

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie et Biologie

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Cellulaire et Moléculaire

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 :

Caractérisation et l'immunomodulation des lectines extraites à partir de *Morus alba L* et *Amanita virosa*

Présenté par : BENTAFAR Aida

Le :13/06/2023

BOUARIOUA Ahlam

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr NECIB Y

Professeur UFM Constantine 1

Rapporteur: Mme BAH I A

M.C.A UFM Constantine 1

Examineur : Mme DJEMAI ZOUGHLACHE S

M.A.A UFM Constantine 1

Année universitaire

2022 – 2023

Remerciement

Avant tout, nous remercions ALLAH 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 tenons tout d'abord à exprimer toutes nos reconnaissances et nos profonds respects a notre encadrant **Dr BAHI Ahlem** Maitre 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 1, Pour avoir dirigé ce travail, pour toute la compréhension qu'il a montré la disponibilité et la patience, pour sa générosité scientifique, ses conseils précieux et ses encouragements qui nous ont permis de mener à bien réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de Jury d'avoir accepté d'évaluer notre travail :

A notre président du jury **Monsieur Necib. Y** professeur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à L'Université des Frères Mentouri Constantine 1, c'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.

A notre examinatrice **Dr DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia** Maitre assistante à l'université du frères Mentouri , nous sommes fières que vous avez accepté d'examiner et de juger notre modeste travail de fin d'étude.

Nos vifs remerciements aux membres de l'équipe laborantine.

Sans oublier de remercier vivement **Dr BOUDERSSA Nabil** pour leur gentillesse, simplicité et sympathie.

Merci

Dédicace

Merci dieu le tout miséricordieux, ton amour et tes

Grâces à mon égard m'on donne la persévérance et

Le courage pour accomplir ce travail

A ma chère mère Dahbia

Qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, je ne saurai te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon père Abd al-Madjid

Ma précieuse offre du dieu, aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements

A mon mari Fares

Pour tout le soutien, qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mon mémoire que Dieu te garde à mes côtés.

A mes frères Sami, Waïl, Abdo et le prince Hayder, que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A tout la famille de ma mère particulièrement mon grand-père *Abd elrachid*, ma grand-mère *Meriem*, et mon oncle *Ahmad*.

A mon amie intime et ma sœur Chahra

Qui m'a toujours encouragé que dieu nous maintien notre amitié pour toujours

AIDA

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail de fin d'étude :

A mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour éternel, mon respect et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon construction et ma bien-être.

Ma chère mère NADJET

La femme plus douce, la plus forte et la plus belle que j'ai jamais vue, je t'aime mama et je vous remercie pour tout le soutien, la patience et l'amour que vous me portez depuis ma naissance et j'espère que votre bénédiction ma compagne toujours.

Mon cher père MOHAMED

L'homme de ma vie qui réussit toujours de dessiner le sourire sur mon visage, qui était tout le temps près de moi pour m'écouter, me soutenir et m'encourager, je t'aime tellement papa et je remercie pour tous vos efforts, que Dieu garde votre bénédiction ma compagne.

A mes chers frères AYMEN, YOUNES et le petit *LOUAY* qui sait toujours comment procurer le bonheur pour toute la famille.

A mon grand-père NOUAR et tous les membres de ma grande famille *BOUARIOUA* et la famille *SALEM*, mes oncles spécialement *YACIN* et *RACHID*, mes tantes, mes cousins et mes chères cousines.

A mes chères amies

MERYEM qui était la sœur et l'amie à moi merci pour votre pur amour ;

TEQWA, ZAYNEB et *RAYEN* les vraies amies qui me partagent tous les bons et les mauvais moments ;

Et la meilleure des unes *AMANI* qui est vraiment une grande bénédiction, merci pour être toujours près de mes côtés.

AHLAM

Résumé

Les lectines constituent un groupe de protéines ou glycoprotéines ubiquitaires et polyvalentes d'origines non immunitaires, qui se lient de manière non covalente, spécifique et réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexe sans réagir catalytiquement avec eux, lorsque ces glucides sont des composants des parois cellulaires, les lectines provoquent l'agglutination des cellules qui les contiennent.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines contenues dans l'extrait brut de la plante *Morus alba L* (racine) et le champignon *Aminata virosa* par le test d'hémagglutination. Après des tests par des hématies de lapins, les limites d'agglutination de *Morus alba* et d'*Aminata virosa* ont été 1 :64 pour les deux. Les lectines de l'extrait de *Morus alba L* ont donné une forte sélectivité sur les hématies humaines du groupe sanguin A. L'extrait de *Aminata virosa* n'a montré aucune capacité à distinguer les groupes sanguins humains. Pour certains sucres, la mannose a inhibé l'activité hémagglutinante des lectines de *Morus alba L*. Et pour *Aminata virosa*, Mannose, Lactose et Galactose ont inhibé l'activité hémagglutinante des lectines. L'activité hémagglutinante de l'extrait de *Morus alba L* a été stable dans la gamme de pH (3-10) et thermostable, il conserve son activité jusqu'à 100°C pendant une heure. Tandis que l'extrait de *Aminata virosa* a été stable dans la gamme pH (2-12) et conserve son activité jusqu'à 80°C pendant une heure. Les deux extraits qu'on a utilisés ont un effet immunitaire, mais celui de *Morus alba L* marque un indice phagocytaire plus élevé que celui de *Amanita virosa*.

Mots clés: *Morus alba*, *Aminata virosa*, Lectine, Extraction, thermostable, Hémagglutination, Activité phagocytaire

ملخص

الليكتينات هي مجموعة من البروتينات أو البروتينات السكرية المنتشرة في كل مكان ومتعددة الاستخدامات من أصل غير مناعي ، والتي تعتبر خاصة غير تساهمي وقابلة للانعكاس لأشجار الكربوهيدرات من الكربوهيدرات المعقدة دون التفاعل التحفيزي معها ، عندما تكون هذه الكربوهيدرات مكونات لجدران الخلية ، تسبب الليكتينات الخلايا التي تحتوي عليها لتتجمع معا.

الهدف من هذا العمل هو البحث عن وجود الليكتينات الموجودة في المستخلص الخام لنبتة *Morus alba L* (الجزر) وفطر *Aminata virosa* عن طريق اختبار التراص الدموي. بعد الاختبارات باستخدام خلايا الدم الحمراء للأرانب ، كانت حدود التراص ل *Morus alba L* و *Aminata 1:6 (64)* لهذين. يعطى ليكتينات مستخلص *Morus alba L* انتقائية قوية على خلايا الدم الحمراء لفصيلة الدم البشري A ، ولم يُظهر مستخلص فطر *Aminata* أي قدرة على التمييز بين فصائل الدم البشرية. بالنسبة لعدد من السكر المنفرد ، فإن مانوز يثبط نشاط التراص الدموي للكتين من *Morus alba L*. وبالنسبة لأميناتا فيروسا ، مانوز ، لاكتوز ، وجالاكتوز يثبط نشاط التراص الدموي للكتين. نشاطه عالي التراص هو أكثر من نشاط *Morus alba*. إنه مستقر في نطاق الأس الهيدروجيني (3-10) وقابل للحرارة لأنه يحافظ على نشاطه حتى 100 درجة مئوية خلال النهار. بينما كان فيروس أميناتا مستقراً في نطاق الأس الهيدروجيني (2-12) واحتفظ بنشاطه حتى 80 درجة مئوية لمدة ساعة. المستخلصان المستخدمان لهما تأثير مناعي ، لكن مستخلص *Morus alba L* يظهر مؤشر بلعم أعلى من فطر *Amanita*

الكلمات المفتاحية

لكتين ، الاستخلاص ، قابل للحرارة ، التراص الدموي ، نشاط البلعم ، *Morus alba* , *Amanita virosa*

Abstract

Lectins are a group of ubiquitous and versatile proteins or glycoproteins of non-immune origin, which bind in a specific and reversible non-covalent manner to the carbohydrate moieties of complex carbohydrates without reacting catalytically with them. cells, lectins cause the cells containing them to clump together.

The aim of this work is to look for the presence of lectins contained in the crude extract of the *Morus alba L* plant (root) and the *Amanita virosa* mushroom by the haemagglutination test. After testing with rabbit red blood cells, the agglutination limits of *Morus alba* and *Amanita virosa* were 1:6(64) for both. Lectins from *Morus alba L* extract showed strong selectivity for group A red blood cells. *Amanita virosa* extract showed no ability to discriminate between human blood groups. For some number of sugar only mannose inhibited the haemagglutinating activity of lectins from *Morus alba L*. And for *Amanita virosa*, Mannose, Lactose, Galactose, inhibited the haemagglutinating activity of lectins. The haemagglutinating activity of *Morus alba* extract was stable in the pH range (3-10) and up to 100°C for one hour. While *Amanita virosa* was stable in the pH range (2-12) and up to 80°C for one hour. The two extracts that we used have an immune effect, but that of *Morus alba L* shows a higher phagocytic index than that of *Amanita virosa*.

Keywords :

Morus alba ,*Amatita virosa*,Lectine,Extraction,thermostable,Hemagglutination,phagocytic activity.

Sommaire

Introduction.....	20
Chapitre I.....	22
1. Généralités sur les lectines.....	1
1.1. La définition	1
1.2. L’historique	1
1.3. La Structure des lectines.....	4
1.4. La détection et spécificité des lectines	6
1.5. Les types des lectine.....	7
1.6. La classification des lectines	8
1.7. L’immumodulation et lectines.....	10
2. L’intérêt des lectines pour l’homme	10
Chapitre II	11
1. Généralité sur <i>Morus alba</i>	12
1. Position systématique.....	12
2. L’utilisation médicinale	13
2. Généralité sur <i>Amanita virosa</i>	13
1. Position systématique.....	13
2. La toxicité ou intérêt culinaire	14
Chapitre III.....	15
Le système sanguin	15
1.Historique.....	16
2. Le système ABO.....	16
3. Facteur Rh.....	17
4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO	17
5. Lectines spécifiques des groupes sanguins.....	18
Matériels et Methode	19
1. Matériels	20
1.1. Matériels végétales	20
1.2. Matériels biologiques	20
1.3. Matériels animale	20
2. Les méthodes	21
2.1. L’étude phytochimique.....	21
2.1.1. La préparation de différents échantillons.....	21
2.1.2. La préparation d’une suspension d’hématies du lapin et humaine à 4%	21

2.1.3.	Test d'hémagglutination	22
2.1.4.	Test limite d'agglutination de l'extrait brut des échantillons	22
2.2.	L'étude des caractéristiques des extraits de lectines	23
2.2.1.	Test d'inhibition d'agglutination par les glucides et les glycoprotéines.....	23
2.2.2.	L'effet des métaux (oligoéléments) sur l'activité d'agglutination.....	23
2.2.3.	Le test d'agglutination avec les hématies humaines ABO.....	24
2.2.4.	L'effet de température sur l'activité agglutinante.....	24
2.2.5.	L'effet du pH sur l'hémagglutination	24
2.2.6.	Purification partielle des lectines par chromatographie sur colonne:	24
2.2.7.	Dosage des protéines	25
2.2.8.	Lyophilisation	25
2.3.	Le test biologique	26
2.3.1.	Répartition des groupes.....	27
2.3.2.	L'injection du traitement.....	27
2.3.3.	L'injection de carbone	27
2.3.4.	Le prélèvement sanguin et la lecture d'absorbance	27
2.3.5.	Le prélèvement des organes	27
2.3.6.	L'activité phagocytaire	28
2.3.7.	L'analyse statistique.....	28
	Résultats et discussion	29
1.	L'étude phytochimique	30
1.1.	Le test d'hémagglutination.....	30
1.2.	Le test de limite d'agglutination de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et du <i>Morus alba L</i> :..	31
2.	Les caractéristiques d'extrait de lectine du <i>Amanita virosa</i> et du <i>Morus alba L</i>	32
2.1.	L'effet de température sur l'activité agglutinante	32
2.2.	Le test d'inhibition de l'activité agglutinante.....	33
2.3.	L'effet d'agglutination sur les hématies humaines ABO	37
2.4.	L'effet des métaux (oligoéléments) sur l'activité d'agglutination	38
2.5.	L'effet de BSA (glycoprotéines) sur l'hémagglutination.....	39
2.6.	L'effet du pH sur l'activité agglutinante	39
2.7.	Purification partielle de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et du <i>Morus alba L</i> par chromatographie sur colonne de séphadex G75.....	41
2.8.	Les résultats de dosage des protéines	42
3.	Le test biologique	42
3.1.	L'effet de <i>Morus alba L</i> et de <i>Amanita virosa</i> sur l'activité phagocytaire	42

Conclusion et perspectives.....	45
Conclusion	46
Perspectives.....	46
Références bibliographiques.....	47
annexes.....	53

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Représentation graphique d'un monomère de concanavine A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde .	4
Figure 02: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique .	5
Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriales de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i>	5
Figure 04: Le teste d'héagglutination pour la détection de la lectine .	6
Figure 05: L'interaction cellulaires par lectine .	7
Figure 06: Classification des lectines par structure .	9
Figure 07: <i>Amanita virosa</i> .	14
Figure 08: Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO.	17
Figure 09 : Plan experimental suivi dans l'évaluation du potentiel immunomodulateur de la lectine des extraits du <i>Morus alba L</i> et <i>Amanita virosa</i> in vivo.	26
Figure 10: Détermination du température optimale de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et <i>Morus alba L</i> .	33
Figure 11: La détermination du pH optimale de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et du <i>Morus alba L</i> .	40
Figure 12: la courbe d'absorbance de l'extrait de de <i>Amanita virosa</i> à 200 nm après leur passage a travers la colonne de séphadex G75.	41
Figure 13: la courbe d'absorbance de l'extrait de de <i>Morus alba L</i> à 200 nm après leur passage a travers la colonne de séphadex G75.	41
Figure 14: L'effet des extraits de <i>Morus alba L</i> et de <i>Amanita virosa</i> sur l'index phagocytaire K dans le test de l'injection du carbone chez la souris.	43
Figure 15: l'effet des extraits de <i>Morus alba L</i> et de <i>Amanita virosa</i> sur le taux de clearance.	43
Figure 16: L'effet des extraits de <i>morus alba L</i> et de <i>amanita virosa</i> sur l'index phagocytaire corrigé (α).	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : L'historique de la découverte des lectines	1
Tableau 02 : Classification systématique du <i>Morus alba l</i>	12
Tableau 03 : classification systématique du <i>Amanita virosa</i>	13
Tableau 04 : groupes sanguins du système abo	16
Tableau 05 : Les xemples des lectines spécifiques des groupes sanguins.....	18
Tableau 06 : Activité d'hémagglutinante des échantillons testés.....	30
Tableau 07 : L'Activité de la limite d'agglutination des extraits des <i>Amanita virosa</i> et <i>Morus alba</i>	31
Tableau 08: Effet de la température sur l'activité agglutinante de l'extrait	32
Tableau 09: Inhibition de l'activité hémagglutinante du <i>amanita virosa</i>	34
Tableau 10 : Résultats des tests limites d'inhibition d'agglutination de <i>Amanita virosa</i> par le Mannose, Lactose et Galactose.	35
Tableau 11: Résultats de Test limite d'inhibition d'agglutination de <i>Morus alba L</i> par le manose.	36
Tableau 12: L'agglutination des hématies humaines (A, B et O) par l'extrait brut des	37
Tableau 13: L'effet des métaux sur l'activité agglutinante de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et du <i>Morus alba</i>	38
Tableau 14:L' effet de BSAsur l'activité agglutinante de l'extrait du <i>clitocybe nuda</i> et.....	39
Tableau 15: Effet du pH sur l'activité agglutinante de l'extrait du <i>Amanita virosa</i> et <i>Morus alba L</i>	39
Tableau 16: Les résultats du test de dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de <i>Amanita viroso</i> et <i>Morus alba L</i>	42

LISTE DES PHOTOS

photo 1 : <i>Morus alba L</i>	12
photo 2: Résultats du macération des poudres des echantillon pendant trois jours à 4°C.	21
photo 3	26
photo 4: Les souris utilisés pour le test.	27
photo 5: Résultats du test limite d'inhibition d'agglutination de <i>Amanita virosa</i> par les glucides.	35
photo 6: Résultat du test limite d'inhibition d'agglutination de <i>Morus alba L</i> par le manose.	36

Les abréviations

% : Pourcent

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

A.Virosa : *amanita virosa*

BSA : Albumine de sérum bovin

Con A : Concavaline A lectin

CRD : domaine de reconnaissance de glucide

CuSO₄ : Sulfate de Cuivre

E. coli : Escherichia coli

G : Groupe

G : Gramme

G1 : Groupe témoin

G2 : Groupe traité par l'extrait de morus alba L de dose 25mg/kg

G3 : Groupe traité par l'extrait de morus alba L de dose 50mg/kg

G4 : Groupe traité par l'extrait d'*amanita virosa* de dose 25mg/kg

G5 : Groupe traité par l'extrait d'*amanita virosa* de dose 50mg/kg

H : Heur

HCl : Chlorure d'hydrogéné

INK : index K

KD : Kilo dalton

Kg : Kilogramme

mg /ml : Milligramme/ Millilitre

min : Minute

ml : Millilitre

mM : Milli mole

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium

NaCl : Chlore de Sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm : Nanomètre

OD : Densité Optique

PBS = la solution tampon phosphate di-sodique

pH : potentiel Hydro isoélectrique

Rh :rhésus

Reac : Réactif

t1/2 : Temps de demi-vie

trs/min : Tour par minute

INTRODUCTION

Introduction

Les lectines sont des protéines pertinentes à une spécificité des glucides significativement élevée, de nombreux organismes les produisent naturellement, y compris les animaux, les plantes, les champignons, les vaccines, les bactéries, les archées et les virus. Chaque molécule de lectine contient généralement plusieurs sites de liaison pour une association simultanée avec plusieurs unités de glucides qu'ils ciblent (**Fernández Romero JA et al., 2021**). En raison de leur capacité à se lier spécifiquement aux glucides, les lectines sont largement utilisées en recherche et en diagnostic. Elles peuvent être utilisées pour isoler et caractériser des cellules spécifiques, pour étudier les interactions entre les molécules et les voies de signalisation, ainsi que pour développer des outils de détection et de ciblage de substances spécifiques.

Ces protéines agissent comme des molécules adhésives dans les processus de colonisation des bactéries, de l'archéologie, des plastiques et des champignons. En outre, ils jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense et nodule des plantes. Fait intéressant, ils participent à diverses fonctions de l'animal, telles que la migration et l'adhésion des cellules, la désinfection, les réponses immunitaires et phagocytes, et la production de protéines diabétiques (**Nabi-Afjadi M et al., 2022**). Il est important de noter que certaines lectines peuvent être toxiques pour les humains et causer des effets indésirables lorsqu'elles sont consommées en grandes quantités. Par conséquent, il est recommandé d'être conscient des sources alimentaires de lectines et de prendre des précautions appropriées, telles que la cuisson adéquate des aliments, pour réduire les risques potentiels.

L'objectif principal de ce travail est :

- Etude la présence des lectines par le test hémagglutination avec le sang des lapins
- Etude l'affinité de ces lectines vers le glucide par le test d'inhibition .
- Etude l'effet des métaux (oligoéléments) sur l'activité d'agglutination
- Etude l'affinité de ces lectines vers les globules rouges de l'être humain ABO
- Etude l'effet de la température, pH et sur l'activité de ces lectines.
- Dosage des protéines par la méthode de Lowry
- Etude biologique.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUES**

CHAPITRE I

LECTINE

1. Généralités sur les lectines

1.1. La définition

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire qui lient des glycanes (ou glucides) spécifiques à des glycoprotéines, des glycolipides ou des oligosaccharides (**Likun Duan et al.,2020**). Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand. (**Sharon N. et Lis H., 1998**). Lectine est distribuée partout dans les organismes, les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (**Mazalovska et Kouokam, 2020**). Ils sont capables de reconnaître un petit nombre de sucres spécifiques présents dans les membranes cellulaires qui jouent un rôle important dans la reconnaissance et les interactions intercellulaires-adhésion, migration et invasion cellulaires (**Katink-Prastowska, 1999 ; NangiaMakker et al., 2002 ; Ribeiro et al., 2012**). Les lectines est l'un des groupes de protéines les plus étudiés en raison de leurs rôles biologiques inhabituels (**AYBÜKE OKAY et al.,2022**).

1.2. L'historique

La lectine a été découverte par Peter Hermann Seltmark en 1888 qui a décrit dans sa thèse de doctorat à l'Université durbat (aujourd'hui Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon et Lis 2004**). À partir de ce moment-là, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1919, James B.Sumner, à université Cornell (Ithaca, new York, a connu comme à se cristalliser dans 1926 enzymes uréase, isolé une protéine à partir *Canavalia ensiformis*, nommée concavalin A c'est le premier hémagglutinine pure. (**Sumner, 1919**). Cependant, il a été presque deux décennies avant Sumner et Howell (1936) ont déclaré que concavalin a lié des cellules comme les globules rouges et les levures. (**Sumner et Howell, 1936**). En 1954, Boyd et Shapley ont montré la propriété de ces protéines d'assembler sélectivement des érythrocytes humains du groupe don de sang (**Boyd et Chapley 1954**). Cette notion de vie privée est à la base le nom «Lactin» est dérivé du mot latin« légère » qui signifie choix ou sélectionné.

Tableau 01 : L'historique de la découverte des lectines (Bouteldja H. et Ynineb L.E., 2019).

Année	Chercheur	Découverte
1884	Warden&waddel / Bruyllant&Venneman	La toxicité de la graine de l'Arbusprecaorius
1886	Dixon	Toxicité de la graine de <i>Ricinuscommunis</i>

1888	Stillmark	Activité hémagglutinine de la graine de Ricinus communis Toxicité de la graine de Croton tiglium
1891	Hellin	Activité hémagglutinine de la graine d'Abrus precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1917	James B. Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A (Con A)
1926-1949	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de Phaseolus Vulgaris
1949	Jaffé	Inactivation thermique des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectine

1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de Phaseolusvulgaris
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des Lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'E.Coli
1988	D'Oliveira et al	Usage des lectines dans le traitement des pathologies Pancréatiques
1995	Hirokazu ka wagishi	Les lectines chez les champignons (mushroom lectins.2015)
2002	Hexiang Wang et al	L'isolement d'une nouvelle heterodimerique lectine avec une activité mitogenique à partir d'un champignon : Agrocybecylindracea
2003	M.W. Turner	Le rôle de la lectine liant le mannose dans le traitement et les maladies
2004	Ilka M. Vasconcelos José & Tadeu A. Oliveira	L'activité anti-nutritionnelle des lectines végétales (Antinutritional properties of plant lectins Toxicon 44 (2004) 385–403)
2011	Poiroux Guillaume	Evaluation du potentiel de lectines végétales

		dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photochimiothérapie
2015	Yau Sang Chan & Tzi Bun Ng	Lectine avec un grand potentiel d'inhibition des cellules cancéreuses mammaliennes du champignon comestible de l'espèce : <i>Dioscorea opposita</i> cv. de la région Nagaimo au Japon

1.3. La Structure des lectines

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

1.3.1. Les lectines simple

Ces lectines se composent de plusieurs monomères (pas nécessairement identiques), y compris le poids moléculaire global ne dépasse pas 40 kD. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Šnajdrová L., 2006).

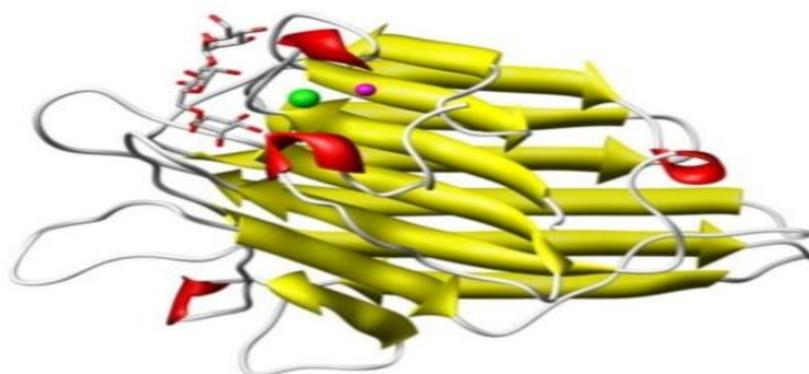


Figure 1: Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (Šnajdrová L., 2006).

1.3.2. Lectines en mosaïques

Ce groupe comprend différentes lectines de différentes sources (virus et animaux). Ce sont des molécules complexes composées de plusieurs types de domaines, dont un seul possède le site de liaison (Šnajdrová L., 2006).

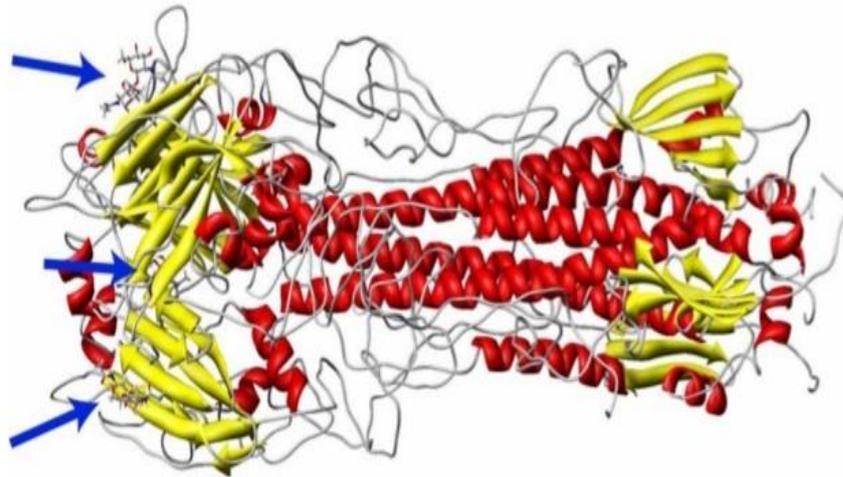


Figure 02: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Šnajdrová L., 2006).

1.3.3. L'assemblages macromoléculaires

C'est l'assemblage et la condensation des chaînes du polypeptide, qui se produisent habituellement au niveau de la paroi bactérienne et fixer des structures filamenteuses d'un diamètre de 3-7 nm et une longueur de 100 nm. Appelées fimbriae ou pili, La plus grande partie d'un filament fimbriale est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement un composant minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriale (Šnajdrová L., 2006).

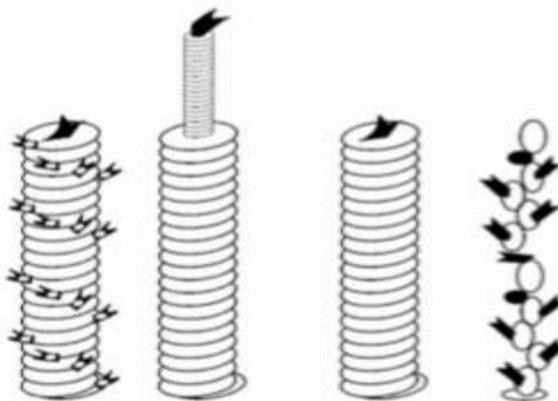


Figure 03: Représentation schématique de différents fimbriale de la bactérie d'Escherichia coli (Lis H. et Sharon N., 1998).

1.4. La détection et spécificité des lectines

La plupart des lectines sont spécifiques d'un petit nombre de glucides et que la majorité des cas, ces sucres se trouvent à l'intérieur et à la surface des cellules, en particulier sous forme de glucoconjugués. Deux types des lectines peuvent être transmis concernant leur spécificité : ceux qui reconnaissent des monosaccharides spécifiques et ceux qui reconnaissent spécifiquement les oligosaccharides (**Sharon 2003**). Les protéines monosaccharidiques sont classées en cinq groupes, selon le type de sucre qui contient la plus forte affinité pour : le mannose (Man), le galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (**Lis and Sharon 1998**). Ces monosaccharides et leurs dérivés sont souvent présents sur les Epitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La combinaison de nombreuses techniques expérimentales permet de clarifier la spécificité de lectine. (**Park S et al., 2008**). Les lectines, dans la plupart des cas, sont di-ou multivalentes et peuvent interagir avec les glucides ou glycoprotéines dans la solution ou associées aux membranes cellulaires et leurs sites de liaison interagissent avec les cellules qui forment différentes liaisons réversibles. Grâce à cette capacité, les lectines sont facilement détectées par le teste d'agglutination. Les testes d'hémagglutination permet une visualisation facile de l'agglutination Propriété érythrocytaire des lectines. L'utilisation d'érythrocytes d'origine humaine ou animale, traités enzymatiquement, chimiquement, ainsi que non traité a montré que les lectines peuvent être spécifiques de différents érythrocytes. (**Santos et al.,2014**).

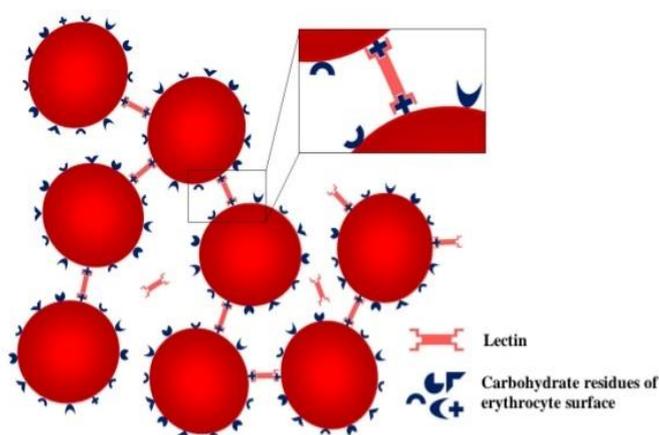


Figure 04: Le teste d'hégglutination pour la détection de la lectine (Santos *et al.*,2014).

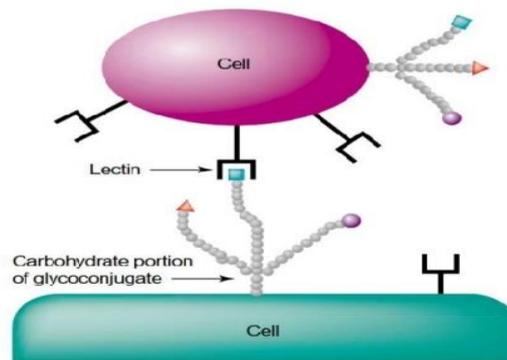


Figure 05: L'interaction cellulaires par lectine(Nangia -Makker *et al.*, 2002).

1.5. Les types des lectine

Etant donné que les lectines sont produites par différents organismes des microbes aux mammifères, ils peuvent être classés par type sources telles que les lectines d'algue, les lectines fongiques, les lectines bactériennes, les lectines animales et les lectines végétales. (A. Mishra *et al.*, 2019).

- **Les lectines d'algues**

Aussi connues sous le nom phycolectines, elles présentent une spécificité pour les glycoprotéines plutôt que pour les monosaccharides. Présente un teneur élevé en acides aminés acides, ne nécessite pas d'ions métalliques pour son activité biologique. (A. Mishra *et al.*, 2019).

- **Les lectines fongique**

Il montre une grande spécificité pour la mucine et la N-acétylgalactosamine résidu (GalNAC). Une variété des lectines fongiques a été identifiée, y compris 82 champignons, 15 champignons microscopiques (moisissures), et 3 levures. Ils ont été trouvés généralement dans la fructification, à quelques exceptions près chez les champignons. (A. Mishra *et al.*, 2019).

- **Les lectines bactériennes**

Ils sont également connus comme adhésifs parce qu'ils aident à fixer les bactéries aux cellules hôtes pendant l'infection, les récepteurs glycans sont associés aux domaines de reconnaissance des glucides (CRD). Les bactéries ont de nombreuses adhésions à de nombreux glucides spécifiques. (A. Mishra *et al.*, 2019).

- **Les lectines animales**

Ce sont des protéines liées aux glucides avec une structure d'acides aminés très variable séquence capables de relire des structures glucidiques complexe CRD. Chaque animal a son propre linge CRD dans la même séquence résidus d'acides aminés 115-130. (**A. Mishra et al., 2019**).

- **Les lectines des plantes**

La présence d'au moins un domaine non catalytique inversement corrélé (**A. Mishra et al., 2019**). Ce sont une riche source de lectine et une source majeure d'isolement et d'analyse de molécules. Les lectines sont présentes dans différents tissus végétaux et a des propriétés biologiques différents. La principales sources d'actine est généralement les graines et les graines de légumineuses noires sont particulièrement riches en ces protéines (**Santos et al., 2014**).

1.6. La classification des lectines

Chez les plantes

En raison de la diversité des cours par rapport au travail et leur classification n'a pas été entièrement élaborée. Lectine liée aux glucides peut être divisée en 4 types :

- **Myrolectine** : sont des protéines de faible poids moléculaire consistant en une seule protéine. (**kumar and Naik et al., 2022**). Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules (**Peumans et Van Damme, 1995**).
- **Hololectines** : contient plus deux sites de liaison des glucides. La plupart des lectines appartiennent à cette catégorie. (**kumar and Naik et al., 2022**). Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules (**Van Damme et al., 1998**).
- **Chimiolectines** : protéines chimérique consistant en une liaison glucidique et le domaine d'activité de stimulation. Selon les sites de liaison, ils travaillent à comme merolectine ou hololectine. (**kumar et al., 2022**).
- **Superlectines** : superlectines peut également être considéré comme les chimiolectines se composent exclusivement d'au moins deux sites de liaison des glucides, qui reconnaît structurellement les polysaccharides non attachés (**kumar and Naik et al., 2022**).

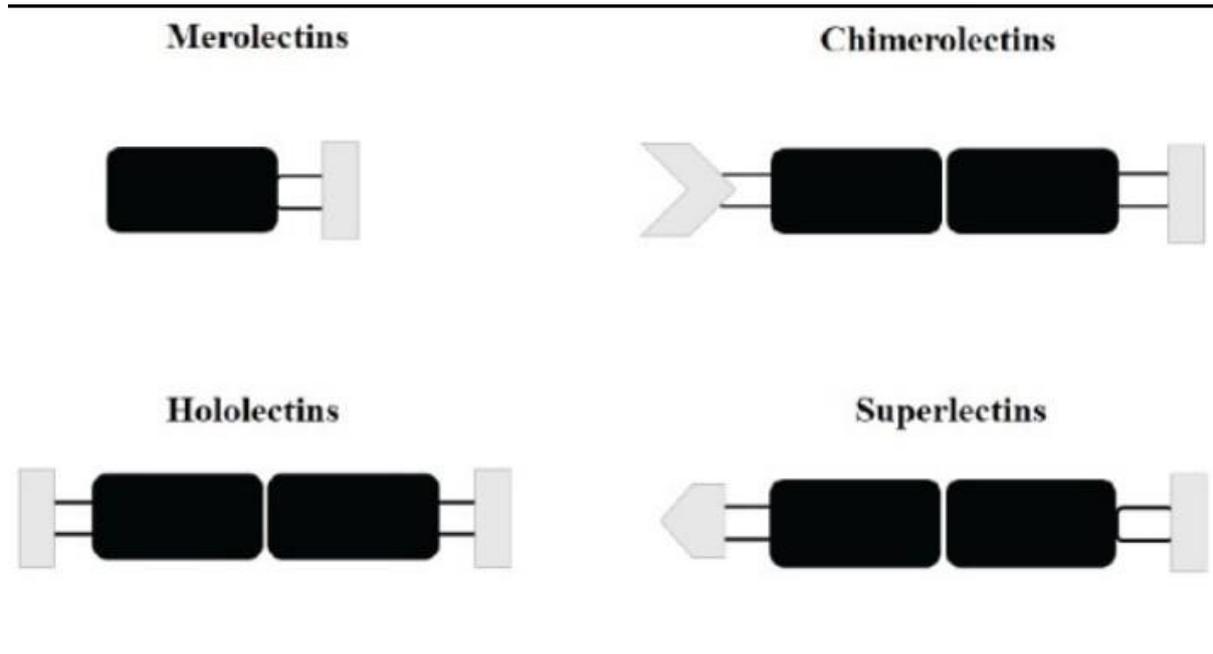


Figure 6: Classification des lectines par structure (Araujo *et al.*,2020).

Chez les animaux

Il y a 4 principes types :

- **Les C-lectines** : sont une superfamille de plus de 1000 espèces protéines identifiées par la présence d'un ou plusieurs domaines distincts de type C (CTLD). Nommé à l'origine pour sa capacité à lier de manière dépendante du Ca^{2+} en préservant les glucides et résidus au centre.(gordon D.Brown *et al.*,2018.)
- **Les P-lectines** : les lectines de type P jouent un rôle important dans la génération de lysosomes fonctionnels dans les cellules réelles du noyau supérieur en dirigeant les enzymes lysosomiques nouvellement installées qui portent le signal 6-phosphate de Manose (M6P) à l'état des particules.(Nancy M Dahms *et al.*,2002).
- **Les S-lectines (Galectines)** : représentent un groupe de protéines qui lient les glycoconjugué contenant β -galactosyl et partagent une symétrie structurelle de base dans la CRD, sont des protéines solubles sécrétées par des voies inhabituelles et semblent nécessiter des conditions réduites pour maintenir l'activité en l'absence de liaison. Certains membres de la famille Gallo lecten peuvent favoriser l'adhésion cellulaire, tandis que d'autres ont de fortes activités biologique, comme la capacité d'induire l'apoptose et les changements métaboliques, comme l'activation et la division cellulaire.(varki A *et al.*, 1999).

▪ **Les I-lectine** : sont définies comme des protéines de liaison aux glucanes (à l'exception des anticorps et des récepteurs des lymphocytes T) dans lesquelles le domaine de liaison est homologue à la grande famille des immunoglobulines (IgSF) des protéines. **(Takashi Angata *et al.*, 2022).**

1.7. L'immunomodulation et lectines

Le système immunitaire est un ensemble de cellule et de facteurs qui assurent sa fonction dans les organismes vivants, s'appelle l'immunité. **(Moulin., 1996).** L'immunomodulation est un processus qui altéré le système immunitaire d'un organisme en interfèrent avec ses fonctions. Les résultats de cette interférence peuvent produire soit un effet immunostimulant qui assure l'amélioration des réactions immunes en impliquant la stimulation du système spécifiques et/ou non spécifiques. **(Neha et Mishra., 2011).** De nombreuses lectines exercent une activité immnomodulatrice en interagissant avec des fragments glycanes à la surface des cellules immunitaires. Cette interaction peut transmettre des signaux, produire certaines cytokines et stimuler une réponse immunitaire efficace contre une tumeur ou une infection microbienne. Par conséquent, les lectines immunomodulatrices ont des applications pharmacologiques potentielles, ou elles peuvent aider à identifier des cibles de sucre pour nouvelles stratégies thérapeutiques (**Souza MA *et al.* , 2013).**

2. L'intérêt des lectines pour l'homme

- Les lectines peuvent interagir avec les systèmes biologiques et développer la diversité, ses évènements et ses fonctions dans les organismes. Ces interactions ont beaucoup importance en raison de leur implication dans les processus pathologique et biologique. **(Lis and Sharon 1998).**
- En raison de leur spécificité, les lectines immobilisées sur la colonne peuvent être utilisées pour l'indentification, la purification et la caractérisation des glycoconjugués. **(Hirabayashi 2004).**
- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains **(Boyd and Shapleigh 1954).**
- Certaines lectines purifiées à partir de grain de légumineuses tropicales ont propriété anti – inflammatoires. **(Alencar *et al.*, 2005).**
- Utilisation de certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins, en tant que marqueurs histochimiques, car certaines maladies telles que le cancer et modification des glycanes présents sur les cellules. **(Guillot *et al.*, 2004).**

CHAPITRE II
GÉNÉRALITÉ SUR
LES PLANTES

1. Généralité sur *morus alba*

Morus alba linn, également connues sous le nom de baies blanches, appartient aux Moracées. Est un arbre feuillu qui pousse dans divers pays tropicaux, subtropicaux et modérés, y compris la Chine, le Japon, la Corée, la Thaïlande, l'Inde, le Vietnam, le Brésil, l'Afrique, etc (Chen C *et al.*,2021)...

1. Position systématique

Tableau 02 : Classification systématique du *morus alba l*
(<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/M%C3%BBrier-blanc>).

Régne	<i>Plantae</i>
Sous-régne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Hamamelidea</i>
Ordre	<i>Hrticales</i>
Famille	<i>Moraceae</i>
Genre	<i>Morus</i>
Espec	<i>morus alba linn</i>



photo 01 : *Morus alba L*

2. L'utilisation médicinale

Le fruit du murier a été traditionnellement utilisé comme analgésique, anthelminthique, antibactérien, antirhumatismal, diurétique, hypotenseur, laxatif, et stimulant sanguin. Certaines parties de la plante ont été utilisées comme agents de refroidissement sédatifs, diurétiques, toniques et astringents pour traiter les troubles nerveux. (Gaber El-Saber Batiha *et al.*, 2023). *Morus alba L* est utilisé pour gérer la glycémie chez les personnes diabétiques. (Jeong HI, *et al.*, 2022). Les feuilles de *Morus alba L* possèdent diverses activités biologiques, y compris les antioxydants, les antimicrobiens, les antidiabétiques, le blanchiment de la peau, l'inhibition de la glucosidase, les antiseptiques, les artères, l'obésité, et le blanchiment de la peau. (Eric Wei-Chiang Chan *et al.*, 2016).

2. Généralité sur *Amanita virosa*

Ces champignons appartiennent à Phylum Fungi, de classe basidiomycète, ordre Agaricaceae et Amanitaceae. Le nom "amanita" dérive de grec, signifiant champignons, "virusa" de mot latin virusus, signifiant "toxique". Peut-être le nom commun de détruire l'ange ou ange de la mort de référé à *A. virosu*, un blanc pur comme le voile d'un ange, qui est spectaculairement belle mais mortelle. Il est appelé "Amanite vireuse" ou "Ange de la mort" en français et "Amanita maloliente" ou "Oronja chepuda" en espagnol. Le blanc pur ange naufragé a une fissure feuilletée (jambe) surmontée d'un couvercle de prière blanc. Ils sont généralement légèrement ennuyeux (avec un renflement central large ressemblant à une tête pointue), et sont collants, brillants, doux et sans résidu de boucle (verruves) ; collant quand il est mouillé. Sous la couverture de branchies blanches pures. Occupé, mais libre. Les taches sont visiblement feuilletées avec des tresses de coton mou hirsute (Bonnet *et al.*, 2004). Des rapports récents ont montré qu'*A. virosa* est le plus répandu type d'amanties en iran, conformément aux rapports sur l'Asie de l'Est pays européens (Tavassoli *et al.*, 2019).

1. Position systématique

Tableau 03 : classification systématique du *Amanita virosa*.

<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Amanite-vireuse>.

Régné	<i>Fungi</i>
Division	<i>Basidiomycota</i>
Classe	<i>Agaricomycetes</i>
Sous-Classe	<i>Agaricomycetide</i>
Ordre	<i>Agaricales</i>
Famille	<i>Amanitaceae</i>

<i>Genre</i>	<i>Amanita</i>
<i>Espèce</i>	<i>amanita virosa</i>



Figure 07: *Amanita virosa*

2. La toxicité ou intérêt culinaire

Cette espèce est mortelle, il confuse avec des espèces comestibles, entraîne de nombreuses intoxications mortelles. Après ingestion, elle va lentement détruire le foie du consommateur, inexorablement. Les symptômes apparaissent généralement 6 à 24h après la consommation, les anatoxines présentes dans le champignon conduisent à une insuffisance hépatique et une insuffisance rénale. (<https://www.aujardin.info/champignons/amanita-virosa.php>)

CHAPITRE III

LE SYSTÈME

SANGUIN

1. Historique

En 1900, le médecin Autrichien Karl Landsteiner (1868-1943) démontre que les sangs humains ne sont pas tous similaires ni tous compatibles entre eux, et 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, Il a identifié 3 groupes : A, B et O (H) (**Kyle R.A. et al., 2001**). En 1908, **Adriano Sturli (1873-1966)** et **Alfred Von Decastello (1872-1960)**, ces deux jeunes collaborateurs de **Landsteiner**, identifient le quatrième groupe sanguin : AB. En 1924, **Bernstein** démontre que les groupes sanguins constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de Mendel. En 1940, **Landsteiner, Phillip Levine (1907-1976)** et **Alexander Wiener (1907-1987)** identifié un autre antigène important des globules rouges est le facteur du rhésus RH (**Aymard J.P.,2012**).

2. Le système ABO

Le système de groupe sanguin ABO se définit par la présence d'antigène A et/ou B à la surface des globules rouges qui est sous la dépendance de trois allèles (A, B et O) situés sur un même locus chromosomique. Les gènes A et B sont « dominants », ils s'expriment au niveau du phénotype. L'allèle O est « récessif » par rapport aux allèles A et B. Et par la présence d'anticorps Anti-A et/ou Anti-B naturels réguliers dans le plasma. (**Janot C et al., 2002**). La présence d'un antigène sur les globules rouges exclut sa présence dans le plasma de qui lui correspond. (**Ramè et Naccache, 2001**).

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

Tableau 04 : groupes sanguins du système abo (**Janot C et al., 2002**).

Groupe sanguin	Antigène sur la globule rouge	Anticorps du plasma
A	A	B
B	B	A
AB	A et B	Ni A, ni B
O	Ni A, ni B	A et B

3. Facteur Rh

Le rhésus est un antigène situé au niveau de la paroi des hématies. Les antigènes de système Rh sont aussi importants que ceux de système ABO. Il fait partie dans la détermination des groupes sanguins des individus. Celle-ci permet de déterminer deux systèmes de groupes sanguins différents: le rhésus positif (Rh+) chez les personnes qui possèdent cet antigène ce qui concerne la majeure partie de la population, et le rhésus négatif (Rh-) chez les personnes qui ne l'en possèdent pas (**Hordé P., 2015**). Ce facteur Rh est notamment utile pour savoir si une transfusion sanguine est possible entre deux personnes.

4. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO

Les antigènes du système ABO sont issus d'une famille des glycolipides présents à la surface des érythrocytes. Leur structure de base est constituée de lipide céramide auquel est fixé un oligosaccharide composé d'un glucose (Glu), d'un galactose (Gal), d'une N-acétylgalactosamine (Gal Nac) et d'une Fucose (Fuc). Les sujets du groupe O ne produisent que ce glycolipide. Les sujets du groupe A ont un enzyme qui ajoute une molécule de N-acétyl-galactosamine à la chaîne oligosaccharidique pour former l'antigène A, alors que les sujets du groupe B ont une enzyme qui ajoute une molécule de galactose pour former l'antigène B. Les globules rouges des sujets du groupe AB expriment en plus la structure de base dépourvue des glucides terminaux, (Parham, 2000).

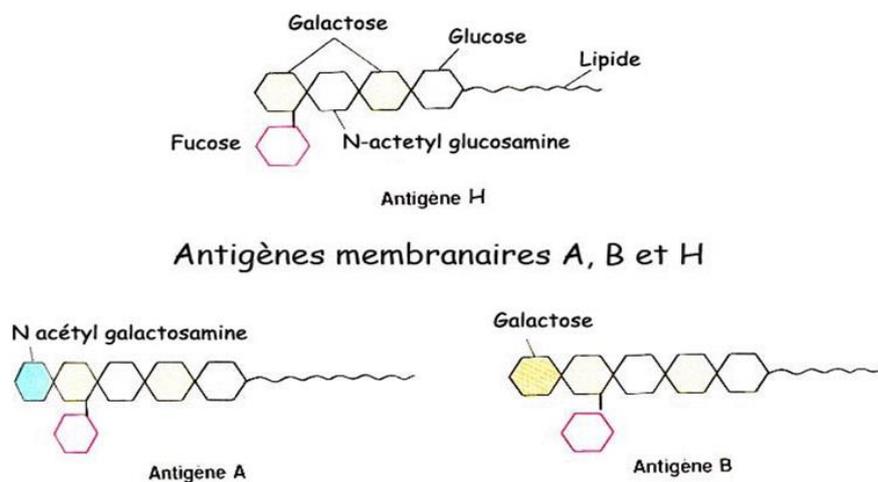


Figure 08: Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO, (**Naoum, 2022**).

5. Lectines spécifiques des groupes sanguins

Plusieurs lectines agglutinent les hématies par fois avec une spécificité de groupe sanguin (Bird, 1974).

La spécificité des lectines aux groupes sanguins est présentée dans le tableau 05 :

Tableau 05 : Les xemples des lectines spécifiques des groupes sanguins.

Groupe spécifié	lectine	Référence
A	<i>Vicia villosa</i>	Richard, 1998
	<i>Clitocybe nebularis</i>	Sabotič J., 2019
B	<i>Nelumbo vucifea</i>	Goker et al., 2008
	<i>Phaseolus limensis</i>	Richard, 1998
	<i>Bandereira simplicifolia-I</i>	
A et B	<i>Sophora japonica</i>	Richard, 1998
O	<i>Anguilla anguilla</i>	Ito N. et al., 1990
	<i>Lotus tetragonolobus</i>	

MATÉRIELS ET METHODE

1. Matériels

1.1. Matériels végétales

La collecte de nos échantillons (les racines des *morus alba L*, *juglans regia* et *prunus dulcis* et le champignon *amanita virosa*) a été effectuée au niveau de nos jardins (de binôme) a wilaya de Mila, de la fin de mois de février jusqu'au 16 mars 2023.



Racines de *Morus alba L*



Champignon *Amanita virosa*



Racines de *Juglans regia*



Racines *prunus dulcis*

1.2. Matériels biologiques

Notre étude a été portée sur les hématies du lapin prélevées du lapin au niveau de l'animalerie de Chaabat Ersas de l'université frères Mentouri Constantine-1, et les hématies humaines prélevées chez des donneurs du sang au niveau de laboratoire.

1.3. Matériels animale

Afin d'évaluer l'activité immunomodulatrice éventuelle de nos extraits, nous avons utilisé un groupe de 25 souris mâles appartenant à la race Albinos, espèce *Mus musculus* et ayant un poids moyen d'environ 20 g en provenance de l'animalerie de Chaabat Ersas de l'université frères Mentouri Constantine-1.

2. Les méthodes

2.1.L'étude phytochimique

2.1.1. La préparation de différents échantillons

❖ Séchage

Les échantillons *Morus alba L*, *Juglans regia*, *Prunus dulcis* et *Amanita virosa* ont été séchées à température ambiante pendant cinq jours.

❖ Broyage

Les échantillons séchés ont été coupés après ils sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière a été conservée dans un emballage en verre bien clos.

❖ Extraction

➤ Le principe

Cette opération a été réalisée afin de récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de chaque échantillon à l'aide de l'eau distillée.

➤ La technique d'extraction

30 ml l'eau distillé a été ajouté à 9 g de poudre de chaque échantillon, l'ensemble est agité manuellement. Enfin la macération de les poudres des racine dans l'eau distillée pendant trois jours au réfrigérateur.



photo 02: Résultats du macération des poudres des échantillons pendant trois jours à 4°C.

Après 3 jours la solution a été filtré par papier Whatman, puis le filtrat a été centrifugé à 4000tr/min pendant 15 min dans une température ambiante. Le surnageant a été récupéré et conservé au frais. Ce surnageant formé, représente l'extrait brut qui a servi pour réaliser le test d'hémagglutination.

2.1.2. La préparation d'une suspension d'hématies du lapin et humaine à 4%

Les hématies du lapin et humaine ont été utilisées pour mettre en évidence la présence des lectines dans les extraits bruts des échantillons collectés. Les hématies collectées ont été débarrassées de

sérum et du plasma. Pour cela, elles ont été soumises à un lavage puis à une dilution. Les hématies ont été mises en suspension à 4% pour l'emploi.

➤ **Lavage des hématies**

Le sang a été recueilli dans des tubes héparines de 4 ml, puis il a été centrifugé à 3000 trs/min pendant 6min. Le culot obtenu a été lavé avec une solution du NaCl 0,9% (**annexe 01**) trois fois suivi d'une centrifugation après chaque lavage jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair.

➤ **Dilution des hématies**

Le culot contenant les hématies a été dilué par une solution du NaCl 0.9%, à 1 ml d'hématies 24 ml du NaCl 0.9% ont été ajoutés afin d'obtenir des hématies à 4%.

2.1.3. Test d'hémagglutination

La mesure de l'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation . Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. Ce test repose sur l'observation de l'agglutination des hématies par les lectines à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse (**Goldstein et al., 1980**), Les résultats ont été comparés par rapport à un témoin négatif (50 µl des hématies du lapin à 4% ajouté à 50 µl de l'eau distillée). L'activité hémagglutinante des extraits bruts des échantillons a été réalisée dans des microplaques. A l'aide d'une micropipette, nous avons placé 50µl d'extrait brut de chaque échantillon dans des puits différents tout en ajoutant 50 µl d'hématies du lapin à 4%. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la lecture de l'activité agglutinante est observée à l'œil nu selon **Correia et Coelho (1995)**. Les résultats ont été comparés par rapport à un témoin négatif (50 µl d'hématies fixées du lapin à 4% ajouté à 50 µl de l'eau distillée).

2.1.4. Test limite d'agglutination de l'extrait brut des échantillons

Ce test repose sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimale de lectine montrant une activité évidente.

Prenant une ligne de la microplaque pour chaque échantillon et en suivant le même protocole, nous avons déposé en premier 50µl de l'eau distillée dans chaque puits. Ensuite, nous avons ajouté 50µl d'extrait brut uniquement au premier puits, puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants, sachant que 50µl ont été jetés du dernier puits pour respecter les taux de dilutions et garder les mêmes volumes dans chaque puits. Enfin, nous avons ajouté 50µl de la suspension d'érythrocytes du lapin à 4% à chaque puits, selon (**Sano K. et Ogawa H., 2014**).

L'observation de la limite d'agglutination a été effectuée à l'œil après 30 min d'incubation à une température ambiante.

2.2.L'étude des caractéristiques des extraits de lectines

2.2.1. Test d'inhibition d'agglutination par les glucides et les glycoprotéines

➤ Test d'agglutination

Ce test sert à démontrer la capacité de la lectine de l'extrait brut de chaque échantillon à se lier à différents sucres, et donc la capacité de ces derniers à inhiber l'agglutination des hématies du lapin. Sept glucides ont été testés : D-glucose, D-maltose, D-cellobiose et D-saccharose, D-mannose, D-lactose, D-galactose et une glycoprotéine : BSA.

Tous ces glucides ont été testés à une concentration de 400 mM dissous dans 1 ml de l'eau distillée (**Annexe 02**) et la concentration du BSA a été 0.1 g dans 1 ml de l'eau distillée. La durée d'exposition a été de 60 min. Après l'exposition, nous avons testé l'activité agglutinante des deux extraits en suivant les étapes suivantes : en prenant un puits pour chaque extrait, nous avons déposé 25 µl d'extrait brut dans chaque puits, puis nous avons ajouté 25 µl de chaque sucre, le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante, afin de permettre aux lectines de reconnaître leurs sucres spécifiques. Enfin, nous avons ajouté 50 µl d'hématies du lapin dans chaque puits. Après 1 h d'exposition, les résultats des extraits sont observés à l'œil nu.

➤ Test limite d'inhibition d'agglutination par les glucides

Le test a été effectué par la méthode de double dilution pour montrer la concentration minimale inhibitrice des sucres spécifiques sur la lectine de chaque échantillon. Dans chaque puits, 25 µl de l'eau distillée ont été déposés. Ensuite, 25 µl d'inhibiteur ont été déposés dans le premier puits seulement puis une double dilution en série a été réalisée jusqu'au douzième puits (25 µl ont été jetés du dernier puits). Après, 25 µl d'extrait brut ont été ajoutés à chaque puits. L'incubation du mélange a été effectuée à température ambiante pendant 30 min. Finalement, 50 µl des hématies du lapin à 4% ont été ajoutés à chaque puits. La lecture du résultat a été faite à l'œil nu après une heure du temps.

2.2.2. L'effet des métaux (oligoéléments) sur l'activité d'agglutination

Sept métaux ont été testés : Chlorure de Fer, Chlorure de Magnésium, Acétate de Plomb, Chlorure de Zinc, Chlorure de Potassium, Chlorure de Calcium et Chlorure de Cuivre. Tous ces oligoéléments ont été testés à une concentration de 0.1 g de chaque métal dans 1 ml de l'eau distillée (**Annexe 03**) avec agitation au vortex. La durée d'exposition a été de 60 min. Après une heure de temps, nous avons testé l'activité agglutinante des extraits en suivant les étapes suivantes : on prenant 1 puits pour chaque extrait, nous avons déposé 25 µl d'extrait brut dans chaque puits, puis nous y avons ajouté 25 µl de chaque métal, le mélange a été incubé pendant 30 min à

température ambiante. Enfin 50 µl des hématies de lapin sont ajoutés au mélange, la lecture a été faite à l'œil nu après 1h d'incubation.

2.2.3. Le test d'agglutination avec les hématies humaines ABO

Dans une microplaque, 50 µl d'extrait brut de chaque échantillon ont été déposés dans chaque puits, suivis d'un dépôt de 50 µl des hématies à 4% de chaque groupe sanguin humain préparé auparavant. Après 60 min d'exposition à température ambiante. La lecture a été faite à l'œil nu.

2.2.4. L'effet de température sur l'activité agglutinante

Les aliquotes de l'extrait brut des échantillons ont été versées dans 2 tubes secs en verre que nous les avons étiquetés, puis nous avons incubé ces derniers à des degrés différents de température (40, 60, 80 et 100°C) dans un bain marie durant 1h du temps (**Singh et al.,2013**). Après une heure, les extraits bruts chauffés ont été refroidis à température ambiante. Enfin, nous avons testé l'activité agglutinante pour chaque température en suivant le même principe que le test d'hémagglutination.

2.2.5. L'effet du pH sur l'hémagglutination

Dans 12 tubes à essai, une petite quantité de poudre de nos échantillons contenant chacun 4ml de tampon (**Annexe 04**) à différentes valeurs du pH de 1 à 12.

Après 24 h d'incubation à 4 °C, le test d'hémagglutination a été effectuée sur le surnageant, chacun d'entre eux en suivant le même processus précédent (celui de la température).

Les résultats ont été toujours comparés par rapport à un témoin négatif.

2.2.6. Purification partielle des lectines par chromatographie sur colonne:

➤ Le principe

Il s'agit ici une séparation des protéines selon leur taille en utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine consistant en billes creuses et poreuses. Les plus grosses protéines, celles qui passent carrément entre les billes, sortent en premier de la colonne. Les autres sont retardées par leurs interactions avec les billes, les plus petites protéines, qui peuvent entrer et sortir à leur guise, sont les dernières à quitter la colonne.

➤ La Préparation de la colonne

4 g de poudre du gel Sephadex G75 ont été mises en suspension dans 100 ml du tampon PBS (0,1 M, pH 7.4). Ce mélange a été d'abord dégazé sous vide pour éviter les bulles d'air. Ensuite, on a passé à l'hydratation du gel qui a été réalisée pendant 48h à froid (4°C). Puis, nous l'avons coulé dans une colonne (2.5 cm de diamètre et une hauteur de 40 cm), le lavage du gel a été fait

avec 240 ml, soit six fois le volume de la colonne par l'eau distillé. La stabilisation et l'équilibrage de la colonne ont été réalisés à température ambiante pendant 48h.

➤ **Séparations des lectines à partir des extraits:**

Au début nous avons filtré l'extrait brut de chaque échantillon, soit 2 ml pour chacun, en utilisant un filtre à seringue 0.25 mm, puis nous les avons versés lentement dans la colonne, puis des fractions de 4 ml ont été recueillies après l'élution avec l'eau distillée dans des tubes secs en verre de 5 ml, qui ont été placés respectivement dans un portoir.

2.2.7. Dosage des protéines

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

2.2.8. Lyophilisation

Il s'agit d'une technologie de séchage sous vide à basse température, conversion de l'extrait liquide primaire en poudre, une certaine quantité d'extrait est d'abord congelée puis placée dans un lyophilisateur. Cette étape est réalisée pour le test immunologique.

2.3.Le test biologique

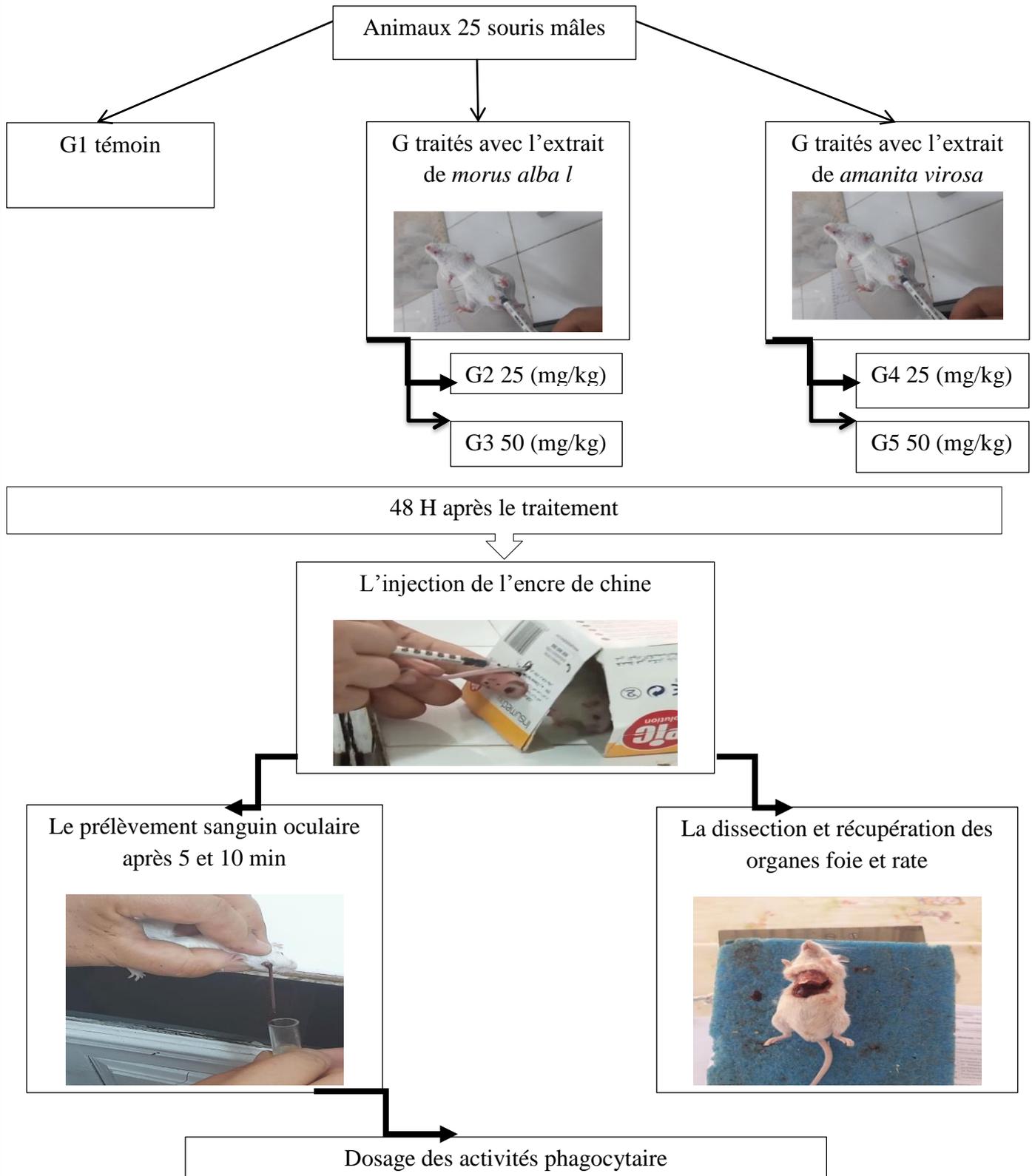


Figure 09 : Plan expérimental suivi dans l'évaluation du potentiel immunomodulateur de la lectine des extraits du *Morus alba L* et *Amanita virosa* in vivo.

L'élevage a été effectué dans une cage en plastique qui est tapissée d'une litière constituée de copeaux de bois. La cage a été nettoyée et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les souris ont libre accès à l'eau et à la nourriture qui consiste à un aliment sous forme de croquettes utilisé pour l'élevage (**Annexe 1**). Les souris ont été soumises à une période d'adaptation environ sept jours avant l'expérience.



Photo 04: Les souris utilisés pour le test.

2.3.1. Répartition des groupes

Pour notre étude, nous avons regroupé les souris en 5 groupes, chacun des groupes comprenant 5 souris et marquées par des couleurs permanents.

2.3.2. L'injection du traitement

L'injection du traitement a été effectuée aux souris par voie intrapéritoniale

2.3.3. L'injection de carbone

48h après le traitement, la solution de carbone (annexe) a été injectée aux animaux par voie intraveineuse (veine caudale) en vue de tester le pouvoir de phagocytose et aussi la clairance de cette substance. L'injection dans la veine caudale a été à raison de 0,1 ml/10g du poids de l'animal.

2.3.4. Le prélèvement sanguin et la lecture d'absorbance

Deux prélèvements sanguins par voie oculaire après 5 et 10 min après l'injection de la solution de carbone. Le sang est collecté à l'aide des tubes capillaires dans des tubes secs contenant du Na₂CO₃ (1%) à raison de 10 gouttes de sang dans 4 ml de Na₂CO₃ (1%) dans chaque tube. La lecture de l'absorbance des différents tubes est effectuée dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 675 nm .

2.3.5. Le prélèvement des organes

Après le dernier prélèvement, nous avons anesthésié les souris à l'aide du chloroforme pour faire la dissection. Après, les organes actifs (foie et rate) sont prélevés et pesés immédiatement.

2.3.6. L'activité phagocytaire

L'activité phagocytaire a été exprimée par l'index phagocytaire K, lequel mesure l'ensemble de la fonction réticulo-endothéliale au contact du sang, et par l'index phagocytaire α corrigé qui exprime cette activité par unité de poids des organes actifs : foie et rate. Le taux de clairance est exprimé en demi-vie du carbone dans le sang ($t_{1/2}$, min). Les activités sont calculées d'après les formules de (Satnam et al., 2012; Biozzi et al., 1953). Selon les équations suivantes :

$$K = \frac{\ln OD1 - \ln OD2}{(t2 - t1)}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,963}{K}$$

$$\alpha = \frac{\sqrt{K3 \times \text{body weight}}}{\text{liver weight} + \text{spleen weight}}$$

Où OD1 et OD2 sont les densités optiques mesurées après 5 et 10min respectivement

2.3.7. L'analyse statistique

Les résultats de l'activité phagocytaire et le taux de clearance de carbone sont présentés sous forme de moyennes et écart-types.

La différence statistique entre cinq groupes a été réalisée par le test One-Way ANOVA. Cette différence est considérée selon le risque d'erreur (p) comme :

- Non significative si $p > 0,05$.
- * Significative si $0,05 > p > 0,01$.
- ** Hautement significative si $0,01 > p > 0,001$.
- *** Très hautement significative si $p < 0,001$.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. L'étude phytochimique

1.1. Le test d'hémagglutination

Les résultats de test d'agglutination des lectines avec les extraits brutes des racines des plantes ont été présentés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Activité d'hémagglutinante des échantillons testés.

Echantillon		Activité d'agglutinante
<i>Amanita virosa</i>		+++
<i>Juglans regia</i>		-
<i>Aorus alba L</i>		++
<i>Prunus dulcis</i>		-
Témoin négatif		-

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

L'extrait de *Amanita virosa* montre une très forte agglutination (+++) vis-à-vis les hématies du lapin (tableau 06) ce qui prouve la présence des lectines ayant reconnu la partie glycosylée des membranes des érythrocytes du lapin marquant que l'extrait de *Amanita virosa* réagit avec ces dernières, ce résultat est pareil que ceux des lectines extraites des racines des plantes de *Moringa G* Et *Moringa M* et qui ont montré autant de très fortes agglutinations lors de l'addition des hématies de lapin (Necib *et al.*, 2014), et le *Morus alb L* montre une forte agglutination(++) (tableau 06) vis-à-vis les hématies du lapin. Ces résultats positifs indiquent qu'elles contiennent évidemment des substances à activité agglutinante sur les hématies.

Par contre, les extraits du *Juglans regia* et de *Prunus dulcis* montrent une absence d'agglutination(-) (tableau 06), ce qui prouve que ces espèces ne contiennent pas de lectines.

Pour la suite de notre travail, nous avons retenu deux espèces *amanita virosa* et *morus alba L* car ils ont montré une forte agglutination.

1.2. Le test de limite d'agglutination de l'extrait du *amanita virosa* et du *Morus alba L*:

La limite d'agglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une agglutination. Le tableau 07 montre les résultats obtenus à la fin des tests des limites d'agglutination.

Tableau 07 : L'Activité de la limite d'agglutination des extraits des *Amanita virosa* et *Morus alba*.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/254	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Extrait												
<i>amanita virosa</i>	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
												
<i>morus albaL</i>	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
												
Témoin												

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination

L'activité hémagglutinante des extraits de *amanita virosa* a été de 1 :64 , (tableau 07) montre une très forte agglutination lors de sa dilution au niveau des 1 er et 2 éme puits alors qu'elle diminue au niveau des 4 puits qui suivent (3éme jusqu'à 6éme) puits et disparaît complètement au niveau des puits 7 jusqu'à 12. *Terfezia bouderei* a montré une forte agglutination allant jusqu'au 7éme puits, (**Zitouni et al., 2015**). Et l'activité hémagglutinante des extraits des *Morus alba L* a été 1 :64 , le tableau 07 montre une très forte agglutination lors de sa dilution au niveau des 1 er et 2 éme puits alors qu'elle diminue au niveau du 3 éme puit jusqu'à 6 éme puits et disparaît complètement au niveau des puits 7 jusqu'à 12 (tableau 07), par contre dans une autre étude réalisée sur la lectine

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

2. Les caractéristiques d'extrait de lectine du *Amanita virosa* et du *Morus alba L*

2.1.L'effet de température sur l'activité agglutinante

Les extraits de nos lectines ont subi un traitement thermique pendant 1H à différentes températures 40, 60, 80, et 100°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 08.

Tableau 08: Effet de la température sur l'activité agglutinante de l'extrait du *Amanita virosa* et du *Morus alba*.

T (°C)	40	60	80	100
Extrait				
<i>Amanita virosa</i>	+++	+++	+++	++
<i>Morus alba L</i>	+++	+++	++	+
Témon				

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible hagglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

Le traitement thermique des extraits bruts des *Amanita virosa* et *Morus alba L* à différente température 40°, 60°, 80°,100° C pendant 1 heure de temps, n'est pas suffisant pour inactiver totalement l'activité d'hémagglutinante. Donc ces lectines présentent une forte résistance à haute température (thermorésistante). Les racines de *Morus alba L* garde son activité d'agglutination jusqu'à 60°C, mais à 80° l'activité est réduite, passe de (+++) à (++) (tableau 08), a 100° leur

activité d'hémagglutinante devient significativement réduite (+). Ce résultat est identique à celui de la lectine extraite du *Holothuria scabra* qui conserve son activité agglutinante jusqu'à 80°C après son incubation pendant 1h (Gowda N.M *et al.*,2008).

Le traitement thermique de l'extrait du *Amanita virosa* montre qu'il garde son pouvoir agglutinant (très forte agglutination) jusqu'à 80°C (tableau 08) mais à 100°C l'activité est réduite passe de (+++) à (++) (tableau 08). La température 100°C n'était pas suffisante pour inactiver totalement l'activité agglutinante de cet extrait, donc la lectine de cette espèce est aussi thermorésistante dont son activité peut arriver jusqu'au troisième puits, ce résultat est pareil à celui de *Pterocladia capillacea* qui conserve son activité jusqu'à 100°C (Necib *et al.*, 2015).

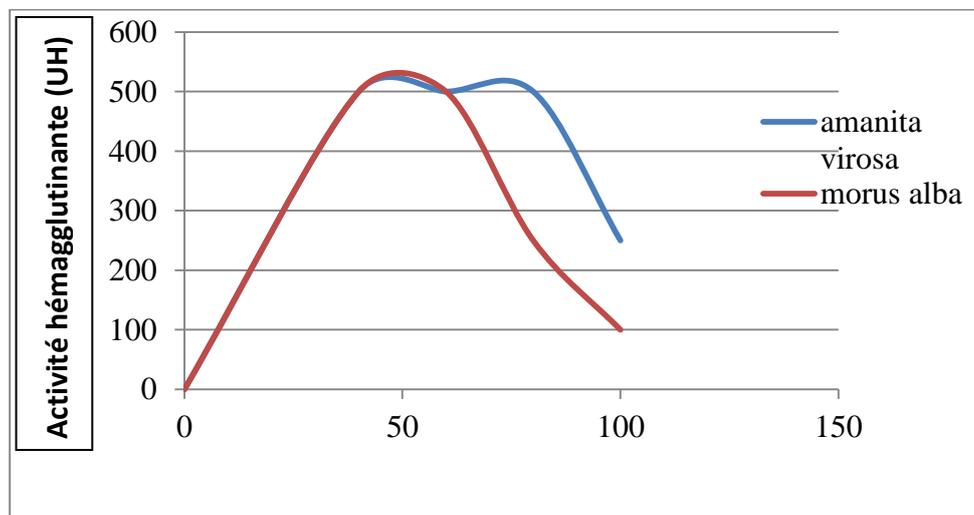


Figure 10: Détermination de la température optimale de l'extrait de *Amanita virosa* et *Morus alba* L.

2.2. Le test d'inhibition de l'activité agglutinante

➤ Test d'inhibition par les glucides

Le test d'inhibition a été effectué avec certains sucres simples (glucose, cellobiose, maltose, saccharose, mannose, lactose, galactose) pour déterminer la spécificité des extraits en sucre.

L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que les hématies, les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau 09.

Tableau 09: Inhibition de l'activité hémagglutinante du *Amanita virosa* et *Morus alba L* par différents sucres

Extrait Sucre	<i>Amanita virosa</i>		<i>Morus alba L</i>		Témoin Négatif
Maltose	-		-		
Saccharose	-		-		
Cellobiose	-		-		
Glucose	-		-		
Mannose	+		+		
Lactose	+		-		
Galactose	+		-		

+ : Inhibition d'agglutination

- : Absence d'inhibition d'agglutination

L'extrait d'*Amanita virosa* a été spécifiquement inhibé par trois saccharides : Lactose, Mannose et Galactose (tableau 09), ceci dit que ces derniers se sont attachés aux lectines et ont occupé le/les sites actifs (domaines de reconnaissance) censés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, sur ce nos lectines présentent une affinité pour ces sucres. Notre extrait a la même propriété de *Bryopsis plumosapre* qui reconnait précusément le glucose et le galactose (Necib *et al.*, 2015).

L'extrait de *Morus alba L* a été spécifiquement inhibé par le mannose seulement (tableau 09). Cependant, l'activité agglutinante n'était pas inhibée par le Glucose, Galactose, Lactose, Maltose, Saccharose et cellobiose, ce résultat varie avec la lectine purifiée de la tige de la plante *arachide Arachis hypogaea* montre une spécificité pour le cellobiose (Singh R. et Das H.R., 1994).

□ **Test limite d'inhibition d'agglutination de *Amanita virosa* par les glucides**

Tableau 10 : Résultats des tests limites d'inhibition d'agglutination de *Amanita virosa* par le Mannose, Lactose et Galactose.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Sucre												
Manose	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
Galactose	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

Manose

Lactose

Galactose



témoin négatif

photo 5: Résultats du test limite d'inhibition d'agglutination de *Amanita virosa* par les glucides.

On remarque une agglutination qui a lieu au niveau du cinquième puits pour le mannose et le septième pour le lactose (photo 05), donc la concentration minimale capable d'inhiber l'activité est (dilution 1/32) [mannose] = 12.5 g/ml (tableau 10), ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que le mannose présente une faible affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes. Et la concentration minimale capable d'inhiber l'activité est (dilution 1/128) [Lactose] = 3.125 g/ml (tableau 10). Pour le Galactose on remarque une agglutination qui a lieu au niveau du deuxième puits, donc la concentration minimale capable d'inhiber l'activité est (dilution 1/4) [Galactose] = 100 g/ml (tableau 10), qui montrent que le galactose présente une très faible affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes.

□ **Test limite d'inhibition d'agglutination de *Morus alba L* par le manose**

Tableau 11: Résultats de Test limite d'inhibition d'agglutination de *Morus alba L* par le manose.

Dillution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Sucre												
Manose	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+++

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

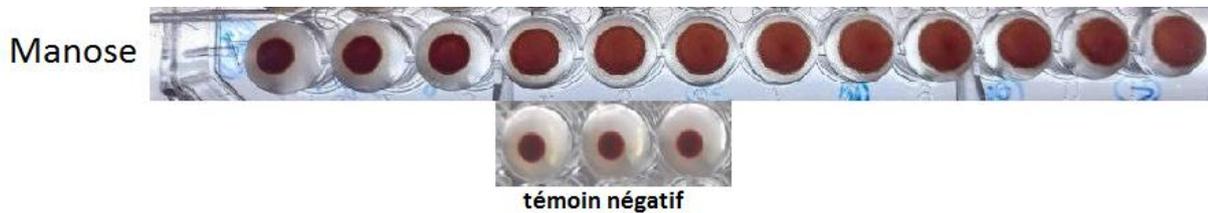


photo 6: Résultat du test limite d'inhibition d'agglutination de *Morus alba L* par le manose.

On remarque une agglutination qui a lieu au niveau du troisième puits pour le mannose (photo 06), donc la concentration minimale capable d'inhiber l'activité est (dilution 1/8) [mannose] = 50g/ml (tableau 11), ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que le glucose présente une faible affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes.

2.3.L'effet d'agglutination sur les hématies humaines ABO

Les résultats d'agglutination des hématies humaines (A, B et O) par l'extrait brut des racines des plantes ont été décrits dans le tableau 12.

Tableau 12: L'agglutination des hématies humaines (A, B et O) par l'extrait brut des *Amanita virosa* et *Morus alba*.

Extrait	<i>Amanita virosa</i>		<i>Morus alba L</i>		Témoin
Groupe sanguin					
A	+++		-		
B	+++		+		
O	+++		+		

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

Les résultats indiquent que la lectine de *Amanita virosa* a donné une très forte agglutination avec toutes les hématies de système ABO (tableau 12), cette poly agglutinabilité est due au fait que la lectine reconnaît le même sucre sur la membrane globulaire du différent groupe sanguin, ce résultat est en accord avec les études réalisées sur *Geotrupes stercorarius* et sur *Diplotaxis assurgens* et *Raphanus sativus* qui ont la même propriété (Devi *et al.*, 2014 ; Deeksha *et al.*, 2015). Nous pouvons alors classer dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, donc cette lectine **non spécifique**.

Lectine de *morus alba L* agglutine faiblement l'hématie de groupe B et O et donne absence d'agglutination avec l'hématie de groupe A seulement (tableau 12) donc nous pouvons classer dans la catégorie des lectines agglutinent les érythrocytes de type B et O, donc cette lectine est **spécifique** (réactif pour le groupage).

2.4.L'effete des métaux (oligoéléments) sur l'activité d'agglutination

Tableau 13: L'effet des métaux sur l'activité agglutinante de l'extrait du *amanita virosa* et du *Morus alba*.

Extrait	<i>Amanita virosa</i>		<i>Morus alba L</i>		Témoin
Métal					
Chlorure de magnésium	+++		+		
Chlorure de potassium	+++		+		
Chlorure de calcium	++		+		
Chlorure de fer	++		+		
Chlorure de Cuivre	++		-		
Acétate de plomb	++		++		
Chlorure de Zinc	+++		++		

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

La lectine de *Morus alba L* présente une inhibition vis-à-vis du (Cu^{2+}) (tableau 13) donc cette lectine est fortement associée à (Cu^{2+}) que les hématies du lapin, par contre les autres métaux qui eux ont présenté une agglutination lors du contact avec l'extrait, donc cette lectine est une **métalloprotéine**. Contrairement à la lectine de *Amanita virosa* qui ne présente aucune inhibition avec les métaux utilisés (tableau 13) avec les métaux utilisés, ce qui fait d'elle une lectine **non-métalloprotéine**. Ce dernier résultat est cohérent avec les études menées sur *Geotrupes Stercorarius* (Devi et al., 2014).

2.5.L'effet de BSA (glycoprotéines) sur l'hémagglutination

Tableau 14:L' effet de BSA sur l'activité agglutinante de l'extrait du *clitocybe nuda* et du *Morus alba*.

Extrait	<i>Amanita virosa</i>	<i>Morus alba</i>
Glycoprotéine		
BSA	++	++
		
Témoin		

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination.

Les résultats obtenus montrent que tous les deux extraits (*Amanita virosa* et *Morus alba*) sont marqués des fortes agglutinations (++) (tableau 14), donc l'activité hémagglutinante n'est pas inhibé par le BSA, ceci veut dire que nos extraits n'ont aucune affinité pour cette glycoprotéine(BSA).

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

Tableau 15: Effet du pH sur l'activité agglutinante de l'extrait du *Amanita virosa* et du *Morus alba L.*

PH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
extrait												
<i>Amanita virosa</i>	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
<i>Morus alb</i>	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

- : Absence d'agglutination.

+ : Faible agglutination.

++ : Forte agglutination.

+++ : Très forte agglutination

Nos résultats ont montré que l'extrait *Amanita virosa* a été remarquablement stable dans la gamme de pH de 3 à 10 (tableau 15), ce qui montre que les degrés variables de 3 à 10 de pH n'affectent pas sur l'activité d'agglutination des lectines *Amanita virosa*, par contre dans le pH de 1, 2, 11 et 12 est tombé assez rapidement à cause des interactions entre les groupements acides et basiques ce qui conduit à la rupture de membrane des érythrocytes et la sortie d'hémoglobine. Cela signifie que le pH favorable pour l'activité de *Amanita virosa* est un pH moyen. L'extrait de *Morus alba* L. contient une forte résistance presque à toute la gamme du pH testée de 2 jusqu'à 12 (tableau 15). L'activité d'héماغglutination des lectines reste très forte et stable dans un intervalle (3 à 12) et faible de (2) et nulle de (1), ces résultats sont presque similaires avec de *Cyperus rotundus* et de *Pterocladia capillacea* qui ont montré que les lectines sont stables au pH [2-12], (Necib *et al*, 2015).

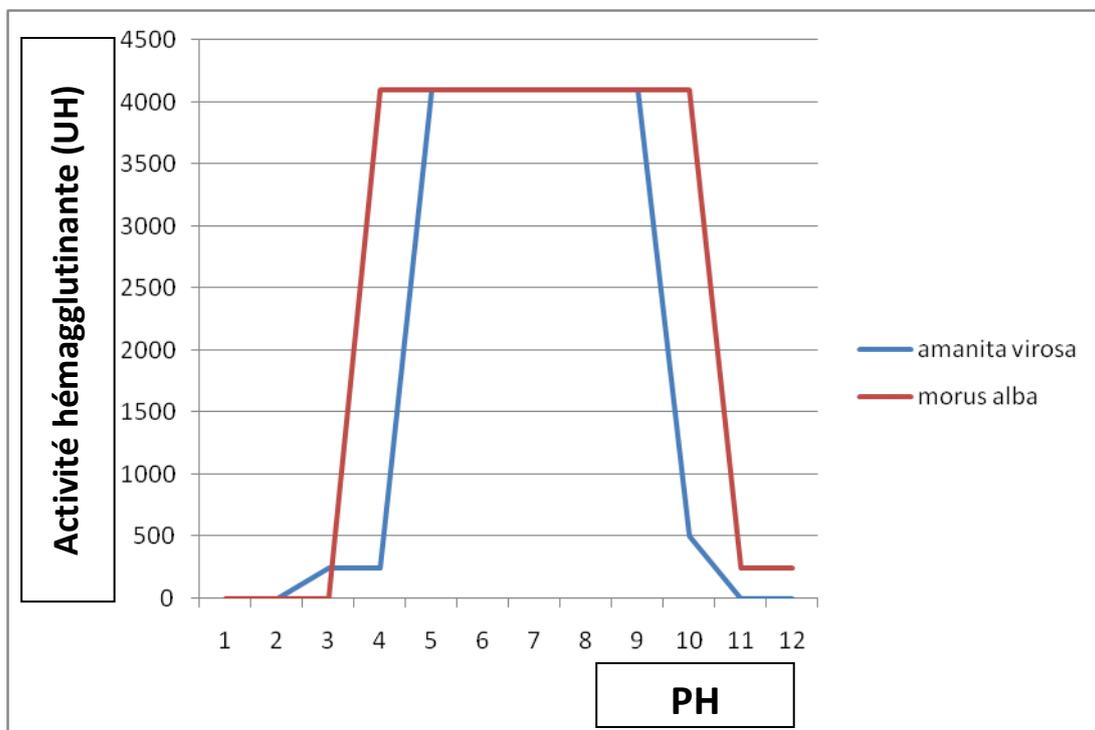


Figure 11: La détermination du pH optimale de l'extrait du *Amanita virosa* et du *Morus alba* L.

2.7.Purification partielle de l'extrait du *Amanita virosa* et du *Morus alba L* par chromatographie sur colonne de séphadex G75

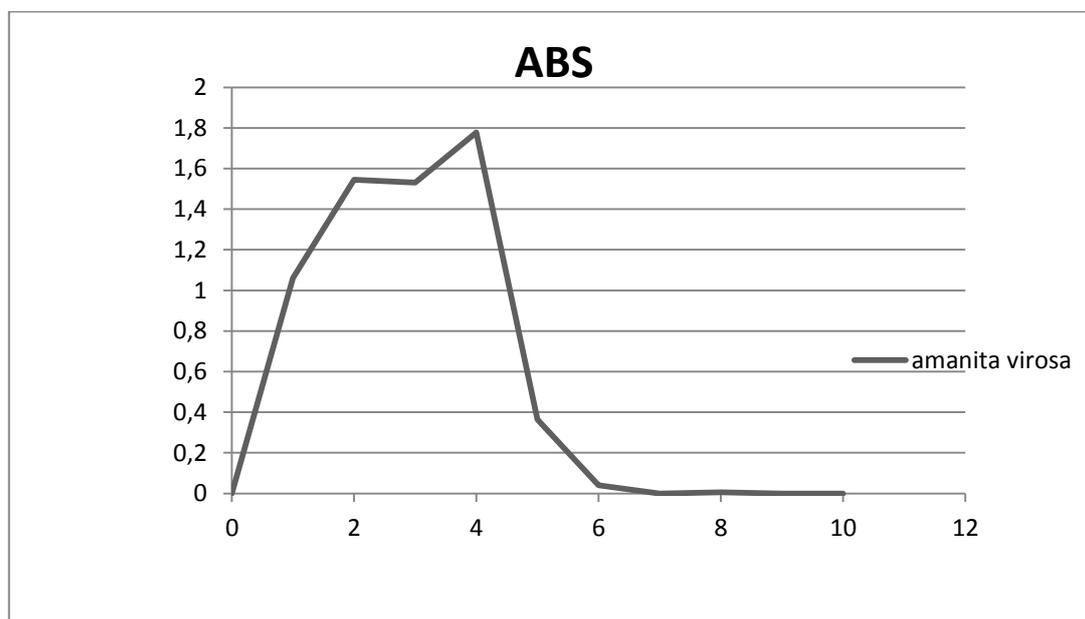


Figure 12: la courbe d'absorbance de l'extrait de de *Amanita virosa* à 200 nm après leur passage a travers la colonne de séphadex G75.

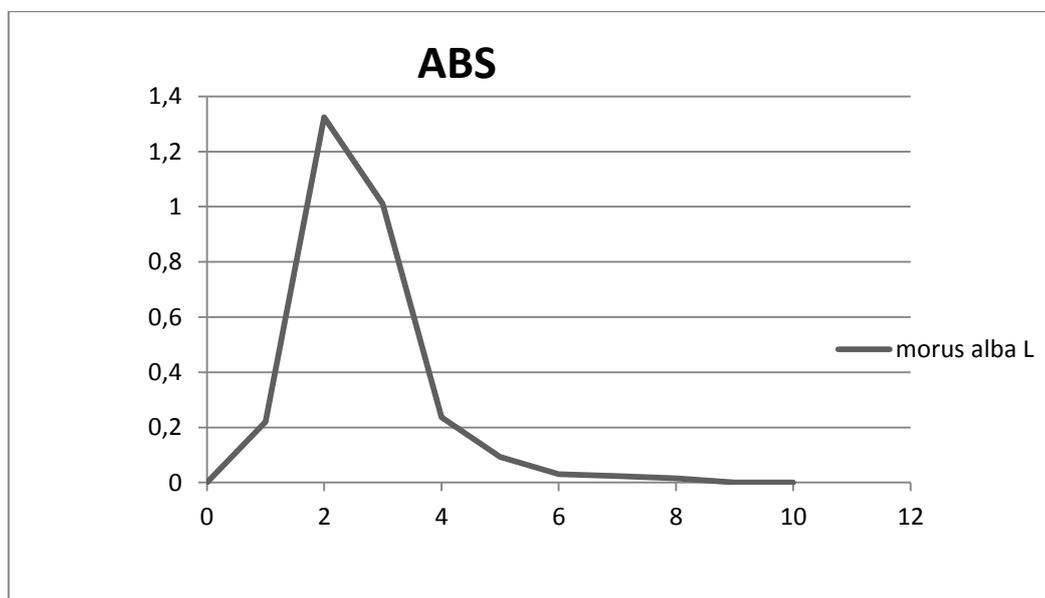


Figure 13: la courbe d'absorbance de l'extrait de de *Morus alba L* à 200 nm après leur passage a travers la colonne de séphadex G75

Le volume de rétention : 4ml.

L'éluant : L'eau distillé.

L'extrait de *Morus alba L* a donné un seul pic dans le 2^{ème} tube (1,325) (figure 13) ce résultat est en accord avec celle des lectines de *Cyperus Rotundus* et *Pistacia Lentiscus* en marquer un seul pic (Necib *et al.*, 2015).

Par contre l'extrait de *Amanita virosa* a donné deux pics dans le 2^{ème} (1,545 nm) et 4^{ème} (1,783 nm) (figure 12), des résultats identiques ont été obtenus avec les lectines de *Clarias gariepinus* fractionées sur le gèle séphadex G 150 avec un volume de rétention de 4 ml (Odekanyin et Kuku, 2014).

Afin de confirmer la présence de Lectine au niveau de ces tubes des 2 extraits utilisés, un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de lapin selon le protocole décrit précédemment. Les résultats obtenus par la suite ont confirmé la présence des lectines avec une hémagglutination.

2.8. Les résultats de dosage des protéines

Tableau 16: Les résultats du test de dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de *Amanita virosa* et *Morus alba L*

	Plantes	La concentration des Proteines (mg/ml)
L'extrait brute	<i>Morus alba</i>	0.55±0.01
	<i>Amanita virosa</i>	0.57±0.02
lectines Purifié	<i>Morus alba</i>	0.16±0.02
	<i>Amanita virosa</i>	0.13±0.02

3. Le test biologique

3.1. L'effet de *Morus alba L* et de *Amanita virosa* sur l'activité phagocytaire

Dans le but d'étudier l'intervention de la lectine dans le mécanisme de défense immunitaire, nous avons réalisé le test de l'activité phagocytaire.

Les résultats obtenus sont affichés dans la figure (14) montrent qu'il y a une différence dans les moyennes de l'index phagocytaire (K) entre les différents groupes G1, G2, G3, G4, G5.

L'analyse statistique de nos extraits de *Morus alba L* et *Amanita virosa* sur l'activité phagocytaire montre que l'augmentation de l'index phagocytaire chez les groupes traités (G2, G3, G4 et G5) est significative quand elle est comparée avec le groupe témoin G1. L'activité phagocytaire augmente avec l'augmentation de la dose, elle est surtout remarquable entre les deux doses de l'extrait de *Morus alba L*.

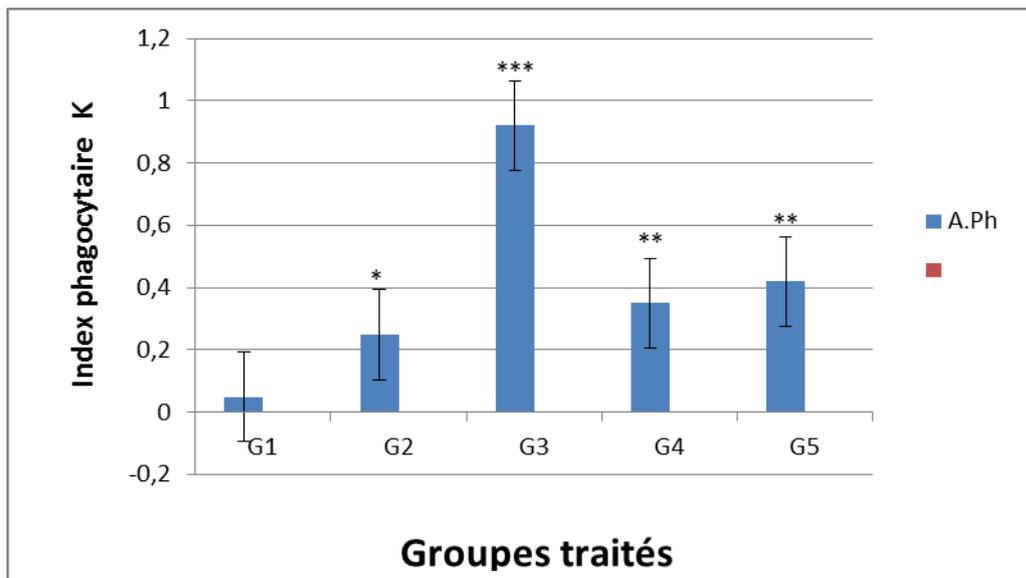


Figure 14: L'effet des extraits de *Morus alba L* et de *Amanita virosa* sur l'index phagocytaire K dans le test de l'injection du carbone chez la souris.

D'après la figure (15), il y a une relation entre la dose des extraits injectés et le taux de clearance. Le taux de clearance diminue avec l'augmentation de la dose, à comparaison avec le groupe témoin G1. Donc une diminution de concentration des particules de carbone suivie par une augmentation de l'indice phagocytaire K pour cela une sensibilisation du système phagocytaire.

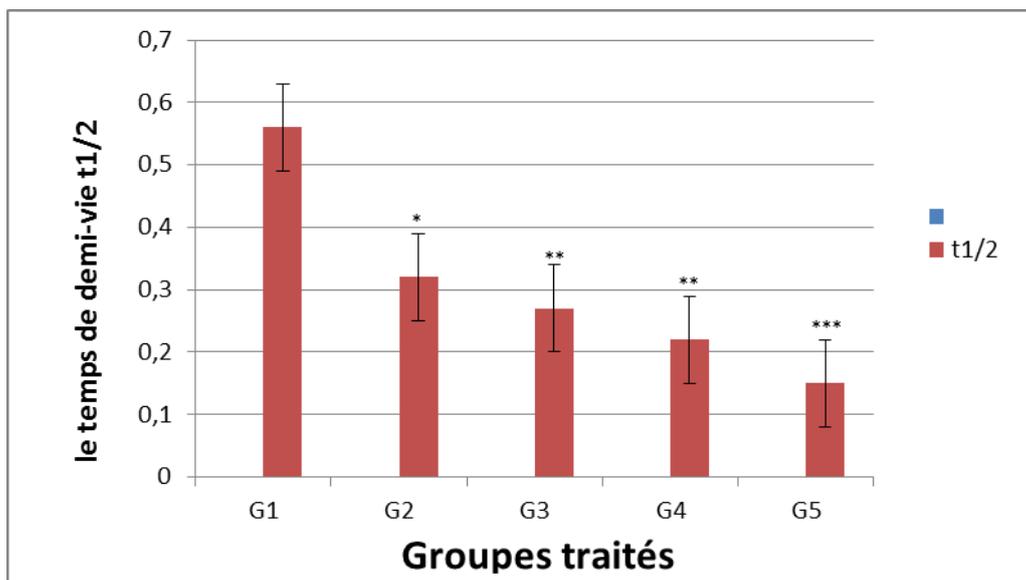


Figure 15: l'effet des extraits de *Morus alba L* et de *Amanita virosa* sur le taux de clearance.

La rate et le foie jouent un rôle essentiel dans le contrôle et la détection du changement sanguin de certains composants biochimiques et la régulation du cycle de vie des cellules sanguines. Ils neutralisent des particules toxiques qui circulent dans le sang et d'autres agents pathogènes.

Les résultats présentés dans la figure (16) montrent que l'augmentation de l'activité phagocytaire corrigée α est corrélée avec l'augmentation des doses des traitements injectées chez les souris. Au de la, l'augmentation de l'activité phagocytaire peut être associée à l'augmentation du poids du foie et de la rate.

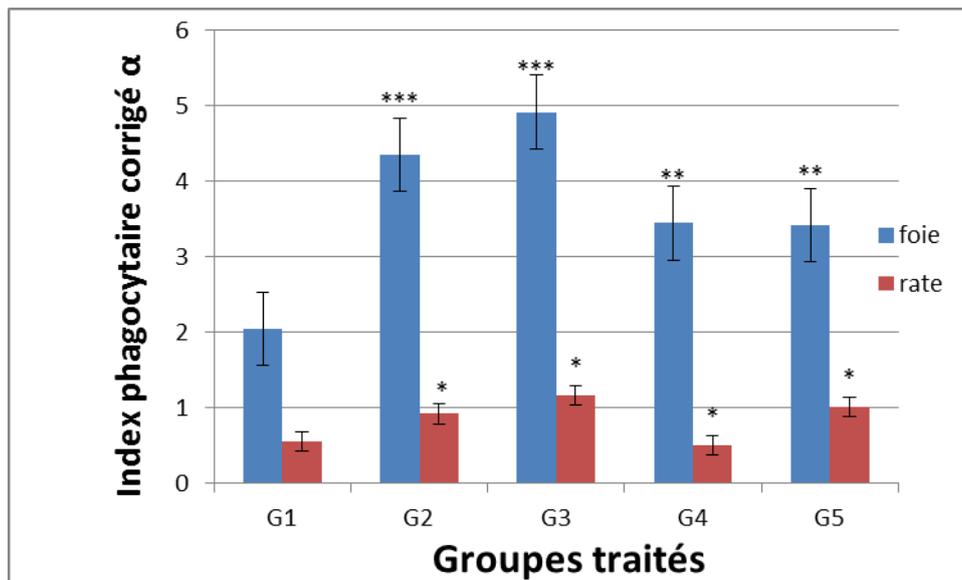


Figure 16: L'effet des extraits de *morus alba L* et de *amanita virosa* sur l'index phagocytaire corrigé (α).

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion

A l'issus de ce travail, une étude d'extraction de lectines des espèces *Amanita virosa* et *Morus alba* L a été réalisée. La recherche des lectines à partir de notre plantes a conduit à une activité d'agglutination.

- l'extrait d'*Amanita virosa* a montré une inhibition avec trois sucres Lactose, Galactose et le Mannose. par contre, l'extrait de *Morus alba* L a montré une inhibition avec le Mannose seulement,
- L'extrait d'*Amanita virosa* agglutine avec tous les types de groupe sanguins humains, Alors il est généralement désigné comme non spécifique, par contre L'extrait de *Morus alba* L montré une spécificité de groupe sanguin A seulement.
- La lectine de *Morus alba* L présente une inhibition vis-à-vis du chlorure de cuivre(Ch.Cu²⁺) donc une lectine métalloprotéine. Par contre, *Amanita virosa* ne marque aucune inhibition avec les métaux utilisés.
- les lectines d'*Amanita virosa* et de *Morus alba* L sont thermorésistants et différemment stables dans des pH neutre, alcalin et acide .
- La chromatographie sur colonne de séphadex G75 a donné un seul pic pour *Amanita virosa* et deux pics pour l'extrait de *Morus alba* L.
- D'après le dosage des protéines, la concentration protéique de l'extrait brut de *Morus alba* L a été 0.55 mg /ml, par contre leur extré purifié a donné une concentration de 0.16 mg/ml. La concentration protéique de l'extrait brut d'*Amanita virosa* a été 0.57 mg /ml, par contre leur extrait purifié a donné une concentration de 0.13 mg/ml.
- Les deux extraits qu'on a utilisés ont un effet immunitaire, mais celle de *Morus alba* L marque un indice phagocytaire plus élevé que celui de *Amanita virosa*.

Perspectives

Cet étude ouvre de nouvelles voies d'investigation pour :

- Analyser la composition chimique de *Morus alba* L et d'*manita virosa*.
- Purifier des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC
- Déterminer les poids moléculaire des lectines par électrophorèse et leur séquençage.
- Déterminer le mécanisme d'action des substances à activité immunostimulante.
- Évaluer d'autres activités biologiques .
- Déterminer l'effet de l'extrait sur d'autres mécanismes immunitaires (action sur les neutrophiles, action sur les lymphocytes, ...).

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

- A. F. S. Santos¹, M. D. C. da Silva², T. H. Napoleão³, P. M. G. Paiva³, M. T. S. Correia³ and L. C. B. B. Coelho^{3,*}(2014) 1CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal. 2Departamento de Ciências Animais, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), 59625-900 Mossoró, RN, Brazil; 3Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, PE, Brazil.
- Alencar, N.M., Cavalcante, C.F., Vasconcelos, M.P., Leite, K.B., Aragao, K.S., Assreuy, A.M., Nogueira, N.A., Cavada, B.S. and Vale, M.R. (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.
- Angata T, von Gunten S, Schaar RL, et al.I- Type lectins. In : varki A,Cummigs RD, Esko JD, et al., editors.Essentials of Glycobiology[Internet]. 4th edition.Cold Spring Harbor Laboratory Press ; 2022.chapter 35.doi :10.1101/glycobiology.4 e .35.
- Araujo JRC, Coelho CB,Campos AR, de AZevedo Morira R, de Oliverira Monteiro-Moreira AC. Animal Galectins as Tools for Studies in Neurosciences.*Curr Neuropharmacol*.2020 ; 18(3) :202-215.doi :10.2174/1570159X17666191016092221.PMID/31622208.PMCID :PMC7327950.
- AYBÜKE OKAY1, 2, E. SÜMER ARAS1, İLKER BÜYÜK1. 1Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, Ankara, Turkey 2Department of Vaccine Technology, Vaccine Institute, Hacettepe University, Ankara, Turkey
- Aymred,J.P. (2012). Karl Landsteiner (1868–1943) and the discovery of blood groups. *Transfusion clinique et biologique*. 19:244-248.

B

- Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN. 1953. Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticuloendothelial system. *British Journal of Experimental Pathology* 34, 441-457.
- Bouteldja H. et Ynineb L.E. (2019). Purification partielle, caractérisation et effet antiinflammatoire des lectines extraites à partir du champignon (*Lepista seava*)et du gland du chêne vert (*Quercus suber*).5-6.
- Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954) .Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.
- Brown,G.D., Willment, J.A.& Whitehead,L.C-tupe lectins in immunity and homeostasis.*Nat Rev Immunol* 18,374-389(2018).

C

- Chan EW, Lye PY,Wong . SK. Phtochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chin J Nat Med*. 2016 Jan ; 14(1) :17-30.doi :10.3724/SP.J.1009.2016.00017.PMID :26850343.
- Correia MTS, Coelho LCBB. 1995;Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, form seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol* 55(3), 261-273. <https://doi: 10.1007/BF02786865>.

D

- Dahms N, Hancock MK. P-type lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19 ; 1572(2-3) :317-40. doi :10.1016/s034-4165(02)00317-3. PMID :12223278.
- Deeksha M, Sangha K, Khurana D S, Kaur G, Bala M, Singh B. (2015) .Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch*. 3(1), 20-24.
- Devi.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.
- Duan L, Zangiabadi M, Zhao Y. Synthetic lectins for selective binding of glycoproteins in water. *Chem Commun (Camb)*. 2020 Sep 11 ; 56(70) :10199-10202. doi : 10.1039/d0cc02892d. Epub 2020 Aug 4. PMID : 32748907 ; PMCID : PMC7484035.

F

- Feràndez Romero JA, Paglini MG, Priano C, Koroch A, Rodriguez Y, Sailer J, Teleshova N. Algal and Cyanobacterial Lectins and Their Antimicrobial Properties. *Mar drugs*. 2021 Dec 1 ; 19(12) :687. doi :10.3390/md19120687. PMID : 34940686 ; PMCID : PMC8707200.

G

- Goker H, Haznedaroglu I.C, Ercetin +
- S et al. (2008). Haemostatic actions of the foltloric
- Goldstein I. J, Poretz R. D. (1986). Isolation physico-chemical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. *The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine*. ELSEVIER. INC: 49-50.
- Gowda N.M., Goswami U. et Khan M.I. (2008). Purification and characterization of a T-antigen.
- Guillot, J., Guerry, M., Konska, G., Caldefie-Chezet, F., De Latour, M. and Penault-Llorca, F. (2004) Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, 91, 141-158.

H

- Hirabayashi, J. (2004). Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.*, 21, 35-40.
- Hordé P. (2015). Rhésus-Définition. *Issu du santé-médecine*.

I

- Ito N., Nishi K., Kawahara S., Okamura Y., Hirota T., Rand S., Fechner G. et Brinkmann B. (1990). Difference in the ability of blood group-specific lectins and monoclonal antibodies to recognize the ABH antigens in human tissues. *J.hist.chem.* 22: 604-614.

J

- Janot, C., Mannessier, L., Chiaroni, J., Lejealle, A., Nafissi S. et Roubinel, F. (2002). Immunohématologie et groupes sanguins. Cahier de formation Bioforma. N26 Paris.
- Jeong HI, Jang S, Kim KH. *Morus alba* L for Blood Sugar Management : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022 May 23 ; 2022 :9282154. Doi : 10.1155/2022/9282154. PMID :35656460 ; PMCID : PMC9152381.

K

- Katink-Prastowska I. Haptoglobin glycoforms in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Glycoconj J.* 1999;10(10): 573–577 •
- Kyle R.A., MD., Shampo M.A. et PhD. (2001). Karl Landsteiner Discoverer of the Major Human Blood Groups. *Mayo Clin Proc.* 76:830. Lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Rutagraveolens*.

L

- Lis, H. and Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 98, 637-674.

M

- Mazalovska M, Kouokam JC. Plant-derived lectins as potential cancer therapeutics and diagnostic tools. *BioMed Research Int.* 2020; 2020:1–13
- McGregor, A., Jones, P. M., Good, M. A., & Pearce, J. M. (2006). Further evidence that rats rely on local rather than global spatial information to locate a hidden goal: Reply to Cheng and Gallistel (2005). *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 32(3), 314–321, medicinal plant extract ankaferd blood steeper. *Jint. Med. Res* (36), 163-170.
- Mishra A, Behura A, Mawatwal S, Kumar A, Naik L, Mohanty SS, Manna D, Dokania P, Mishra A, Patra SK, Dhiman R. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol.* 2019 Dec ; 134 :110827.doi :10.1016/j.fct.2019.110827.Epub 2019 Sep 19. PMID :31542433 ; PMCID : PMC7115788.
- Moulin A. 1996. 'A scientific object interlinking the biological and social science : the immune system'. *Historia, Ciencias, SAUDE-Manguinhos*, III (2) :300-318, Jul.-Oct.

N

- Nabi-Afjadi M, Heydari M, Zalpoor H, Arman I, Sadoughi A, Sahami P, Aghazadeh S. Lectins and -/slectibodies : potential promising antiviral agents. *Cell Mol Biol Lett.* 2022 May 13 ; 27(1) :37. Doi : 10.1186/s11658-02200338-4. PMID : 35562647 ; PMCID : PMC9100318.
- NAIK S. KUMAR S. (2022). Plant lectins application in biotechnology and treatment : Plant lectins application. *Journal of food science*, 11(4), e4224. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4224>.
- Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med.* 2002;8(4):187–92

- Naoum, S. (2022). Les phénotypes Groupes Sanguins. Les phénotypes groupent sanguins - Site des ressources d'ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre. Consulté le : mai 2023
<http://acces.enslyon.fr/acces/thematiques/evolution/logiciels/anagene/programmes-de-1ere-s-2011/autres-exemples/mutations/les-groupes-sanguins-abo/les-phenotypes-groupes-sanguins>.
- Narahari, A., Nareddy, P. K. and Swamy, M. J. 2011, Biochimie, 93, 1676.
- Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2015). comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Rutagraveolens*. World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1), 1720-1733.
- Necib. Y., Bahi A. Derri. N, Fateh Merouan. F, Bouadi. H., Boulahrouf. K. Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). World Journal of Pharmaceutical Research, 2014. 4(1):1707-1719.
- Neha J, Mishra RN. 2011. Immunomodulatory activity of Trikatu mega ext. Int J Res pharma Biomed Sci. 2.p :160-164.

O

- odekanyin. O. O., Kuku. A. characterization of galactose specific lectin from the skin mucus of african catfish *Clarias gariepinus burchell*, 1822. Academic journals, 2014. 9(20): 869-879.
- P
- Park S., Lee M.R. et Shin I. (2008). Chemical tools for functional studies of glycans. Chem. Soc. Rev. 37(8): 1579-1591. prognosis. Methods molecular medicine 9, 73-94.

R

- Ribeiro AC, Catarino S, Ferreira RB. Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. Carbohydr Res. 2012;352:206–10
- Richard.H.T. (1998). Application of lectin histochemistry and cytochemistry in diagnostic and prognosis. Methods molecular medicine 9, 73-94.

S

- Šajrović L. (2006). Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransférases (Doctoral dissertation, Université Joseph Fourier). 56-58.
- Sabot J. et Kos J. (2019). CNL-Clitocybe nebularis Lectin—The Fungal GalNAc β 1-4GlcNAc-Binding Lectin. J.Mol. 24(23):4204.
- Sano, K., Ogawa, H. (2014). Hemagglutination (inhibition) assay. In Lectins (pp: 47-52). Humana Press, New York, NY.
- Satnam S, Yadav CPS, Malleshappa NN. 2012. Immunomodulatory activity of butanol fraction of *Gentiana olivieri* Griseb. on Balb/C mice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(6), 433-437. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60071-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60071-9) scabra). Fish. Shell. Immu. 24(4): 450-458 World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1), 1720-1733. specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (Holothuria).
- Sharon N et Lis H. (2004). History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 14. 53R-62R. 11. (Sharon. N., Lis. H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules Glycobiology. (14), 53-62.

- Sharon N. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* (408), 1-8.
- She Q-B, Ng T-B et Liu W-K-A. (1998). Novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* (247), 106-111
- Singh R. et Das H.R. (1994). Purification of lectins from the stems of peanut plant. *Glyco. J.* 11: 282-285
- Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barrira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins :à review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J.* 2013 Oct ;30(7) :641-57. doi :10.1007/s10719-012-9464-4. Epub 2013 Jan 9. PMID :23299509 ;PMCID :PMC3769584.
- Sumner J-B et Howell S-F. (1936). Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32(2), 227-237.
- Sumner J-B, (1919). The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. *J. Biol. Chem.* (37), 137-142. □

V

- Varki A, Cummings R, Esko J, et al. editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory press ; 1999. chapter 27, S-type Lectins (Galectins).

Z

- Zitouni A, Bahi A, Necib Y. (2015). Immunomodulatory Activity of Lectins Extracted from *Terfeziabouderei*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 50.

Reference électronique :

- (<https://www.aujardin.info/champignons/amanita-virosa.php>)
- (<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Amanite-vireuse>).
- (<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/M%C3%BBrier-blanc>).
- (<https://ar.m.wikipedia.org/wiki/%D8%A3%D9%85%D8%A7>)

ANNEXES

Annexe 01: Préparation du NaCl 0.9%.

- NaCl : 0.9g.

- Eau distillée : 100 ml.

Annexe 02 : Préparation des solutions des glucides à 400mM.

Sucre	Concentration (mM)	Masse molaire (g/mol)	Volume d'eau distillé (ml)	Quantité (g)
Maltose	400	360,32	1	0,14412
Saccarose	400	342,32	1	0,13692
Cellobiose	400	342,32	1	0,13692
Glucose	400	198,17	1	0,07926
Mannose	400	180,15	1	0,07926
Lactose	400	360,32	1	0,14412
Galactose	400	180,15	1	0,07926

Annexe 03 : Préparation des solutions des métaux

Métal	Léau distillé
0.1g	1ml

Annexe 04 : Préparation de tampon à différents ph (1.12).

- Eau distillé
- NaoH
- Hc

Annexe 05 : Préparation des réactifs et manipulation du dosage des protéines

Préparation des réactifs

Réactif A : dissoudre 0,5g de CuSO₄ et 1g de Citrate de Sodium dans 100ml d'eau distillée.

Réactif B : dissoudre 20g de Na₂CO₃ et 4g de NaOH dans 1l d'eau distillée.

Réactif C : ajouter 1ml de réactif A à 50ml de réactif B.

Réactif D : diluer 1 volume de réactif de Folin-Ciocalteu par 1 volume d'eau distillée.

Manipulation

	<i>Morus alba L</i>	<i>Amanita virosa</i>	témoin
Extrait brut	500µl	500 µl	-
L'eau distillé	-	-	500 µl
Reac.C	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Reac.D	250 µl	250 µl	250 µl

Remarque : 3 tubes (répétitions) pour chaque test.

	<i>Morus alba L</i>	<i>Amanita virosa</i>	témoin
Extrait purifié	500 µl	500 µl	-
	-	-	500 µl
Reac.C	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Reac.D	250 µl	250 µl	250 µl

Remarque : 3 tubes (répétitions) pour chaque test.

L'absorbance de chaque tube a été effectué dans un spectrophotomètre a une longueur d'onde de 750nm.

Annexe 06:Composition de l'alimentation des souris pour 1 kg d'aliment

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage %
Maïs	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1
Minéraux	10	1
Vitamines	10	1

Annexe 07 : Préparation de gélatine

- Gélatine : 0,3g
- L'eau distillée : 100ml

Annexe 08 : Préparation de Na₂CO₃ (carbonate de sodium)

- Na₂CO₃ : 0,1g
- L'eau distillée : 100ml

Annexe 09 : Préparation de L'INK

- NaCl : 4ml
- L'ancre de chine (carbone) : 3ml
- Gélatine : 4ml

Date de soutenance : 13/06/2023

Nom et Prénom : BENTAFAR Aida

Nom et Prénom : BOUARIOUA Ahlam

Titre :

Caractérisation et l'immunomodulation des lectines extraites à partir de *Morus alba* L et *Amanita virosa*

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

Résumé

Les lectines constituent un groupe de protéines ou glycoprotéines ubiquitaires et polyvalentes d'origines non immunitaires, qui se lient de manière non covalente, spécifique et réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexe sans réagir catalytiquement avec eux, lorsque ces glucides sont des composants des parois cellulaires, les lectines provoquent l'agglutination des cellules qui les contiennent.

Le but de ce travail est de chercher la présence des lectines contenues dans l'extrait brut de la plante *Morus alba* L (racine) et le champignon *Amanita virosa* par le test d'hémagglutination. Après des tests par des hématies de lapins, les limites d'agglutination de *Morus alba* et d'*Amanita virosa* ont été 1 :6(64) pour les deux. Les lectines de l'extrait de *Morus alba* L ont donné une forte sélectivité sur les hématies humaines du groupe sanguin A. L'extrait de *Amanita virosa* n'a montré aucune capacité à distinguer les groupes sanguins humains. Pour certains sucres, le mannose a inhibé l'activité hémagglutinante des lectines de *Morus alba* L. Et pour *Amanita virosa*, le mannose, le lactose et le galactose ont inhibé l'activité hémagglutinante des lectines. L'activité hémagglutinante de l'extrait de *Morus alba* L a été stable dans la gamme de pH (3-10) et thermostable, il conserve son activité jusqu'à 100°C pendant une heure. Tandis que l'extrait de *Amanita virosa* a été stable dans la gamme de pH (2-12) et conserve son activité jusqu'à 80°C pendant une heure. Les deux extraits utilisés ont un effet immunitaire, mais celui de *Morus alba* L marque un indice phagocytaire plus élevé que celui de *Amanita virosa*.

Mots clés: *Morus alba*, *Amanita virosa*, Lectine, Extraction, thermostable, Hémagglutination, Activité phagocytaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr NECIB Y

Professeur UFM Constantine 1

Rapporteur: Mme BAHIA

M.C.A UFM Constantine 1

Examineur : Mme DJEMAI ZOUGHLACHE S

M.A.A UFM Constantine 1

Année universitaire 2022/2023