



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N°d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

L'extraction des lectines À partir d'*ocimum basilicum* avec les tests biologiques

Présenté par :

Le 20/06/2023

- LABIOD Wiam
- SAKHRI Marwa

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. BAHY Ahlem (MCA – UFM Contantine 1)

Encadreur : NECIB Youcef (Professeur- UFM Contantine1)

Examineur : DJEMAI-ZOZHLACHE Soumia (MAA. UFM Contantine1)

Année universitaire : 2022 - 2023



Remerciements

En premier lieu, nous remercions Dieu le tout-puissant pour son aide et de nous avoir donné la volonté, courage et patience durant ces longues années d'étude.

Nous tenant à remercier sincèrement notre encadreur Monsieur le chef département de biochimie à Université des Frères Mentouri Constantine, Le Pr. NECIB Youcef d'avoir accepté de m'encadré ainsi que pour son aide et suivie.

Grand et respectueux remerciement va au Mr Toumi Mohamed Esseddik Partagé Avec nous son expérience et Sa disponibilité.

Nous remercions les professeurs BAHY Ahlem et DJEMAI-ZOGLACHE Soumia d'avoir assisté aujourd'hui pour discuter de notre mémoire nous sommes honorés de les avoir.

Nous vous exprimons notre à tous les gens qui m'ont aidé de pris ou de loin pour La réalisation de se travaille.

Un grand merci à nos parents pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de

Notre longue année d'études

Merci





Dédicace

Ce modeste travail : est dédié à toutes les personnes que j'aime ;

A mes très chers parents, mon père Noureddine et ma mère Malika, qui se sont sacrifiés pour M'offrir un climat idéal de travail et qui n'ont jamais cessé de Me témoigner leur affection et de m'apporter leur soutien. Depuis toujours, je leur serai toujours reconnaissante pour leurs encouragements et leurs investissements, consentis dans un seul but ma réussite

- ❖ **Mon très cher frère** et la meilleure dans monde : Abd Al Hamid
- ❖ **Mon cher oncle Amar** pour ton aide, tes conseils, grandes que vous avez faite pour moi.
- ❖ **A toutes mes amies**, et les vrais amis Miyada, Hasna, Farah, Zina vous êtes les meilleurs pour moi,

Merci d'avoir émerveillé ces années avec tant de souvenirs inoubliables
Et sans oublier ma belle-famille Un grand merci pour mon binôme Marwa
pour réaliser ce modeste travail A vous tous merci

Wiam





Dédicace

Merci allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité décrire et de penser
et la patience pour aller au bout du rêve

Te dédie ce travail :

A mon très cher père seghir et chère mère Aalgia

Pour leurs soutiens et leurs sacrifices, et pour leurs encouragements tout
au long de ma vie, grâce à vous, j'ai réalisé mon rêve

Merci beaucoup

- ❖ A mes frères Djamel et mohamed
- ❖ A mes sœurs: yasemina et sara
- ❖ A mes amis, ma famille et tous ceux qui m'ont soutenu, que dieu vous
récompense
- ❖ A mon binôme wiam, Mon collègue et amie qui a partagé ce travail avec
moi, je te dis merci



Résumé

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines ubiquitaires d'origine animale ou végétale.

Notre recherche est basée sur des études d'extraction de différentes propriétés et spécificités des lectines contenues dans des plantes médicinales *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, et *Salvia rosmarinus* par des tests d'agglutination et leurs études biologiques.

L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon.

L'extrait du *Ocimum basilicum* montre une très forte agglutination vis-à-vis des globules rouges de lapin.

Les résultats montrent que les extraits *Ocimum basilicum* agglutinent avec tous les types du groupe sanguins humain ABO.

Traitement thermique les lectines de ce type espèces gardent leur activité d'agglutination lors de leur exposition à différentes gammes de traitement thermique De 40°C jusqu'à 100°C.

Hémagglutinante des lectines de *Ocimum basilicum* reste stable de pH égale 7 Sauf avec (pH 3,4,6,9) (Montrent une absence d'agglutination).

Les tests d'inhibition avec différents monosaccharides montrent que L'extrait de basilic d'*Ocimum* a été inhibé par le fucose. Par contre une absence d'inhibition avec les autres sucres (Maltose, lactose, Mannose, cellobiose, fructose, sorbitol, Mannitol).

La purification sur colonne de Sephadex G-50 a montré un deux pics.

Mots clés : Lectines, Extraction, Hémagglutination, Système ABO, Inhibition, Monosaccharides, protéines.

Abstract

Lectins are ubiquitous molecules proteins or glycoproteins found in animal or plant origin.

Our research is based on studies of the extraction of different properties and specificities of lectins contained in medicinal species such as *Ocimum bacilicum*, *Salvia officinalis*, and *Salvia rosmarinus*, through hemagglutination tests and their biological study.

The extraction was done by grinding and maceration in a buffer solution.

The extract of *Ocimum basilicum* shows a very strong agglutination towards rabbit red blood cells.

The results show that the extracts of *Ocimum bacilicum* agglutinate with all types of human ABO blood groups

Lectins of this species retain their agglutination activity when exposed to different ranges of heat treatment from 40°C to 100°C .

Agglutination of *Ocimum bacilicum* lectins remains stable at pH 7, except at pH 3, 4, 6 and 9, whichh show an absence of agglutination. Different monosaccharides were tested for inhibition, only basil extract of *Ocimum* was specifically inhibited by fucose, while there was no inhibition with the other sugars such as maltose, lactose, mannose, cellobiose, fructose, sorbitol, and mannitol.

The purification of the extract using a Sephadex G-50 column showed two peaks.

Keywords: Lectins, Extraction, Hemagglutination, ABO system, Inhibition, Monosaccharides, Proteins.

ملخص

اللكتينات هي بروتينات أو بروتينات سكرية توجد بكميات كبيرة عند النباتات والحيوانات .

يعتمد بحثنا على دراسات استخراج مميزات وخصائص مختلفة من اللكتينات الموجودة في الأنواع الطبية الثلاثة:

الريحان (*ocimum basilicum*)، المرمية (*Salvia officinalis*)، إكليل الجبل *Salvia*

(*rosmarinus*)

أولاً، بواسطة اختبار التراص الدموي ودراساتهم البيولوجية.

يتم الاستخلاص عن طريق الطحن والنقع في محلول ملحي.

يظهر مستخلص (*ocimum basilicum*) ترصص قوي مع خلايا الدم الحمراء للأرانب.

أظهرت النتائج أن مستخلصات الأنواع الثلاثة قدمت ما يلي:

مستخلص الريحان أحدث ترصص في جميع مجموعات الدم.

المعالجة الحرارية للكتينات هذا النوع تظهر أنها تبقى محافظة على نشاط التراص خلال تعرضها لمختلف درجات

الحرارة من 40 إلى 100 درجة مئوية

نشاط ترصص اللكتينات يبقى ثابت في درجة الحموضة (7)، واختفاء التراص في درجات (3، 4، 6، 9) . في

اختبار التثبيت مع مختلف السكريات الأحادية اثبت ان الريحان لديه خصوصية مع سكر واحد هو فوكوز

(Fucose) وعدم وجود تثبيت بواسطة السكريات الأخرى (المالتوز، اللاكتوز، المانوز ، السيلوبوز ، الفركتوز،

السوربيتول، المانيتول) .

الاستخلاص بواسطة هلام السيفادكس 50 اظهر وجود ذروتين.

الكلمات المفتاحية: لكتينات، نشاط استخلاص التراص، نظام الزمر الدموية، تثبيت سكريات أحادية، بروتينات.

Liste des abréviations

KDA: kilodalton, : c'est une unité de mesure de la masse moléculaire des protéines.

PHA: polyhydroxyalcanoates

Ac: Anti corp

GR: Globule rouge

AB0: système sanguine humain

PBS: phosphate buffered saline

PH = potentiel Hydro isoélectrique

HA: hémagglutination

Abs: absorbance

MI = Microlitre

mM: millimolaire

BSA: Bovine serum albumine

EB: Extrait brut

Fuc: Fucose

Mg /ml = Milligramme/ Millilitre

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
01	Liste des lectines végétales (AU Hivrale, AG Ingale, 2013)	01
02	Historique de découverte des lectines (RAMATA NADIO Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine (2010) étude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de Abrus precatorius. L'école de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie).	04
03	Les groupes sanguins (Traoré Oumoul ;2002)	12
04	La spécificité des lectines aux groupe	14
05	Classification de l'ocimum basilicum (Balakrishnan P, 2018)	16
06	Méthode préparation des plantes	17
07	L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut de ocimum basilicum, salvia officinalis, salvia rosmarinus	25
08	L'activité de la limite d'hémagglutination d'ocimum basilicum.	26
09	Tableau09 : l'agglutination des hématies humaines par de l'extrait brut Ocimum basilicum.	27
10	Inhibition de l'activité d'hémagglutination par des saccharides	28
11	L'effet de la température sur l'activité hémagglutination de l'extrait Ocimum basilicum	29
12	L'effet du PH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'ocimum basilicum	30

13	Résultats de l'absorbance de 52 fractions obtenue par la chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G50.	31
14	Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics obtenues après chromatographie.	33

Liste des figures

Figure	Légende	Page
01	<p>Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de Canavalia en isiformis en complexe.</p> <p>(Christelle Breton, Lenka Šnajdrová, «2016 «Structures et mécanismes des glycosyltransférases Glycobiologie 16 (2), 29R-37R .)</p>	6
02	<p>Réprésentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique. (code PDB 1HGF). La représentation de la protéine est analogue à la figure 1. (Christelle Breton, Lenka Šnajdrová, «2016 «Structures et mécanismes des glycosyltransférases Glycobiologie 16 (2), 29R-37R).</p>	7
03	<p>Agglutination Comme on le voit dans la partie gauche du schéma, l'agglutination est le résultat de liaisons croisées entre les cellules par les lectines;</p> <p>acques(MIÈGE,2023 « LECTINES », Encyclopædia Universalis ,URL,https://www.universalis.fr/encyclopedie/lectines/2-structure-et-proprietes/#quote-apa)</p>	10
04	<p>structure des Antigènes de groupe sanguins du système ABO (https://docplayer.fr/12557601-Chap-4-les-groupes-sanguins.html)</p>	13
05	Test d'agglutination	20
06	Détermination de l'activité d'agglutination	21

07	Méthode de test d'hémagglutination sur les hématies humaines ABO	22
08	Méthode pratique: Effet de la variation de température sur la stabilité de la protéine.	23
09	. Effet de la variation de pH sur l'activité protéique	23
10	La courbe de filtration de l'extrait d'ocimum basilicum sur colonne sephadexG-50.	32
11	La gamme d'étalonnage de BSA.	42

Liste des photos

Photos	Titre	Page
01	Ocimum basilicum(https://www.webteb.com/articles .	16
02	l'extraction des lectines a partir des plantes médicinale.	18
03	la centrifugation des extraits des Toits plantes médicinales.	18
04	Les trois extraits après la centrifugation	18
05	préparation des hématies de lapin et ABO.	20

Sommaire

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	----------

Section 01 : Etude bibliographique

Chapitre 01 : Généralité sur les lectines

1-Définition	3
2- Historique.....	3
3 la Structure des lectines	5
3-1 - Les lectines les plus simples	5
3-2- Transmembranaires lectine	7
4-La classification de lectine de plante	7
4-1-Le nombre de chaine polypeptidique.....	7
4-1-1- Mérolectine.....	7
4-1-2-Holectine	8
4-1-3-Chimerolectines.....	8
5-Spécificité et affinité des lectines	8
5-1-la spécificité et affinité via à vis les glucides	8
5-2-les lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifique	9
6-Les propriétés des lectines	9
6-1-liaison aux sucres.....	9
6-2- agglutination des cellules.....	9
6-3-Stimulation lymphocytaire.....	10
6-4-Stimulation de cellules végétales.....	10
7- Utilisation des lectines	11
8- Intérêt des lectines pour l'homme.....	11

Chapitre 02 : Le système ABO

1/ Historique des systèmes de groupes sanguins.....	12
2/ Le système ABO	12

3/ Structure chimique	13
4/ Lectines spécifique des groupes sanguins.....	13

Chapitre 03 : Les plantes médicinales

1- Généralité sur les plantes médicinales	15
2- Présentation d'ocimum basilicum.....	15
3- Description de ocimum basilicum.....	15
4- Classification d'ocimum basilicum.....	16
5- L'utilisation traditionnelle d'ocimum basilicum	16

Section 02 : Etude Biologique

I-Matériel et méthodes

Partie 01 ;

1- Matériel.....	17
1-1 Le Matériel végétal	17
1-2 Le Matériel Biologique	17
2-Méthode	17
2-1 Préparation des plantes	17
2-2 Extraction des plantes	17

Partie 02 ;

3-Test d'hémagglutination.....	20
4-Test limite d'hémagglutination.....	21
5-Test d'hémagglutination sur les Hématies ABO	21
6-Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides.....	22
7- L'effet de Température sur l'hémagglutination.....	23
8-L'effet de pH sur l'hémagglutination	23
9-L'extraction des Lectines par la chromatographie sur colonne de séphadex G-50	23

9-1-Préparation de la colonne	23
9-2- La Séparation des lectines à partir des extraits bruts.....	24
9-10- la Spectrophotométrie a UV	24
10- Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de lectines	24

II-Résultats et discussion

Les Résultats des études biologiques	25 -31
L'extraction des Lectines par la chromatographie sur colonne de séphadex G-50.....	31
Dosage.....	33
Conclusion et perspectives	35
Références bibliographiques	36
Annexe	40

Introduction

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, végétale ou animale, pas d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire, (RAMATA NADIO, 2010).

Lectines sont supposées être multivalentes et que la spécificité résulte largement des terminaisons monosaccharides. Certaines lectines végétales peuvent agglutiner divers groupes sanguins d'érythrocytes et sont donc appelés phytohémagglutinines

Les lectines sont des protéines de liaison aux glucides, que l'on trouve dans la plupart des plantes, en particulier les graines et les tubercules comme les céréales, les pommes de terre et les haricots (légumineuses). Quelques lectines :

Tableau 01 : Liste des lectines végétales (AU Hivrale, AG Ingale, 2013)

Lectin icon	Lectin name	Source
ConA	Concanavaline A	Canavalia ensiformis
GNA	Snowdrop lectin	Galanthus nivalis
RCA	ricinus communis Agglutinine	Ricinus communis
AIL	Jacalin	Artocarpus integrifolia
WL	Hairy vetch lectin	Vicia villosa
WGA	Wheat Germ agglutinin	Triticum vulgare
SNA	Blderberry lectin	Sambucus nigra
MAL	Maackia amurensis leucoagglutinine	Maackia amurensis
MAH	Maackia amurensis hémoagglutinine	Maackia amurensis
UEA	Ulex europaeus agglutinine	Ulex europaeus
PNA	Peanut agglutinin	Arachis hypogaea
LCH	Lentil Lectin	Lens culinaris
GalPhl	Galactose specific lectine	Phaseolus lunatus

ManPSL	Mannose specific lectine	Pisum sativum
GaLDBL	Galactose specific lectine	Dolichos biflorus
GalCal	Galactose specific lectine	Caragana arborescens

Les recherches actuelles ont également montré l'extraction de lectines à partir de sources animales. Traditionnellement, ils ont été utilisés comme réactifs d'histologie et de transfusion sanguine. Les lectines peuvent être toxique, inflammatoire, (Ravi Prakash Mishra, Aijaz Ahmad Ganaie (2016).

L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certains d'entre eux agglutinaient les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donné (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes (Nathan Sharon, 2007).

Le but principal de notre étude est de poursuivre les travaux sur ces lectines pour déterminer leur spécificité d'agglutination sur les groupes sanguins dans des espèces médicinales *Ocimum basilicum*.

*Chapitre 1 : généralité
sur les lectines*

2017 162 1601162

-1-Définition

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine non immunologique (João Ronielly Campelo Araújo, 2020).

Dans la nature, les lectines sont des protéines largement dispersées qui reconnaissent et se lient sélectivement aux glucides et aux glycoconjugués via des liaisons réversibles au niveau de sites de liaison spécifiques (Mohsen Nabi Afjadi, Morteza Heydari, 2022).

Capable d'agglutiner les cellules ou de précipiter des complexes glucides, sans avoir aucune activité enzymatique vis-à-vis de leurs ligands glucidiques. Les lectines forment une famille hétérogène de récepteur Qui reconnaissent certaines structures oligosaccharides Et jouent un rôle majeur dans les processus des interactions Entre les cellules (Rémy Loris Thomas Hamelryck, 1997).

Généralement, les lectines sont des glycoprotéines contenant composée de sous-unités dont la masse moléculaire varie de 25 à kDa, disposés en dimères ou tétramères, et existant sous forme 35 plusieurs isoformes partageant des propriétés biochimiques similaires (Sakeena Qadir,et al,2013) . Les lectines sont omniprésentes, étant détectées à la fois dans les systèmes procaryotes et eucaryotes . (E.konozy ;makarim et al ,2022).

2-Historique

Vers la fin du XIXe siècle, des preuves ont commencé à s'accumulent pour la présence dans la nature de protéines possédant la capacité d'agglutiner les érythrocytes.

-De telles protéines étaient appelées hémagglutinines ou phytoagglutinines, car On les trouvait à l'origine dans des extraits de plantes.

- En1954 Boyd et Sharpleigh ont inventé le terme „Lectin", dérivé du mot latin" legere" signifie cueillir, choisir ou sélectionner.

-Dans les années 1960. Il est devenu évident que ces protéines agglutinaient également d'autres types de cellules et que nombre d'entre elles étaient spécifiques au sucre (Nathan Sharon, Halina Lis, 2004).

- Jusqu'au début des années 1970, bien que la présence de lectines ait été signalée dans de nombreux organismes surtout dans les plantes, seules quelques-unes d'entre elles avaient été purifiées, et presque toute la purification était réalisée par des techniques conventionnelles telles que la cristallisation induite par le sel, l'éthanol précipitation, chromatographie échangeuse d'ions et filtration sur gel (Ravi prakash Mishra et al ; 2016).

-La première lectine de l'animal la source, qui s'est révélée spécifique d'un sucre (L-fucose), provenait de l'anguille. (Ravi Prakash Mishra et al, 2016).

- Les lectines se trouvent dans presque toutes les plantes comestibles et l'exposition des hommes et des animaux aux lectines est inévitable.

- La majorité des lectines végétales sont présentes dans les cotylédons des graines, où elles se trouvent dans le cytoplasme ou elles peuvent certaines lectines telles que « ricin » et également être présent dans les corps protéiques, « abrin » sont hautement toxiques (Ravi Prakash Mishra, Aijaz, 2016).

L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est l'a découvert que certains d'entre eux agglutinaient les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donné (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes (Nathan Sharon, 2007).

Tableau02 : Historique de découverte des lectines (RAMATA NADIO, 2010).

<i>Année</i>	<i>Auteurs</i>	<i>Découvertes</i>
1884	Warden&Waddel/Bruyllant&Venneman	Toxicité de la graine d'abrus precatorius
1886	Dixon	Toxicité de la graine de Ricinus communis
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de Ricinus communis
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine de Abrus precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d"hemagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes à hémagglutinines.

1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sommer	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947	Boyd,Reguera/Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1952	Watkins et 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 et Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de Phaseolus vulgaris
1965	Agrawal et Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi et Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'Escherichia coli

3- La structure des lectines

D'un point de vue structurel, les lectines sont divisées en trois classes principales selon leur topologie.

3-1 Les lectines simples

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément Identiques), dont la masse moléculaire généralement n'excède pas 40 kDa.

Cette classe contient pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines, une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose.

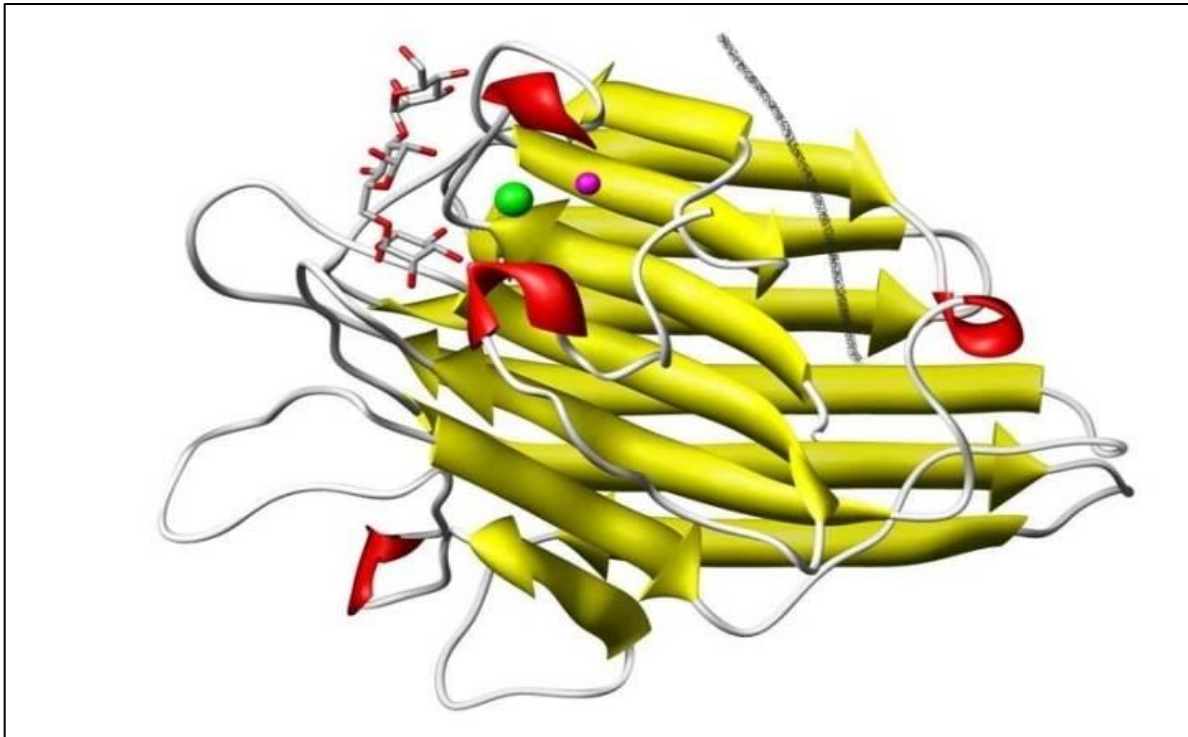


Figure1 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *Canavalia ensiformis* en complexe(. Christelle Breton, Lenka Šnajdrová, 2016).

Avec le trimannoside (code PDB 1CVN). La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones. une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations.

Les lectines en mosaïque

Ce groupe comprend diverses protéines provenant de diverses sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (Lenka ŠNAJDROVA, 2006).

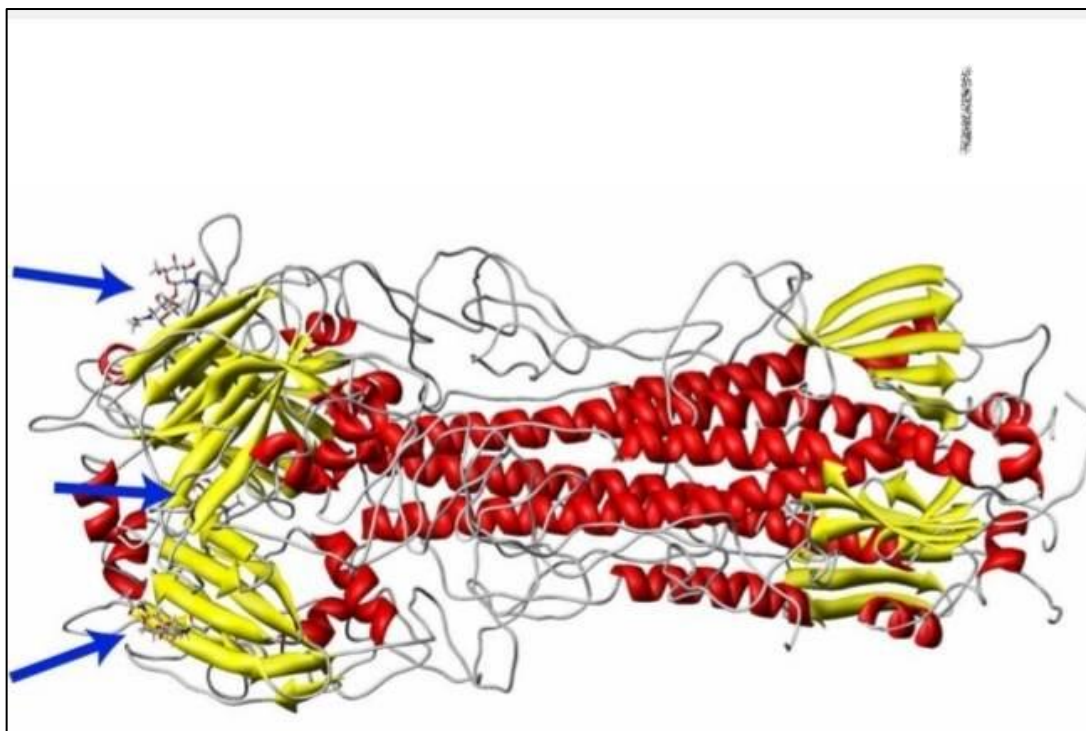


Figure02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (code PDB 1HGF). La représentation de la protéine est analogue à la figure 1(*Christelle Breton, Lenka Šnajdrová, 2016*).

3-2 Transmembranaires lectines

Les structures plus complexes : (Type C, type I, type P, toxine AB5) Peuvent posséder plusieurs domaines Sont appelées "mosaïques" ou "multidomaines".

-Enfin, des lectines participant à des assemblages macromoléculaires ont été identifiées dans des pili (adhésines fimbriales), ou des flagelles de bactéries . (Nabi-Afadi et al. 2022 .)

4-Classification des lectines

Plusieurs classifications de lectines ont été proposées dont nous avons pu distinguer plusieurs types majeurs selon les facteurs pris en considération:

4-1-Le nombre de chaîne polypeptidique

4-1-1 Merolectines

Sont protéines qui sont composé uniquement d'un seul glucide domaine de liaison. Ce sont des petits polypeptides uniques

-Une protéine de nature monovalente incapable à précipiter ou à agréger les glucides complexes Cellule. (Willy J.Peumans, Van Damm 1995).

4-1-2 L'hololectine

Ce compose également exclusivement :

- Domaine lié à la vitesse, mais contient deux ou plusieurs de ces - réseaux identiques ou très similaires.

Ce groupe constitué de lectines avec plusieurs sites de liaison et, par conséquent, est capable d'agglutination ou de précipitation cellulaire glycoconjugué.

Les lectines végétales sont des hololectines car elles agissent comme agglutinine.

4-1-3 Chimérolectine

Ce comporte sous forme de mérolectine ou d'hololectine .(illy J. Peumans, Van Damm 1995.)

Agit indépendamment du site de liaison. Les chimérolectines se comportent comme les mérolectines en fonction du nombre de liaisons glucidiques (exemple : chitinase classe I).

Ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip Ribosom inactivating Proteine : Protéine Inactivant les ribosomes comme la ricine) .(illy J. Peumans, Van Damm 1995).

5-Spécificité et affinité des lectine

5-1-Spécificité et affinité vis-à-vis les glucides

Les lectines se lient à ces glucides et sont essentielles pour traduire les informations codées en fonctions et processus biologiques. (Felix obolaBirgit Wiltsch,2022).

Se lient de manière réversible à des glucides spécifiques et sont ensuite divisées en 25 sous-familles (Sushma Naithani ,Sneha Sudha Komath, 2021.)

Plusieurs groupes de lectines végétales se lient aux sucres simples comme le glucose, le mannose ou le galactose, ils ont généralement des affinités beaucoup plus élevées pour

oligosaccharides qui ne sont pas courants dans les plantes (Arpad Pusztai and Susan Bardocz 2005).

5-2 Lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifiques

Des glycopeptides et des oligosaccharides de type N -acétyllactosaminique ou oligomannosidique dérivés de glycoprotéines contenant la liaison N -glycosylamine ont été utilisés pour définir la spécificité de différentes lectines (concanavaline A, agglutinine de *Lens culinaris* , agglutinine de *Vicia faba*).

-Glycoprotéines possèdent une plus grande affinité pour les lectines que les oligosaccharides apparentés pourraient s'expliquer par le fait que la liaison glycane-acide aminé conduit à des structures plus rigides que celles des oligosaccharides eux-mêmes mêmes (Debray H, Decout D, 1981).

6-Propriétés de lectines

6-1 Liaison aux sucres

Précipitation des polysaccharides et des- glycoprotéines agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin (Emadeldin Hassan ; E Konozy, Makarim El- (2022).

C'est typiquement des protéines très stables dans diverses conditions physico-chimiques telles que la température, le pH et les conditions dénaturantes (Emadeldin Hassan E. Konozy (2022).

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité lectine) Jacques MIÈG, 2023).

6-2 Agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible dont les lectines interagissent avec les cellules, pour cela Les lectines doivent avoir au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec les saccharides de surface sur des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasmes, champignons...), les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas l'agglutination (Jacques MIÈG, 2023).

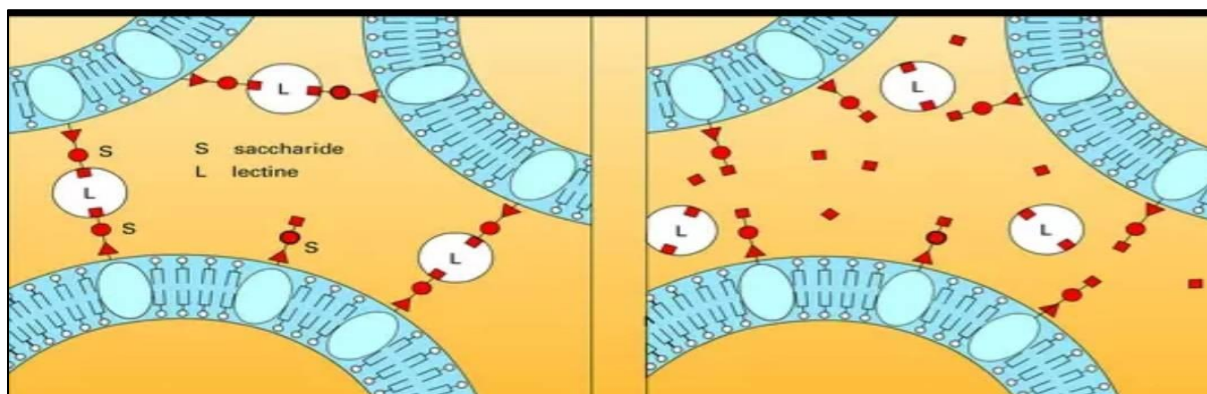


Figure 03: Agglutination Comme on le voit dans la partie gauche du schéma, l'agglutination est le résultat de liaisons croisées entre les cellules par les lectines ;(Encyclopædia Universalis France).

6-3 Stimulation lymphocytaire

Une des propriétés les plus étonnantes est capacité à convertir de petits lymphocytes sanguins en cellules plastiques. (Lymphoblastes munis d'un noyau volumineux entrant rapidement en mitose).

Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines, mais en général. Il ne s'exerce que sur les lymphocytes T (fabriqués par le thymus «l'agglutination des cellules, L'activité mitogène «stimulation lymphocytaire)

Les effets mimétiques des hormones, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses(A. Meite, K.G. Kouame 2006).

6-4 Stimulation de cellules végétales

Un effet mitogène a été observé dans d'autres conditions, par exemple, dans le contrôle des divisions cellulaires au début de la germination (exaltation de la croissance des racines d'oignon sous l'action de la PHA du haricot).

La concanavaline A et les PHA stimulent également germination in vitro des grains de pollen en raccourcissant la période d'incubation qui précède l'émergence des tubes polliniques.

-Les PHA auraient un rôle dans l'orientation des microtubules qui participent à la formation du fuseau mitotique. (Jacques MIÈGE (2023).

7- Utilisation des lectines

En Cancérologie : Des études ont démontré que les lectines végétales extraites des feuilles et des graines ont des propriétés anticancéreuses, telles que l'activité antimigratoire, et antimétastatique, ainsi que des propriétés antinéoplasiques/antitumorales, telles que l'activité antiproliférative et cytotoxique, contre les cellules cancéreuses de différents types. (Maria Carla Santana De Arruda, M.C.S et al. 2023).

- les biologistes et les cliniciens du cancer à utiliser les lectines comme nouveaux médicaments antitumoraux potentiels à l'avenir (Fu LL, Zhou CC (2011).

En Biologie cellulaire : Les interactions glucides-protéines forment la base d'une variété de mécanismes nécessaires aux processus physiologiques extracellulaires .et intracellulaires, comme l'adhésion cellulaire, la communication intercellulaire, la signalisation et le transport, et le repliement des glycoprotéines.

Le Système Immunitaire et l'immunostimulation : Par détection de fragments glucidiques endogènes, les lectines sont impliquées et associées à l'embryogenèse, au développement et à la régénération des tissus et à la régulation des fonctions du système immunitaire (Alina P. Filshtein1, 2023).

Dans le système immunitaire, la variation et le ciblage des protéines vers les compartiments cellulaires et, également, Dans les mécanismes de défense de l'hôte, l'Inflammation et les métastases (Mohamed Ali Abol Hassan et al , 2015).

8-Intérêt des lectines pour l'Homme

Les rôles des lectines végétales qui peuvent cibler les voies de mort cellulaire programmées dans la pathogenèse et la thérapeutique du cancer. (FuLL ,Zhou CC,2011) .

Les lectines sont cruciales dans la spécificité de la reconnaissance moléculaire dans divers processus physiologiques , et sont déjà considérées comme un standard pour déterminer l'Interaction protéine-glucide .(Alina P. Filshtein1, 2023).

Chez l'humain, quelques lectines reconnaissent de manière spécifique certains groupes sanguins (Sylvie Faucher, 1989). ,

Chapitre 2

Le système ABO

Le système ABO

1-Historique des systèmes de groupes sanguins

En 1900 le médecin Karl Landsteiner découvre de l'agglutination des hématies par les sérums, ainsi, il a identifié les deux antigènes A et B et leurs anticorps respectifs.

En 1924, Bernstein a expliqué la transmission héréditaire selon les lois de Mendel des facteurs de groupes sanguins (Ramata. N, 2010).

2-Le système ABO

Le système ABO est très important pour les transfusions sanguines et les transplantations d'organes (Kacem et al., 2012), Il est le plus important de tous les systèmes de groupes sanguins sur le plan clinique (Sultan et al, 1996).

Le système ABO se définit par la présence ou l'absence des antigènes et des anticorps naturels spécifique sur les globules rouges ou dans le plasma (Prisca vignon Gancadja, 2019).

La présence sur les hématies d'un Ag exclut la présence dans le plasma de l'AC qui lui correspond, exemple : si, dans le sang d'un humain, les globules rouges sont porteurs de l'antigène A, le plasma ne peut pas posséder d'anticorps anti A. Sinon la réaction antigène-anticorps provoquerait une agglutination (Ramè et Naccache, 2001).

Le système des groupes sanguins ABO, est classé en quatre groupes sanguins principaux : A, B, O (absence d'Ag A et B), AB (Traoré Oumou, 2002).

Tableau 3 : Les groupes sanguins (Traoré Oumou, 2002)

Groupe ABO	Antigène présent	Anticorps Présent
A	A	ANTI –B
B	B	ANTI-A
AB	A ET B	AUCUN
O	AUCUN	ANTI-A ET ANTI-B

3-Structure chimique

La nature biochimique des antigènes de ce système est glycolipides. Les déterminants antigéniques sont des sucres terminaux que reconnaissent les anticorps spécifiques, en effet :

- L'antigène A est défini par l'alpha-N acétyl-galactosamine.
- L'antigène B est définie par le D-galactose.
- L'antigène O (ou H) est défini par le-fucose (M. Adama TRAORE, 2018).

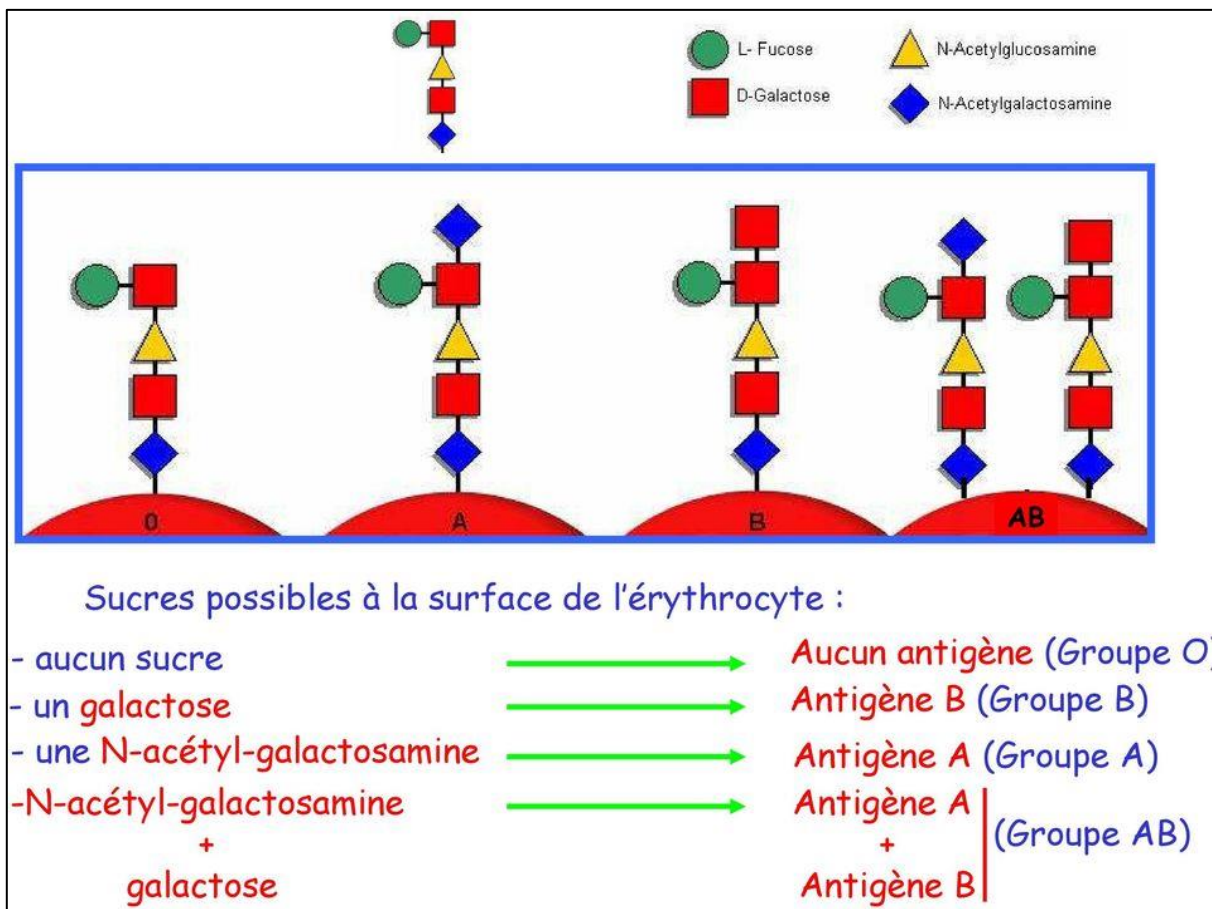


Figure04: structure des Antigènes de groupe sanguins du système ABO (<https://docplayer.fr/12557601-Chap-4-les-groupes-sanguins.html>)

4-Lectines spécifiques des groupes sanguins

Des nombreuses lectines agglutinent les globules rouges, des fois avec une spécificité de groupe sanguin (Ramata, 2010).

Tableau 04 : La spécificité des lectines aux groupes sanguins (Doumbia ;2004)

Spécificités	Plante
Anti-A	Phaseolus limensis
Anti-A1	Dolichos biflorus
Anti-B	Ptita plumosa
Anti-A+B	Cotalaria striata
Anti-H	Lotus tetagonolus ulex europaeus
Anti -M	Iberis amaras
Anti-N	Vca graminea

Chapitre 3:

Les plantes

LES PLANTES

1-Généralité sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies comme des plantes qui ont une activité pharmacologique pouvant conduire à des utilisations thérapeutiques (Bubulka, 2007), cela est dû à la présence certaines substances actives, dont la plupart affectent l'organisme humain.

Ce sont des plantes qui ont deux origines, les plantes spontanées (sauvages) et les plantes cultivées. (Bennour hasna, 2022).

En médecine traditionnelle, les plantes médicinales sont des ressources précieuses pour la grande majorité de la population rurale en afrique, donc, plus de 80% de cette population l'utilise pour assure leurs soins de santé (Camara A.k, 2022).

2-Présentation d'ocimum basilicum

Ocimum basilicum est connu sous le nom "basilic", le terme basilic vient du grec basilikom qui signifie plante royale (khamouli, 2007). C'est une plante herbacée annuelle originaire d'Asie, l'Amérique et l'Inde (khoualdi imen, 2018), appartient à la famille des lamiacées (labiatae), largement utilisé comme herbe culinaire dans la cuisine (M.ismail, 2006), De plus cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour traites un large éventail de maladies (Arashi khaki, .2011).

3- Description d'Ocimum basilicum

Le basilic est une plante aromatique, sa culture a besoin d'un climat chaud et ensoleillé, d'un sol riche en matières organiques (Dupont, F. et al., 2012).

- ❖ Les tiges : est droite et ramifiée, pouvant atteindre 50 à 100 cm de hauteur
- ❖ Les feuilles : sont multipliés, opposées, de forme ovale à oblongue et couleur généralement verte (Lethicia, 2022).

4- Classification d'ocimum basilicum**Tableau05** : Classification de l'ocimum basilicum (Balakrishnan P, 2018)

Régne	Plantae
Division	Magnoliophta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Ocimum
Espèce	Ocimum basilicum

**Photo01** : Ocimum basilicum

<https://www.webteb.com/articles>

5-L'utilisation traditionnelle d'ocimum basilicum

Basilic est bien connu comme une plante à valeur médicinale populaire pour traitement de diarrhées, des crampes d'estomac.

- ❖ Les feuilles et les fleurs sont utilisées en médecine traditionnelle comme vermifuge, tonique.
- ❖ Le thé chaud au basilic pour traiter les flatulences, les nausées et la dysenterie.
- ❖ L'huile de plante est utilisée pour le soulagement des spasmes rhinite, la fatigue mentale, aussi comme un traitement de premiers secours pour les piqûres de guêpes et morsures de serpent. (M. Ismail, 2006).

Section 2: Partie Pratique

Matériel et Méthodes

1-Le Matériel ;

1-1- Le Matériel Végétal :

Dans ce travail, nous avons utilisé les racines et les feuilles de trois plantes médicinales :

A-Ocimum basilicum

B-Salvia officinalis

C-Salvia rosmarinus

1-2-Le Matériel Biologique

- Les hématies du lapin (3%)
- Le sang humain ABO (Groupage à nos collègues)

2-Méthode

2-1 Préparation des Plantes

Tableau 06 : Méthode préparation des plantes

Lavage	Les racines et feuilles ont été bien rincées avec l'eau.
Séchage	Les racines et les feuilles ont été séchées à T° ambiante pendant 6 jours
Broyage	Les racines et les feuilles ont été broyées dans un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre

2-2-l'extraction des plantes

Après la préparation des plantes:

- ✓ Met la poudre de racines et de feuilles dans un volume du tampon PBS 10mM ,ph 7.4 (10mM Na₂HPO₄;2mM KH₂PO₄;2.7mM KCl; 137mM NaCl; 2mM EDTA).
- ✓ (Poudre +PBS) Mélange pendant 24h.
- ✓ Centrifugation pendant 30min à 6000tour/min à 4°C.

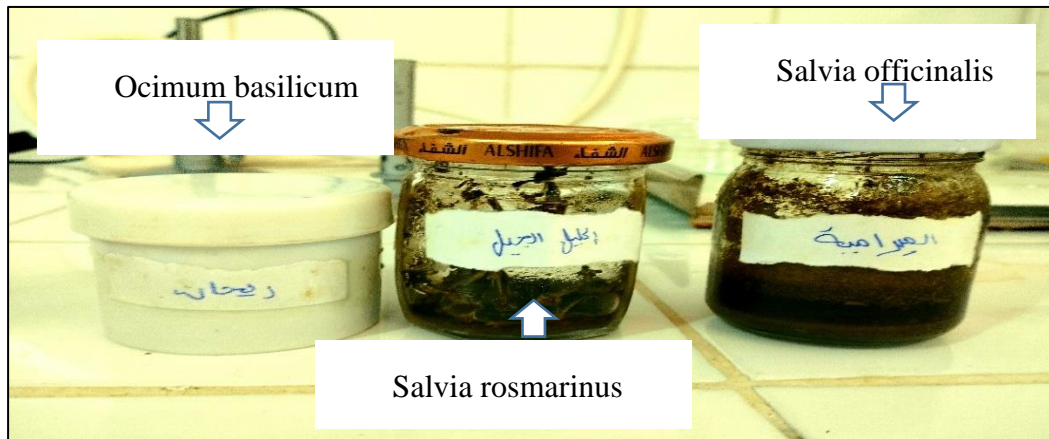


Photo 02 : l'extraction des lectines à partir des plantes médicinales



Photo 03: la centrifugation des extraits des Trois plantes médicinales

- ✓ Le surnageant obtenu a été utilisé pour évaluer la présence des lectines par le test d'HA



Photo 04: Les trois extraits après la centrifugation

❖ Test d'hémagglutination

C'est la méthode la plus rapide utilisé pour détecter des lectines dans les extraits (Sharon N.et Lis H.,1998).

Matériels et méthodes

Ce test est reposé sur l'observation de l'agglutination, et donc de la précipitation des érythrocytes en présence de lectine.

➤ **Préparation des hématies à 3%**

Les hématies ABO et hématies du lapin collectées ont été au préalable, soumises à un lavage puis à une dilution (1.5 culot des hématies +48.5 PBS)

1-Lavage des hématies

Une quantité de sang a été posé dans des tubes, les tubes ont été centrifugés à 6000rpm pendant 10min, puis les plasmas ont été éliminés et les culots récupérés.

Les culots ont été lavés par l'eau physiologique (NaCl 0.9%, soit par le tampon PBS 10mM pH 7.4) jusqu'à trait limite de tube.

Cette opération de lavage a été répété trois fois dans les mêmes conditions.

- Fixations des globules rouges par glutaraldéhyde :

Globules rouges ont été incubés dans le PBS 10 mM pH 7,4 contenant le glutaraldéhyde 1% pendant 10-15 min, 3 fois de lavage.

Centrifugation a été réalisée pour d'éliminer l'excès de glytaraldehyde, une étape de lavage avec une solution de glycines 1M dans NaCl 0,9% ou le PBS a été ajoutée pour éliminer L'interaction du glutaraldéhyde avec les glycanes membranaires des érythrocytes.

À la fin, on a obtenu des globules rouges purs.

2- Dilution des hématies

Après avoir lavé les globules rouges, diluer les globules rouges avec du chlorure de sodium (NaCl), sachant que 3 ml des hématies dans 100 ml d'eau physiologie. afin d'obtenir d'hématies à 3%.



Photo 05: préparation des hématies de lapin et ABO

➤ **Test hémagglutination**

Dans chaque puits d'une microplaque on ajoute:

**25 ul de PBS+25 ul des extraits bruts de chaque
plante**

dilution(extrait+PBS)

ajouter 25 µl des hématies du lapin

**L'activité hémagglutinante des lectines est déterminée
après estimation visuelle de l'hémagglutination après 1
heure.**

➤ **Figure 05 : Test d'agglutination**

➤ **Test limite hémagglutination**

Dans chaque puits

25 µl de tampon PBS +25 µl de l'extrait Brute(ocimum basilicum)

Puis une gamme de concentration par double dilution A été réalisée dans les puits suivants

25 µl des hématies du lapin ont été déposés dans Tous les puits

incubation 1 h à une température ambiante

Figure 06 : Détermination de l'activité d'agglutination

❖ **Test d'hémagglutination sur les hématies humaines ABO**

L'étude a été réalisée sur des hématies humaines, cette méthode pour tester la spécificité des lectines des extraits de différents groupes du système ABO.

➤ **Technique**

Dans une microplaque :

25ul des tampon PBS+25ul des extraits de ocimum basilicum

dilution des l'extrait avec tampon

25 ul de sang(ABO)

Incubation 30 minutes

Figure 07 : Méthode de test d'hémagglutination sur les hématies humaines ABO

❖ **Le test d’Inhibition d’hémagglutination par des saccharides**

Cette méthode pour déterminer la spécificité de lectines aux glucides et inhibier l'agglutination des hématies de lapin.

Le test d’Inhibition d’HA avec les glucides se fait de la même manière que le test HA.(Sano K., Ogawa H., 2014).

➤ **Méthode : Préparation des doubles dilutions des sucres**

Dans une microplaque, ont été ajoutés (dans tous les puits) 25 μ L de PBS 10 mM pH 7,4 et un même volume (25 μ L) de sucre (400 mM pour le mono ou oligosaccharides, uniquement dans le premier puits.

À partir de ce premier puits (25 μ L + 25 μ L PBS), un volume de 25 μ L a été prélevé puis dilué avec 25 μ L de PBS pour obtenir une dilution au demi (1/2), on répète la même procédure avec les autres puits pour la préparation des doubles dilutions.

Le mélange a été incubé pendant 30 min à température ambiante.

Un volume de 50 μ L des hématies de lapin fixés a été ajouté dans tous les puits de la microplaque.

La lecture des résultats a été effectuée après 1h d’incubation à 37 °C.

❖ **Effet de température sur l'hémagglutination :**

➤ **Méthode :**

Cinq tubes à essai, contenant de l'extrait brut

l'extrait brut chauffé puis refroidi à la température ambiante.

incubées à différentes températures (40, 60, 80, 100 °C) dans un bain marie pendant 1h

Figure08 : Méthode pratique : Effet de la variation de température sur la stabilité de la protéine.

❖ **L'effet de pH sur l'hémagglutination**

➤ **Technique**

Dans 5 tubes à essai :

3g de notre plante +10ml de tampon PBS à pH=3,4,6,7,9

Centrifugation

Effectuée le test d'hémagglutination sur le surnageant

Figure09 : Effet de la variation de pH sur l'activité protéique

❖ **L'extraction des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G-50**

1-Préparation de la colonne de gel sephadex G-50 ont été mis en suspension pour former la phase solide de séparation, il a ensuite été coulé dans une colonne (jusqu'au 2/3 de la colonne) fixée sur la poutre. la colonne doit être homogène et exempte de bulles d'air.

2- Séparation des lectines : après la stabilisation le gel dans la colonne et lavage par le tampon PBS (0,1 M ; pH: 7,4) , 2ml de l'extrait brut (ocimum basilicum) a été ajouté au niveau de la colonne de sephadex G-50 .

Dans 52 tubes secs placés en série dans un portoir, des fractions de séparation de 4 ml par tube ont été récupérées, pour le confirmer, l'extrait obtenu par cette méthode a été testé avec

Les globules rouges de lapin, pour vérifier la présence de l'activité hémagglutinine de notre extrait.

3-La UV spectrophotomètre : L'absorbance des extraits après la colonne de chromatographie a été mesuré par spectrophotomètre à UV à longueur d'onde 280 nm.

❖ **Les dosages**

Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de lectines

Elle est réalisée selon la méthode de Bradford (1976).

En utilisant le sérum albumine bovin (BSA) comme un standard. Abs a été mesuré à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible (annexe 2).



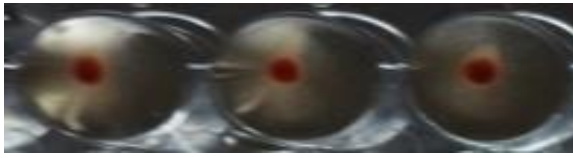
Résultats et discussion



❖ **Le test d'hémagglutination**

Nos résultats montrent une agglutination des globules rouges avec des extraits (tableau 07)

Tableau07 : L'agglutination des hématies du lapin par l'extrait brut de ocimum basilicum, salvia officinalis, salvia rosmarinus

Extrait	Teste d'agglutination
Ocimum basilicum	 +++
Salvia officinalis	 ---
Salvia rosmarinus	 ---

+++ : très forte agglutination

--- : absence de L'agglutination

L'extrait du Ocimum basilicum montre une très forte agglutination vis-à-vis des globules rouges de lapin. Par contre, les deux autres extraits (Salvia officinalis et Salvia romarinus) n'ont données aucune agglutination décelable (tableau 07)


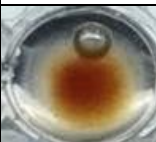



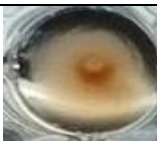
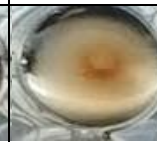
Ce test repose sur la capacité des lectines à former un réseau avec des erythrocytes forme une phase gélatineuse visible à l'œil nu, cela indique la présence de lectines.





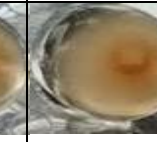
Résultats et discussions

Le résultat du test d'HA montre que *Ocimum basilicum* contiennent effectivement des substances à activité agglutinante sur les hématies.

❖ Test limite d'hémagglutination

Tableau 08 : L'activité de la limite d'hémagglutination d'*ocimum basilicum*

Dilution	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
Extrait							
Ocimum basilicum							
	+++	+++	++	+	-	-	-

Dilution	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
Extrait					
Ocimum basilicum					
	-	-	-	-	-

Résultats et discussions

+++ : très forte agglutination

++ : forte agglutination

+ : faible agglutination




- : absence agglutination

Nos résultats ont montré que l'activité hémagglutinante de l'extrait d'ocimum basilicum a été de 1er jusqu'à 3ème puit.

Diminution au niveau du 4ème puits, et disparaît complètement au niveau des autres puits (5ème jusqu'au 12ème). en raison à la dilution effectuée et donc les fractions contenues sont des diluantes de l'extrait brut.

❖ **Test d'hémagglutination sur les hématies humaines ABO :**

Tableau 09 : l'agglutination des hématies humaines par de l'extrait brut Ocimum basilicum.

Les groupes sanguins	A	B	O
Ocimum basilicum			
	+++	+++	+++

+++ :très forte agglutination

L'extrait d'ocimum basilicum agglutine assez fortement tous les types de groupes sanguins humains (A, B, O), on peut alors classer notre lectine dans la catégorie des lectines "non spécifique ».









Ce résultat est en accord avec Les études réalisées Sur *Diploaxis asurgens*, *Raphanus sativus*, *Brassica tournifortil* et *Geotrupes Stercorarius*, (Devi et al, 2014 ; Deeksha et al, 2015).

Résultats et discussions

Le test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides

Les résultats obtenus sont affichés dans le tableau :

Tableau10 : inhibition de l'activité d'hémagglutination par des saccharides

Extrait Sucre	Ocimum basilicum
Maltose	 -
Lactose	 -
Mannose	 -
Cellobiose	 -
Fructose	 -
Sorbitol	 -
Fucose	 +
Mannitol	 -

+ : Agglutination

- : Abs d'agglutination

Résultats et discussions

L'extrait d'*Ocimum basilicum* a été spécifiquement inhibé par le fucose.


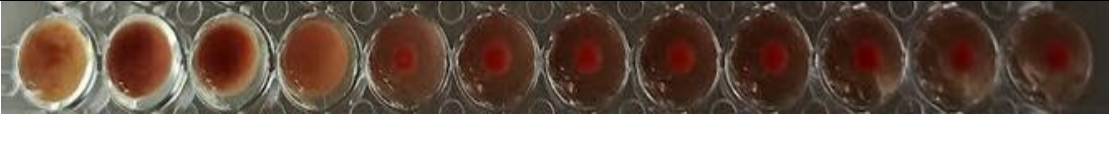

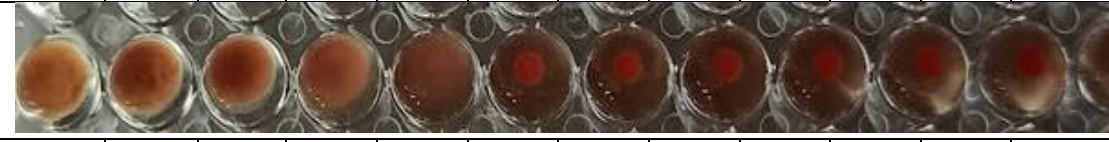
Le test d'inhibition d'HA par les sucres (soit mono ou oligo ou polysaccharides) est le plus fréquemment effectué pour confirmer la nature d'agglutination et l'affinité protéique, (Toumi Mohamed, E ; 2021).

L'extrait de basilic d'*Ocimum* était spécifiquement inhibé par le fucose et cette inhibition due à l'occupation du site de reconnaissance par le fucose.

L'absence d'Inhibition avec les autres sucres (Maltose, Lactose, Mannose, Cellobiose, Fructose, Sorbitol, , Mannitol) testés s'explique par l'absence d'affinité.

Effet de température sur l'hémagglutination

Tableau 11: l'effet de la température sur l'activité hémagglutination de l'extrait *Ocimum basilicum* ;

D T	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
40°C												
Résultat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
60°C												
Résultat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
80°C												
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
100°C												
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-


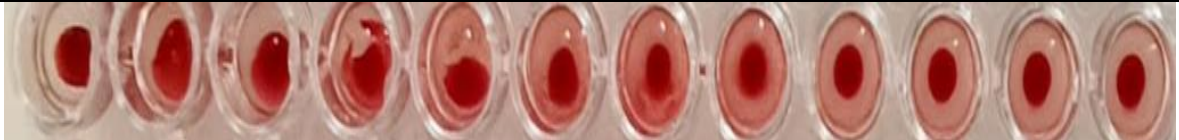
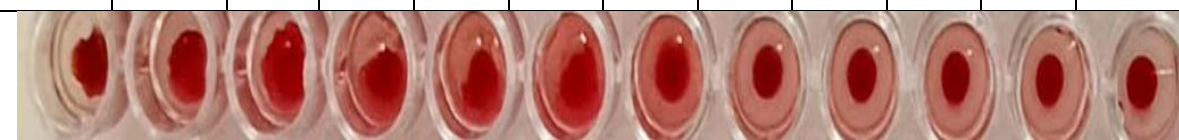


Nous observons que le traitement thermique de l'extrait brut de *Ocimum basilicum* à différente température (40 °C , 60°C , 80°C , 100°C) pendant 1h , pas assez pour inactiver complètement l'hémagglutination .

Résultats et discussions

Ce résultat indique que la lectine est résistante aux hautes températures (thermostable), comme les lectines extraites à partir de l'algue rouge *Pterocladia capillacea* qui pousse jusqu'à 100°C (Necib et al., 2015).

❖ L'effet de pH sur l'hémagglutination

Tableau 12 : l'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait d'*ocimum basilicum*

D pH	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
3												
Résultat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4												
Résultat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6												
Résultat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7												
Résultat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9												
Résultat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Les changements de pH affectent sur les protéines. Chaque changement du pH du milieu (l'acidité ou la salinité) induit l'ionisation de ces groupements puis la variation de la charge ionique de la lectine et affectera la force de l'interaction avec le ligand (Adenike K., et Eretan O.B., 2004).

Nos résultats ont montré que l'extrait de feuille de basilic d'*Ocimum* avait une activité d'hémagglutination maximale dans les douze puits avec un pH optimal {7}. ainsi l'activité

Résultats et discussions

d'hémagglutination de nos lectines est stable. par contre, dans l'intervalle {3, 4, 6, 9} l'agglutination de notre lectine de 1 puits jusqu'au 6 puits qui disparaît au niveau de 7 puits, ce qui montre que le pH acide et basique influence sur l'activité hémagglutinante, peut être due à la modification du site de liaison du sucre en raison de la forte charge sur la lectine à ce pH.

❖ La Séparation des lectines par la chromatographie sur colonne de Sephadex G-50

Tableau 13 : Résultats de l'absorbance de 52 fractions obtenue par la chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G-50

Fraction	Absorbance	Fraction	Absorbance
1	2.469	27	0.314
2	2.256	28	0.105
3	2.048	29	0.273
4	2.355	30	0.304
5	2.049	31	0.256
6	2.260	32	0.240
7	2.253	33	0.423
8	2.219	34	0.255
9	2.208	35	0.223
10	1.915	36	0.187
11	1.632	37	0.167
12	1.398	38	0.036
13	1.314	39	0.082
14	1.133	40	0.160
15	1.073	41	0.136
16	0.930	42	0.124
17	0.810	43	0.155

Résultats et discussions

18	0.729	44	0.138
19	0.607	45	0.139
20	0.531	46	0.139
21	0.502	47	0.186
22	0.523	48	0.242
23	0.290	49	0.243
24	0.396	50	0.193
25	0.236	51	0.111
26	0.342	52	0.096

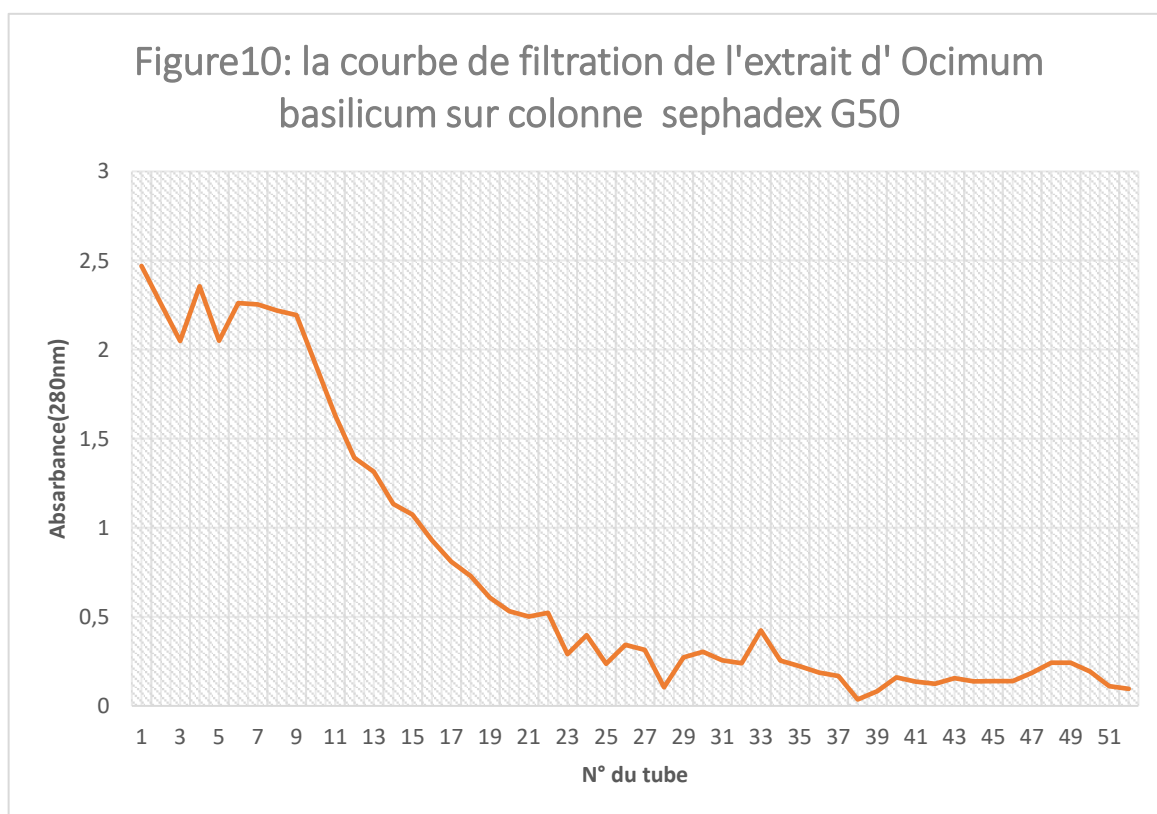

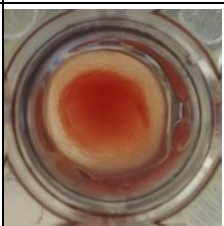


Tableau 4 : résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics obtenues après chromatographie

Résultats et discussions

Pics	3	24
Absorbance	2,048	0.396
Teste d'hémagglutination		

La séparation par chromatographie sur colonne de séphadex G-50 de l'extrait d'ocimum basilicum a donné deux pics :

- Première pic : 3^{ème} tube (absorbance :2,048).
- Deuxième pic : 24^{ème} tube (absorbance : 0,396).

Un test d'hémagglutination à été effectuées sur les tubes correspond aux deux pics formée pour déterminer la présence de lectines dans les fractions obtenues.

Nos résultat montrée l'activité hémagglutinante a été présenté dans les tubes 3.24, et ce résultat indique la présence de lectine dans les deux tubes.

La chromatographie sur colonne est améliorée l'activité hémagglutination des extraits.

❖ Dosage des protéines des extraits bruts de lectines

1-Calcul de la concentration de l'extrait brut Ont été déterminés la concentration de notre extrait brut en protéine à partir de la droite étalon.

La D.O de notre échantillon brut est de 0,420

$$y=0.0113+0.2844$$

$$X=(0.420-0.2844)/0.0113$$

$$X=12. \text{ } \mu\text{g/ml} = 0.012\text{mg/ml}$$

La concentration de l'EB en protéines = **0.012mg/ml.**

2-Calcul de la concentration de l'extrait purifiée

Résultats et discussions

La D.O de notre EP est de 0.745

$$Y = 0.0113x + 0.2844$$

$$0.745 = 0.0113X + 0.2844$$

$$Y = 0.0113x + 0.2844 \quad X = (0.745 - 0.2844) / 0.0113$$

$$X = 40.76 \text{ } \mu\text{g/ml} = \mathbf{0.0407 \text{ mg/ml}}$$

La concentration de l'extrait purifiée = **0.0407mg/ml**

Conclusion

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'extrait des lectines à partir des racines de la plante *Ocimum basilicum* ont une activité d'agglutination sur les globules rouges appelés lectines.

L'extrait d'*Ocimum basilicum* a montré leur capacité à agglutiner toutes les hématies A, B et O.

L'extrait d'*Ocimum basilicum* est inhibé par fucose, cette affinité de la lectine pour ce sucre peut être utilisée pour sa purification, par contre les autres sucres ont montré aucune inhibition. D'autre part, l'extrait d'*ocimum basilicum* est thermorésistant, stable dans des pH neutre, alcalin et acide.

La chromatographie sur Sephadex G -50 a donné trois pics pour l'extrait d'*ocimum basilicum*. Pour bien approfondir l'étude, il sera probable d'élargir le champ de la recherche, en faisant une étude sur les globules rouges des animaux domestique pour améliorer et purifié des lectines, il faut procéder à d'autres techniques comme la chromatographie d'affinité ; FPLC ; SDS PAGE.

Références

Bibliographies
Bibliographies

REFERENCES

- A Meite, KG Kouame, Séraphin Kati-Coulibaly, 2006, Lectines: substances antinutritionnelles *•Médecine et nutrition* 42 (4), 179-187
- Adenike, K., & Eretan, O. B. (2004). Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2): 229-233.
- Balakrishnan . P ; (2018) , A comprehensive Review on *ocimum basilicum* . *Journal of Natural Remedies* ; 18(3) ; pp 2320- 3358 .
- Bennour hsna , (2022) , contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques extraits d'une plante médicinale (*Aloysia citrodora L*) , centre universitaire Abdel hafid boussouf - Mila , p5 .
- Bubulka , P ; (2007) , plants médicinales du traitement des pathologie rhumatismales , la médecine traditionnelle à la phytothérapie . P 137- 145.
- Camara A . K , et al ; (2022) , Enquête ethnobotanique sur l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des affections bucco-dentaires dans la commune de kindia en république de guinée - *Revue Ramres - série pharm Méd . Trad . Afr* ; 21 (2) ; 107 - 115.
- Christelle Breton , Lenka Šnajdrová, Charlotte Jeanneau, Jaroslav Koča, Anne Imberty 2006, Structures et mécanismes des glycosyltransférases, *Glycobiologie* , 16 (2),29-37.
- 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.
- DOUMBIA. M. Etudes de l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne. Thèse Pharmacie, université FMPOS. Mali, 2004. p: 84.
- Dupont F., et Guignard J. L. 2012. Botanique des familles de plantes. 15ème Edition. Elsevier Masson SAS, pp. 237-300.
- Emadeldin Hassan E Konozy, Makarim El-fadil M Osman *•2022•La lectine végétale : un futur médicament anti-tumoral prometteur, •article de Biochimiste* (202), 136-145.
- Ewen Arpad Pusztai, Susan Bardocz, Stanley WB *•2008 Utilisations des lectines végétales en biosciences et en biomédecine •Frontiers in Bioscience-Landmark* ,13 (3), 1130-114.
- Félix Tobola, Dr Martin Lepšík et al,(2022) Ingénierie de la spécificité du ligand de la galectine humaine par incorporation d'analogues du tryptophane ., *ChemBioChem* ,23 (5).

Références bibliographiques

Henri DEBRAY, Dominique DECOUT, Gérard STRECKER, Geneviève SPIK, 1981 « Spécificité de douze lectines vis-à-vis des oligosaccharides et des glycopeptides apparentés aux N-glycosylprotéines Journal européen de biochimie (117(1)) 41-51.

Jacques MIÈG, 2023, LECTINES ». Dans Encyclopædia Universalis [en ligne].Articles Consulté sur <https://www.universalis.fr/encyclopedie/lectines>

João Ronielly Campêlo Araújo, Cauê B Coelho, Adriana Rolim Campos, Renato de Azevedo Moreira, Ana Cristina de Oliveira Monteiro- Moreira 2020, Les galectines animales et les lectines végétales comme outils pour les études en neurosciences Neuropharmacologie actuelle, 18(3), 202-215.

Kacem, N., Chakroun, T., Moussa, H., Abdelkefi, S., Houissa, B., Chiaroni, J., et al., 2012. RHD zygosity assignments based on most probable genotype and hybrid Rhesus box detection in Tunisia. Transfusion Medicine (Oxford, England) 22: 362–366.

Khaki , A , fathiazad, f., Nouri , M., Khaki ,A . A , (2011) Effects of basil ,Ocimum basilicum on spermatogenesis in rats , J . Med. Plants Res , 5(18), 4601- 4604 .

Khamouli . O , Grazza . b ; (2007) , Détection et comparaison de composition chimique de plusieurs variétés de basilic ocimum basilicum L . Cultivées en trois régions différentes de sud de l'algerie . Université kasdi Merbah ouargla ; p4 .

Khoualdi . I et Boughrara . N ; (2018) , l'effet de l'extrait d'ocimum basilicum sur quelques paramètres biochimiques et reproductifs chez les rats intoxiqués par le mercures . Université larbi benmhidi oum el bouaghi , p3 .

Lei-lei Fu, Cheng-cheng Zhou, Shun Yao, Jia-ying Yu, Bo Liu, Jin-ku Bao, 2011, Les lectines végétales : ciblant les voies de mort cellulaire programmée comme agents antitumoraux, La revue internationale de biochimie et de biologie cellulaire 43 (10), 1442-1449.

Lethicia Barreto Brandão , et al , (2022) ,The Potential Effects of Species Ocimum basilicum L. on Health: A Review of the Chemical and Biological Studies . Pharmacogn Rev;16(31):22-26 .

Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chemical reviews, 98(2): 637-674.

M. Adama TRAORE , (2018) , Connaissances et pratiques des étudiants sur le groupe sanguin ABO et Rhésus à la FMOS/FAPH et à la FST de Bamako . Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako , FACULTE DE MEDECINE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE . P20 .

M. Ismail , (2006) , Central Properties and Chemical Composition of Ocimum basilicum Essential Oil . Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza, Egypt , Pharmaceutical Biology ; 44(, pp 619–626 .

Maria Carla Santana de Arruda, Maria Rafaela Oliveira Bezerra da Silva et all,2023, Antitumor lectins from algae: A systematic review, Algal Research, 70,102962.

Références bibliographiques

- Mohamed Ali Abol Hassan, Razina Rouf, Evelin Tiralongo, 2015, Lectines de champignons : spécificité, structure et bioactivité pertinentes pour les maladies humaines, Revue internationale des sciences moléculaires 16 (4), 7802-7838.
- Nabi-Afjadi, M., Heydari, M., Zalpoor, H. et al. 2022) Lectins and lectinibodies: potential promising antiviral agents. , Lettres de biologie cellulaire et moléculaire 27 (1), 37.
- Nathan Sharon , Halina Lis)(2004), Histoire des lectines : des hémagglutinines aux molécules de reconnaissance biologique, Glycobiologie , 14(11), 53-62.
- Nathan Sharon, 2007, Les lectines : réactifs spécifiques aux glucides et molécules Journal of Biological Chemistry 282 (5), 2753-2764.
- Necib Y, Bahi A , Merouane F , Bouadi H , Boulahrouf K.(2015). Immunomodulatory activity of lectins extracted from the red marine alga *Pterocladia capillacea*. World Journal of Pharmaceutical Research. 4(1), 1693-1706.
- Osman, M.Ef.M., Dirar, AI & Konozy,(2022) EHE Criblage à l'échelle du génome des gènes putatifs de lectine de *Sorghum bicolor* L., distribution dans les QTL et implications probables des lectines dans la tolérance au stress abiotique. BMC plant Biol 22 , 397 .
- Prisca Vignon GNACADJA , (2020) , Implication du système ABO dans la susceptibilité à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine .
- Qadir, Sakeena et Hussain Wani, Ishfak et Rafiq, Shaista et Ahmad Ganie, Showkat et Masood, Akbar et Hamid, Rabia (2013), Évaluation de l'activité antimicrobienne d'une lectine isolée et purifiée d'*Indigofera heterantha*, Avancées en biosciences et biotechnologie, 04 (11), 999-1006
- RAMATA NADIO , (2010) , ETUDE DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES ISOLEES DES GRAINES DE *Abrus precatorius*.L , universite de Bamako , faculté de médecine de pharmacie et d'Odonto - stomatologie , P 35 .
- RAMATA NADIO Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine (2010) ETUDE DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES ISOLEES DES GRAINES DE *Abrus precatorius*.L 'culté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.
- Ramé A, Naccache P. (2001). Transfusion sanguine. LAMARRE ,05
- Ravi Prakash Mishra, Aijaz Ahmad Ganaie et al, 2016 'Isolement et purification d'une lectine spécifique du galactose à partir de graines de *Bauhinia variegata* et évaluation de son potentiel Journal international des sciences et de la recherche pharmaceutiques 7 (2), 804.
- Ravi Prakash Mishra, Aijaz Ahmad Ganaie, Aashiq Allaie Hussain 2016, Isolement et purification d'une lectine spécifique du galactose à partir de graines de *Bauhinia variegata* et évaluation de son potentiel. Journal international des sciences et de la recherche pharmaceutiques, 7(2), 804.

Références bibliographiques

Rémy Loris, Thomas Hamelryck, Julie Bouckaert, Lode Wyns(1998), Structure des protéines et enzymologie moléculaire, journal Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1383 (1), 9-36..

Sano, K., Ogawa, H. (2014). Hemagglutination (inhibition) assay. In Lectins (pp: 47-52). Humana Press, New York, NY.

Sharon Nathan(2007), Lectines : réactifs spécifiques aux glucides et molécules de reconnaissance BIOLOGIQU, Tourillon de chimie biologique ,282 (5), 2753-2764,

Sultan, C., Gouault-Heilman, M., Imbert, M., 1996. Aide mémoire d'Hématologie. 5^eédition 1996.

Sushma Naithani, Sneha Sudha Komath, Arthur Govindjee Nonomura, Govindjee (2021) Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond ,Journal de physiologie végétale 266, 153-531 ,

Sylvie Faucher ,1989,Propriétés d'anticorps monoclonaux dirigés contre un récepteur de la PHA chez les splénocytes porcins , universite de sherbrooke .

Tatiana O. Mizgina, Sergueï N. Baldaev, Galina N. Likhatskaya, Valentina I, 2023,Clonage moléculaire et caractéristiques d'une lectine du bivalve *Glycymeris yessoensis* Journal Drogues marines 21 (2), 55.

TOUMI Mohammed Esseddik , (2021) , Purification et caractérisation des lectines à partir des champignons : *Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus* avec des tests biologiques .

Traoré Oumou , (2002) , Phénotype érythrocytaires dans les systèmes de groupes sanguins immunogènes chez les donneurs de sang de Bamako ;Université de Bamako Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie .

WJ Peumans, EJ Van Damme,(1995), Les lectines comme protéines de défense des plantes. Physiologie végétale 109 (2), 347-352..

Annexes

ANNEXES

Annexe

Annexe 1 : Préparation des tampons

Composition	PM (g/mol)	Molarité mM	PBS-EDTA Disodique pH7.4 10X	PBS 1X(10mM)pH8.4		
				NaCl0.5M	NaCl1M	NaCl2M
Na ₂ HPO ₄	141.96	10	14.196 g	1.4196g		
KH ₂ PO ₄	136.086	2	2.7g	0.27g		
KcL		2.7	2g	0.2g		
Nacl	58.44	137	80g	29.22g	58.44g	116.88g
EDTA-Na ₂	372.24	2	7.44g	/	/	/
MilliQ	/	/	1000 mL			

-Préparation des solutions tampons à différents pH (2 - 9) avec 20 mM de concentration par la titration

Tampon	PH	Molarité	Composition	Quantité	volume
Glycine- HCl	2	20mM	Glycine	1.5014g	1000mL
			HCl	Quelques gouttes	
Citrate- phosphate	4 et6		Acide citrique	3.842g	
			Phosphate disodique	2.8388g	
Glycine- NaOH	10		Glycine	1.5014g	
			NaOH	0.8g	

Annexe 2

Dosage des protéines 'méthode du Bradford, 1976'.

A_ Préparation du réactif de Bradford

1- Dissoudre 100 mg de Coomassie Blue R-250 dans 50 ml d'éthanol à 96° ou d'éthanol absolu et ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique ou phosphorique à 85%.

2-Mets sous agitation, ajoutez de l'eau distillée et remuez jusqu'à ce que le volume final atteigne 1L.

3-Après agitation, filtrer le mélange trois fois à travers du papier filtre Whattan n° 3 ou jeter l'excédent de fraction non dissoute de bleu de Coomassie.

4- Conserver les réactifs à l'abri de la lumière à 4°C au réfrigérateur.

B- Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA

Utiliser une solution mère de BSA (Sigma) préparée à une concentration de 1 mg/mL.

Tampon PBS 10 mM pH 7,4 dilutions 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 et 1000 µg/ml en double pour chaque dilution.

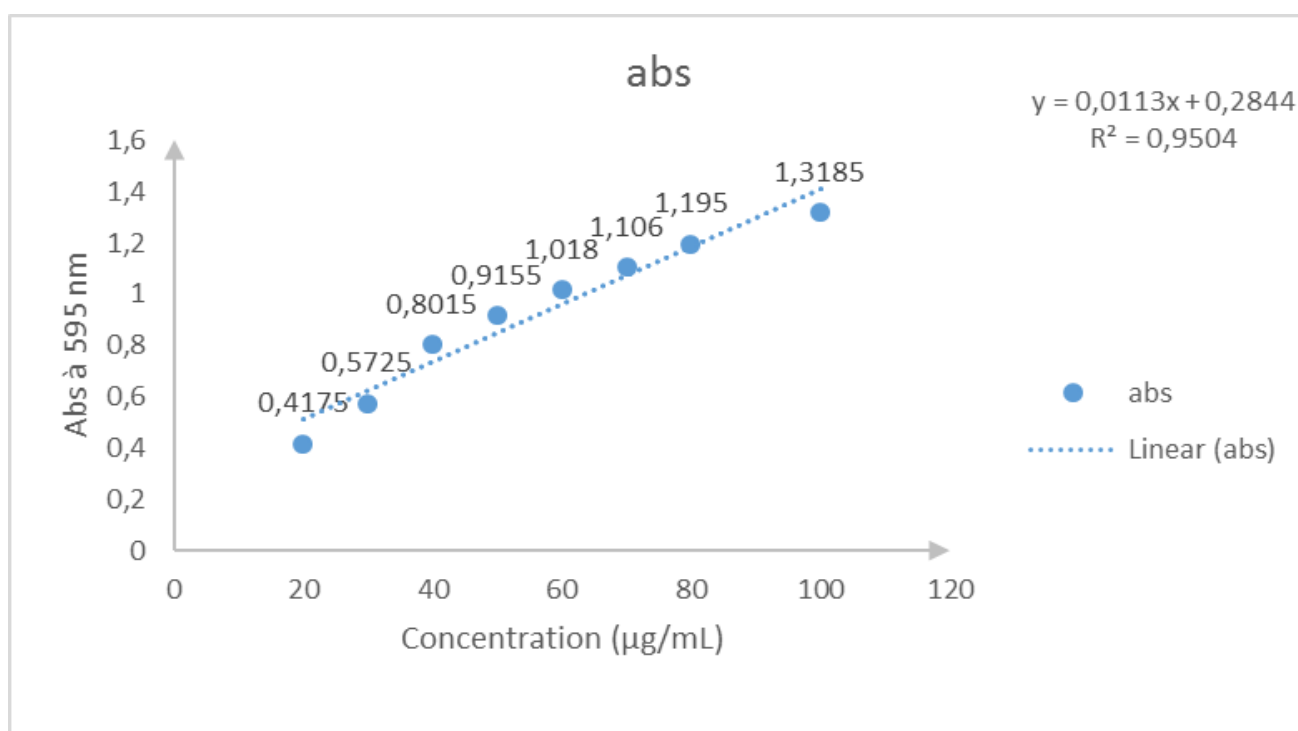
Dilution(ug mL BSA)	200	300	400	500	600	700	800	1000
BSA(1 mg ml ul)	20	30	40	50	60	70	80	100
Eau Distillée(ul)	80	70	60	50	40	30	20	0
Reactif de Bradford(ml)	2 ml							

Le protocole recommande d'utiliser 2mL du réactif de Bradford pour traiter chaque cent microlitre d'échantillon. Après une incubation de 5 à 10 minutes dans l'obscurité, les mélanges réactionnels doivent être lus à λ 595 nm avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-visible.

Les densités optiques mesurées à 595 nm correspondent à la gamme

Annexe

Concentration de BSA(1 mg/ml ul)	20	30	40	50	60	70	80	100
DO 1	0.413	0.555	0.807	0.898	1.015	1.096	1.202	1.319
DO 2	0.422	0.590	0.796	0.933	1.021	1.116	1.188	1.318
Moyenne	0.4175	0.5725	0.8015	0.9155	1.018	1.106	1.195	1.3185



$$y = 0,0113x + 0,2844$$

La gamme d'étalonnage de BSA

Année universitaire: 2022 - 2023

Présenté par : LABIOD Wiam
SAKHRI Marwa

L'extraction des lectines À partir d'ocimum basilicum avec les tests biologiques

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

Résumé:

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines ubiquitaires d'origine animale ou végétale. Notre recherche est basée sur des études d'extraction de différentes propriétés et spécificités des lectines contenues dans des plantes médicinales *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, et *Salvia rosmarinus* par des tests d'agglutination et leurs études biologiques.

L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon.

L'extrait du *Ocimum basilicum* montre une très forte agglutination vis-à-vis des globules rouges de lapin.

Les résultats montrent que les extraits *Ocimum basilicum* agglutinent avec tous les types du groupe sanguins humain ABO.

Traitement thermique les lectines de ce type espèces gardent leur activité d'agglutination lors de leur exposition à différentes gammes de traitement thermique De 40°C jusqu'à 100°C. Hémagglutinante des lectines de *Ocimum basilicum* reste stable de pH égale 7 Sauf avec (pH 3,4,6,9) (Montrent une absence d'agglutination).

Les tests d'inhibition avec différents monosaccharides montrent que L'extrait de basilic d'*Ocimum* a été inhibé par le fucose. Par contre une absence d'inhibition avec les autres sucres (Maltose, lactose, Mannose, cellobiose, fructose, sorbitol, Mannitol).

La purification sur colonne de Sephadex G-50 a montré un deux pics.

Mots clés : Lectines, Extraction, Hémagglutination, Système ABO, Inhibition, Monosaccharides, protéines.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de recherche DVRP (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président du jury : Mme. BAHY Ahlem (MCA – UFM Contantine 1)

Encadreur : NECIB Youcef (Professeur- UFM Contantine1)

Examineur : DJEMAI-ZOGLACHE Soumia (MAA. UFM Contantine1)