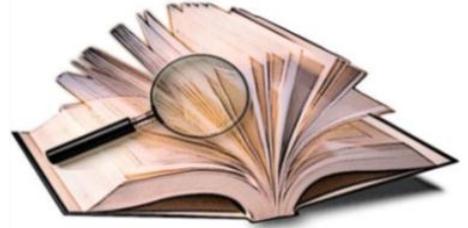
2011), Par contre *Astragalus monghlicus* présentent une spécificité pour le D-galactose et le lactose (**Lam et Ng, 2011**).

Pour étudier la spécificité de nos extraits à des hématies humaines et de trouver un extrait spécifique à un seul groupe et par conséquent, leur utilisation comme nouveau réactif, nous avons réalisé le test d'agglutination sur les hématies humaines (ABO).

L'extrait de *punica granatum* agglutine assez fortement tous les types de groupe sanguins humains, Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Geotrupes stercorarius* et sur *Diploptaxis assurgens* et *Raphanus sativus* qui ont la même propriété (**Devi et al. 2014 ; Deeksha et al. 2015**). Alors nous pouvons classer les lectines de *punica granatum* dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, qui sont généralement désignées comme non spécifique.

La filtration de l'extrait de *punica granatum* sur colonne de Sephadex G75 et la lecture à 280nm ont montrées un bon fractionnement d'extrait (pics séparées). dont (Figure 13). Afin de confirmer la présence des lectines, celles-ci présentent une activité hémagglutinante avec une amélioration de cette activité après la séparation par chromatographie sur colonne.

*Conclusion et
Perspective*



Conclusion et Perspective

Conclusion :

Le travail que nous avons réalisé entre dans le cadre de chercher la présence de Lectines dans la pelure de la plante punica granatum :

- Nous avons extrait lectine à partir de pelure de punica granatum ce molécule ont une activité agglutinante sur les hématies.
- D'autre part, l'extrait de punica granatum est thermorésistant, et stable dans la gamme de pH neutre et acide, alcalin.
- L'extrait de punica granatum ne présentent aucune spécificité pour les saccharides testés, donc qu'il n'y a pas une affinité différente chez les monosaccharides et les glycoprotéines.
- les lectines de punica granatum agglutinent tous les types de groupe sanguin.

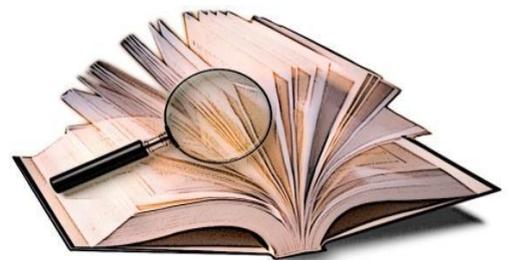
Perspective :

Les résultats de ces travaux sont nombreux obtenus avec la plante encourageant la poursuite des évaluations biologiques par Des tests biologiques :

- Le test d'hémagglutination.
- La limite d'hémagglutination.
- L'effet de la température sur l'agglutination.
- L'effet du pH sur l'agglutination.
- Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.
- Le test d'agglutination sur les hématies humaines ABO.
- L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G75.

Références

Bibliographiques



CHAPITRE01 :

- 1: **Sharon N.** (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology***34**: 213-291.
- 2: **Meite A., Kauame K.G., Kati-Coulibaly S.** (2006) Substances antinutritionnelles. *Med. Nut* **42(4)**: 179-187.
- 3: **Sharon N., Lis H.** (2004) History of lectin: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*.**14**, **53R-62R**: 11.
- 4: **Lis, H. and Sharon, N.** (1998) Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 98, 637-674.
- 5: **Boyd, W. C.& Shapleigh, E.** Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins).*Science* 119, 419 (1954).
- 6: **LENKA. S., IMBERTY. A., JAROSLAVE. K.** modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. Biologie cellulaire. Université de Grenoble I. France, **2006**. Pp 56- 58.
- 7 : **Moothoo, D. N.,** Canan, B., Field, R. A., & Naismith, J. H. (1999). Man α 1-2 Man α -OME-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. *Glycobiology*, **9(6)**: 539-545.
- 8: **YOUNG. N. M., OOMEN. R. P.** Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 924–934.
- 9 : **Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012).** Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langerine. Chimie et sciences du vivant. Université de Grenoble. 2012. pp 63-64.
- 10 : **Peumans.W.J, Vandamme.J.M. (1995).**lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol.*109, 347-352.

Références Bibliographiques

- 11: Vandamme E J, Peumans W J, Barre A, Rougé P. (1998).** Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*.17 (6), 575-692.
- 12: Goldstein I. J, Poretz R.D. (1986).** Isolation physico-chimical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. *The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine*. ELSEVIER. INC, 49-50.
- 13 : Pontet M. (1996)** Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales : les galectines. *Immunoanal.Biol. Spéc* 11: 297-305.
- 14: Gabius. H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985).**Receptor for the cell binding site of discoidinI.*Cell*. (42), 449-456.
- 15: Sharon N, Lis H. (1993).** Carbohydrate in cell recongnition. *Scientific American*.268 (1), 82-89.
- 16: Robert K, Marry .M.D, PhD. (2008).** Les glycoprotéines in *Biochimie de Harper*. DEBOECK, 527.
- 17: Sharon. N and Halima, Lis. (2003).** *Lectins*.Kluwer Academic Publishers.
- 18: Lis H, Sharon N. (1998).** Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev* 98, 673-674.
- 19: Dam T.K and Brewer C.F. (2002).** Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev*.102, 387-429.
- 20: RENATO DE A, MOREIRA (1991).**Plant lectins, chemical and biological aspects.*Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Suppl. II, 211-218.*
- 21: Etzler, M.E. (1986)** Distribution and function of plant lectins. In Liener, I.E., Sharon, N., and Goldstein, I.J. (Eds.), *The lectins: properties, functions and applications in biology andmedicine*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 371–435.
- 22: Goker H, Haznedaroglu I.C, Ercetin S et al. (2008)** Haemostatic actions of the foltloric medicinal plant extract ankaferd blood stooper. *Jint. Med. Res* (36): 163-170.

Références Bibliographiques

23: RYDZ. N., SWYSTUN. L. L., NOTLEY. C., PATERSON. A. D., RICHES. J. J., SPONAGLE. K., BOONYAWAT. B., MONTGOMERY. R. R., JAMES. P. D., LILLICRAP. D. The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. *Blood*, **2013**.121: 5228–5237.

24: SUTAPA. B. M., GOPA. R. P. exploring plant lectines in diagnostic. Pophylaxis andtherapie. *Journal of medicinal plants research*, **2013**. 7(47): 3444-3451.

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

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

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

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

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

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

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

32: Alencar. N.M, Cavalcante CF, Vasconcelos .M.P, Leite KB, Aragao .K.S, Assreuy .A.M, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol.* (57), 919-922.

Références Bibliographiques

- 33: Peumans.W.J, Vandamme.J.M. (1995).**lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol.*109, 347-352.
- 34: SHARON. N.** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996. 408: 1-8. SHARON. N., LIS. H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**. 14: 53-62.
- 35: SHE. Q. B., NG. T. B., LIU. W. K.** A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **1998**.247: 106-111.
- 36: SOMERS. W.S., TANG. J., SHAW. G. D., CAMPHAUSEN. R. T.** Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLex and PSGL-1. *Cell*, **2000**. 103: 467-479.
- 37: VAN DAMME. E. J., PEUMANS. W. J., BARRE A., ROUGÉ. P.** Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **1998**.17(6): 575-692.
- 38: WEIS. W. I., BRUNGER. A. T., SKEHEL. J. J., WILEY. D. C.** Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, **1990**. 212: 737-761.
- 39: LEFFLER. H., CARLSSON. S., HEDLUND.M., QIAN.Y., POIRIER. F.** Introduction to galectins. *Glycoconj.J*, **2004**.19: 433-440.
- 40: GRANT. G.** Lectins. In *toxic substances in crop plants*.ed.by the royal Society oh Chemistry, **1991**. p: 339.
- 41: RENKONEN K. O.** Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, **1948**.26: 66.
- 42: SHE. Q. B., NG. T. B., LIU. W. K.** A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **1998**.247: 106-111.

Références Bibliographiques

43: Gomes-Rezende JA, Gomes-Alves AG, Menino JF, Coelho MA, Ludovico P, p, Sturme MH, Rodrigues F (2012) Functionality of the Paracoccidioides Mating alpha-Pheromone-Receptor System. PLoS One 7(10):e47033.

44: Jain D, Kaur K J, Salunke D M. (2001).Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. Biophys J. 80, 2912-2921.

45: Jeyaprakash A A, Katiyar S, Swaminathan C P, Sekar K, Surolia A. (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. J Mol Biol. 332,217-228.

46: Kaminski PA, Buffard D et Strosberg A D. (1987). The pea lectin gene family contains only one functional gene. Plant molec. Biol. Vol. 9.N°5, pp 497-507.

47: Peumans WJ, Vandamme JM. (1995).lectine as plant defense proteins. Plant Physiol.109, 347-352.

48: Gomes J. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. Agent Action . 41, 132-135.

49: Assreury AMS. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. Mediators of inflammation .6, 201-210.

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

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

52: GUILLOT. J., GUERRY. M., KONSKA.G., CALDEFIE-CHEZET. F., DE LATOUR. M., PENAULT-LLORCA. F. Modification des glycoconjugués au cours

Références Bibliographiques

du processus decancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, **2004**. 91: 141-158.

53: HIRABAYASHI. J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycanprofiling. *Glycoconj.J*, **2004**. 21: 35-40.

54: JAFFE W.G. hemagglutinins (Lectins). In toxic constituents of plant foodstuffs. New –York, Academic Press, **1980**.p: 502.

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

56: MURDOCK. L. L., SHADE. R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food. Chem*, **2002**. 50 (22): 6605-661.

CHAPITRE02 :

1 : LE SYSTEME ABO :

<http://www.snv.jussieu.fr> : 7 Mai 2010

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

3: Brooker, Will (2001) Batman Unmasked: Analyzing a Cultural Icon, Continuum

4: Ramata N. (2010). Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de *Abrus precatorius* L. la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Mali. Université de Bamako. 8.

5 : Ramé A et Naccache P. (2001). Transfusion sanguine. Lamarre .05

6 : Beziat D, Courbil R, Faure C et Meudec J-M. (1996). La thérapeutique transfusionnelle comprendre pour réussir. Heures De France. 226.

7 : David Germanaud, Gilles Furelaud, Groupes sanguins et conséquences médicales, Planet Vie, Dimanche 1 juin 2003 <https://planet-vie.ens.fr/article/1523/groupes-sanguins-consequences-medicales>.

CHAPITRE03 :

1 : Sarkhosh, A., Zamani. Z., Fatahi, R., Ebadi, A., (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punicagranatum* L.) genotypes. *Sci. Hortic*, 111(1), 24-29pp.

2 : Lansky E. et Newman R. (2007). *Punicagranatum*(pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206pp.

3 : Gubernatis A. (1882). La mythologie des plantes ou des légendes du règne végétal. Editeur C. Reinwald Paris. Tome II, 166-169pp.

4 : Calin Sanchez Angel et CarboneliBanaching Angel A.(2005). La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydantgranatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.

5 : Quezel P., Santa s., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des réglos désertiques méridionales. Edition : Centre National de la Recherche Scientifique. Parie 7. 1170p

6 : Clay H.F., Hubbard, C J. (1987).Tropical shrubs.University of Hawaii Press.295 pages.

7 : Edeas M. (2010.) Polyphénols and jus de grenade. *Phytothérapie* . 8:16-20.

Références Bibliographiques

8 : Wald E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum*): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes, Thèse de doctorat en pharmacologie de l'université Henri Poincaré - Nancy 1. 159 pages.

9: Heber, D., Schulman, R. N., & Seeram, N. P. (2006).*Pomegranates : Ancient roots to modern medicine.* CRC press

10: El-Nemr, S. E., Ismail, I. A., & Ragab, M. (1992).The chemical composition of the juice and seeds of pomegranate fruits.*Flüssiges Obst*, 59(11), 162–164.

11: Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007).Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta medica*, 53(05), 461–467.

12 : Sivarajan, V. V., & Balachandran, I. (1994). *Ayurvedic drugs and their plant sources.*Oxford and IBH publishing.

13: Yssaad A.R., Hammadi K. (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*).*Américan journal of microbiology and biotechnology*. 4:100-107.

14 : Deramchi Soufiane, Etude phytochimique de deux plantes steppique ;*Punica granatum* L *Ampélodemos mauritanicus* ,thèse Master en chimie ;Université ACHOUR de DJELFA ,2015 , PP1-2-3

15:Heber, D., Schulman, R. N., & Seeram, N. P. (2006).*Pomegranates : Ancient roots to modern medicine.* CRC press.

Discussion

1: DAOUDI. A., ABDEL-SATTER. E., AARAB. L. The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, 2014. 3(1): 56-64.

- 2: DEVI. P. R., KOMBIAH. P., SUDHAKAR. R. G., BABU. G.** Purification And Characterization Of A Novel Lectin From *Geotrupes Stercorarius*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, **2014**. 15 (2): 157-162.
- 3: LAIJA. S. N., MAHESH. S., SMITHA. L. S., REMANI. P.** Isolation and Partial characterization of two plant lectins. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2010**. 2(4): 232-237.
- 4: LAM. S. K., NG. T. B.** Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, **2010**. 17: 457–462.
- 5: DEEKSHA. M., SANGHA. K., KHURANA. D. S., KAUR. G., BALA. M., SINGH. B.** Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch*, **2015**. 3(1): 20-24.
- 6: SHAISTA. R., SAKEENA. Q., ISHFAK. H. W., SHOWKAT. A. G., AKBAR. M., RABIA. H.** Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. *Pak. J. Pharm. Sci*, **2014**. 27(6): 1805-1810.
- 7: VALADEZ. V. C., GUZMAN. P. A., JAVIER SOTO. C. F., ÁLVAREZ. M. G., MORALES. G. J., MADRIGAL. S. E., JOSE ROBERTO VILLAGOMEZ. I. J. R., ZUÑIGA. P. C., JOSE GUTIERREZ. S. J., BECERRIL. F. M.** Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules*, **2011**. 16: 2561-2582.
- 8: Baltimore L., Zipursky., Darnell M.** (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*. 1ère édition. De BOECK Université : 73.
- 9: Cuq J-L.** (1992) *Qualité de nos aliments et technologies* In *Alimentation et nutrition Humaines*. ESF : 1240.
- 10: Eckert R., Randall D., Burrggren W.** (1999) *Physiologie animal : mécanismes et adaptations*. Fourth édition. DE BOECK. Paris : 90.

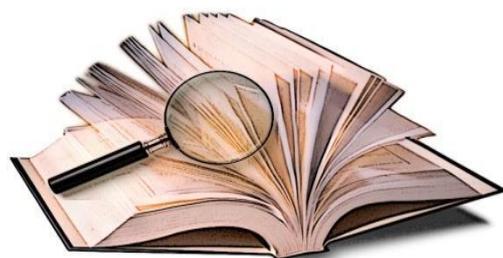
Références Bibliographiques

11:Levene C., Gilboa-Garber N., Garber N. C. (1994) Lectine-blood group interaction in Doyle R.J. Lectin-microorganism interaction. Marcel, Dekker. INC: 327.

12: Oliveira S. R. M; Nascimento A. E; Lima Y. F. M.M; Benevides N. M. B (2002):Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia*.

13:Ringe P. (2009) Structure et fonction des protéines. DE BOECK : 27.

Annexe



Annexe 01: Préparation du Tampon

- **Préparation de la solution tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH 7,4) Pour 5 litres.**

Produit chimique	Quantité
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	0,435 g
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	5 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	45 g
Eau distillée	5 L

Annexe 02: Préparation des saccharides.

- **Préparation des saccharideset glycoprotéines.**

Sucre/glycoprotéines	Na Cl
0,1 g	1 ml

Annexe 03 : Préparation du NaCl.

- **Préparation du NaCl 0,9 M :**

NaCl	Eau distillée
0,9g	0,1L

Annexe 04 : les Résultats de l'absorbance de 40 fractions.

- **Préparation des 40 fractions.**

Tableau 11: Résultats de l'absorbance de 40 fractions obtenues après la purification partielle des Protéines par chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G75.

Fraction	absorbance	fraction	absorbance
1	1	21	0.060
2	1	22	0.060
3	1	23	0.052
4	1	24	0.045
5	1	25	0.046
6	2.182	26	0.046
7	1.319	27	0.046
8	0.783	28	0.046
9	0.489	29	0.046
10	0.319	30	0.037
11	0.195	31	0.036
12	0.167	32	0.036
13	0.149	33	0.043
14	0.105	34	0.078
15	0.092	35	0.034
16	0.067	36	0.044
17	0.080	37	0.038
18	0.073	38	0.052
19	0.061	39	0.149
20	0.207	40	0.039

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : FILALI CHOUBEILA
LEULMI SOULEF

***L'extraction des lectines à partir d'une plante médicinale «Punica Granatum »
avec des tests biologiques.***

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé

Les lectines sont une famille de protéines polyvalentes et polyvalentes et de glycoprotéines de nature non immunogène qui se lient de manière spécifique, non covalente et réversible aux fractions glucidiques.

L'objectif de cette étude est de rechercher les lectines présentes dans les écorces de la plante médicinale (Punica granatum) à travers le test d'agglutination et l'étude biologique de ses différentes propriétés afin de rapporter le pH approprié, la stabilité thermique, les interactions avec les sucres et avec l'activité d'hémagglutination ABO. Puis broyage, trempage dans du sérum physiologique, détection qualitative et quantitative, agglutination avec du sang de lapin, double dilution, puis passage en chromatographie verticale. L'activité d'agglutination de l'extrait (Punica granatum) avec du sang de lapin a montré une intensité d'agglutination estimée à (1/14096) et ces lectines ont montré une activité d'hémagglutination avec tous les groupes sanguins (il a été donné une sélectivité élevée avec tous les groupes sanguins AB, A ,B ,O) pour le traitement thermique l'agglutination a été dans les deux La température est (20°, 40°, 60° , 80° ,100°) mais la température optimale est (60) (après une période d'incubation de 30 minutes) .

Extrait de lectines (Punica granatum) à différents pH pendant une heure Avec cela, l'activité agglutinante optimale est (Ph=13 et Ph=1,31) ci-dessous caractérisée par un pH acide et alcalin (après une période d'incubation de 30 minutes).

Dans le test d'inhibition avec différents glucides, aucune inhibition n'a été montrée

L'application de la chromatographie verticale à l'aide de Sephadex G75 en a donné un 4 pic élevé.

Mots-clefs : Lectines, extraction, activité d'hémagglutination, plante médicinale, sucres, glycoprotéines, système ABO, inhibition.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de. «Géné Microbiologique et Applications » du Bio-pôle situé à Chaab ersass (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Mme BAHIA

(MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr NECIB.Y

(Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mme LOUAAR.I

(Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1).