



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
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie 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 Moléculaire et Santé

Thème:

Mise en évidence des propriétés hémmagglutinantes des lectines de *Aloé-véra*

Présenté et soutenu par :

Le : 12/07/2015

BOUTEBAKH NABIL

TAIK MERIEM

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. NECIB.Y

Pr (Université des Frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : Mr .ZITOUNI .A

M.C (Université des Frères Mentouri Constantine).

Examineur : Melle. BAHI. A

M.C (Université des Frères Mentouri Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015



Remerciements

Tout d'abord merci beaucoup à Dieu le tout puissant qui nous a donné la patience, la force et le courage pour avoir pu mener à terme ce travail.

Il nous est agréable *d'exprimer notre plus profonde gratitude et remerciements les plus sincères à notre encadreur Mr. Zítouní A. Maître de conférence à l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour son aide, ses orientations judicieuses sa disponibilité, sa patience et surtout sa confiance. Qu'il trouve ici un hommage vivant à sa haute personnalité.*

C'est avec un grand plaisir que nous remercions Mr. NECIB .Y. Professeur à Université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de ce mémoire.

Et nous tenons à adresser notre profonde *gratitude* et notre grande reconnaissance et remerciements à *Melle BAHJ. Maître de conférence à l' Université des Frères Mentouri de Constantine d'avoir acceptée de faire partie du jury, ainsi qu'à sa contribution à la réalisation de la partie pratique, pour son aide ,sa patience et ses nombreux conseils tout le long de ce travail.*

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tout ceux qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience trouvent ici l'expression de nos profonde reconnaissance.

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux.

Introduction générale :1

CHAPITRE I : Les lectines

I.1.Généralités : 3

I.2.Historique :..... 3

I.3 La spécificité et l'affinité des lectines : 5

I.4.Distribution des lectines dans le monde vivant : 7

I.5. Lectines animales : 8

I.6. Localisation des lectines de vertébrés : 10

I.7. Localisation des lectines d'invertébrés :11

I. 8. Lectines de plantes : 12

I. 9. Lectines de microorganismes : 15

I. 10. Classification des lectines : 15

I. 11. Les caractéristiques physico-chimiques des lectines:16

I. 12. Fonction des lectines17

1. Fonction des lectines chez l'homme17

2. Fonction de lectines dans les plantes..... 17

I. 13 . L'agglutination cellulaire :18

CHAPITRE II : les aloes vera

III .1.Généralités :	19
III .2.ETYMOLOGIE :	19
III .3.UNE PLANTE (PRESQUE MIRACULEUSE) :	19
III .4.Description de la plante :	20
III .5.Propriétés :	20
1. PROPRIETES CICATRISANTES DANS DIVERSES AFFECTIONS DERMATOLOGIQUES :	20
III .6.Classification de l’aloe vera :	21
III .7.CARACTERES BOTANIQUES :	21
III .8. Intérêt d’Aloe Vera	23

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

III.1.les méthodes de travail	24
III.1.1. Extraction des lectines	24
III.1.2. Dosage des protéines	25
III.1.3. Test d’hémagglutination :	25
III.1.4. collecte des hématies :	25
III.1. 5. Préparation des hématies 4% :	25
III.1. 6. Les limites d’hémagglutination :	25
III.1.7. La chromatographie sur colonne de sephadex G 200	27
III.1. 8. Extraction d’extrait brut positif :	27

III.1. 9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :.....	27
1. Préparation des gels:	27
2. Tampon d'électrophorèse.....	28
3. Coloration et décoloration des gels	29

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.1.Dosage de protéines	30
IV.2.Les tests d'agglutination	31
1. 2. Résultats des tests d'agglutination réalisés avec les solutions (P1, P2 et S1, S2) en présence d'hématies de lapin 	32
IV.3.Les limites d'agglutination	33
IV.4. La chromatographie sur colonne de sephadex G 200.....	36
IV. 5. Électrophorèse sur gel SDS	40
Conclusion.....	41

Liste des abréviations

- %** : pourcent.
[] : Concentration.
μL : Microlitre.
A : Absorbance.
APS : persulfate d'ammonium.
C° : Degré Celsius.
Min : minute.
ml : Millilitre.
Nm : Nanomètre.
P1 : le précipité 1d'extrait brut recueilli après centrifugation.
P2 : le précipité de P1 après centrifugation.
PBS : tampon phosphate salin.
pH : potentiel Hydro isoélectrique.
PM : poids molaire.
S1 : le surnageant 1d'extrait brut recueilli après centrifugation.
S2 : le surnagent de P1 après centrifugation.
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.
TEMED : tétra méthylène-diamine.
Tr : tours.

Liste des figures

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

Figure 2 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers, *et al.* 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

Figure 3 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre, *et al.* 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

Figure 4 : photo d'Aloe barbadensis

Figure 5 : DESSIN REPRESENTANT LA PLANTE ENTIERE

Figure 6 : COUPE TRANSVERSALE DE FEUILLE D'ALOE VERA

Figure 7: technique d'extraction des lectines à partir des feuilles d'aloée vera

Figure 8: exemple des puits agglutinée et non agglutinés à l'œil nu et au microscope optique (G X40) réalisé au labo

Figure 9: tests d'agglutination en présence d'hématies de lapin vu à l'œil nu de P1 , P2 et S1 , S2

Figure 10: observation microscopique d'agglutinaion du précipité 1 (GX40)

Figure 11: observation microscopique d'agglutination de surnageant 1 (GX40)

Figure 12: observation microscopique d'agglutination de surnageant 1 (GX40)

Figure 13 : Aspect microscopique de quelques échantillons de différentes dilutions (GX 40)

Figure 14 : courbe représentant le profil d'élution des concentrations des fractions de précipité 1 en fonction du volume d'élution.

Figure 15 : tests d'héماغglutination de chaque fraction après chromatographie

Figure 16 : Aspect microscopique des quatre échantillons à héماغglutination positive Après chromatographie (G 200)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectines.

Tableau 2 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines .

Tableau 3 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques

Tableau 4 : concentration des protéines dans chaque fraction

Tableau 5 : les résultats des tests d'agglutination avec les solutions P1, P2, et S1, S2.

Tableau 6 : les limites d'agglutination avec le sang de lapin

Tableau 7: Dilution des proteines en (mg /ml) à 280 nm

Tableau 8 : les concentrations des protéines de chaque fraction après chromatographie .

Introduction générale

Introduction générale

Les protéines et les sucres ont un rôle métabolique majeur dans les cellules également dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire qui sont assurés par les lectines.

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître des hydrates de carbone de manière spécifique et réversible. Elles se retrouvent chez toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux (Goldstein, 1978). L'activité d'association au glucide est différente d'une espèce à l'autre.

Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle mais la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixante, en concomitance avec la glycobiologie.

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

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

Les lectines comportent plusieurs sites de liaison des saccharides et elles sont considérées comme des protéines multivalentes. Cette structure polyvalente

Introduction générale

confère aux lectines l'aptitude d'agglutiner des cellules portant sur leur membrane externe les fractions saccharidiques appropriées.

Dans le cadre de notre mémoire de master, nous nous sommes intéressés à l'extraction des lectines contenues dans les feuilles de l'aleo vera (*aloe vera Barbadosis*), à une purification partielle de ces glycoprotéines et à mettre en évidence leur propriétés hémagglutinantes .

Notre travail est constitué de deux parties, une première partie bibliographique comportant deux chapitres :

- 1- Généralités sur les lectines
- 2- Généralités sur la plante (*aloe vera Barbadosis*)

Une deuxième partie représente notre travail personnel, elle est constituée également de deux chapitres :

- 1- Matériel et méthodes
- 2- Résultats et discussions

Notre mémoire se termine par une conclusion générale.

I.1.Généralités :

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

I.2.Historique :

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon and Lis 2004**). A partir de ce moment là, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes.

En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and Shapleigh 1954**). Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin *legere* qui veut dire « sélectionner ».

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (**Rüdiger 1993**) et leur caractérisation (**Goldstein, et al. 1980**). Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (**Van Damme, et al. 1998**).

Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (**Varki 1993**). Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. **La Figure 1** donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.

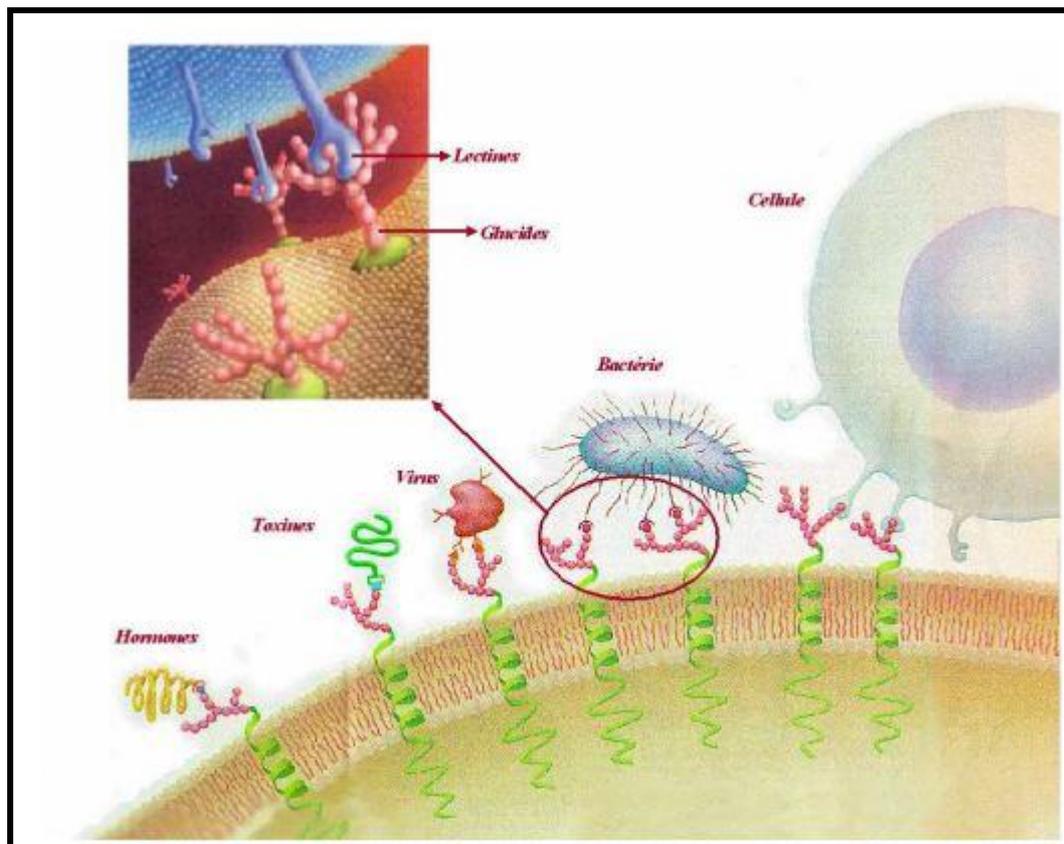


Figure 1 : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire.
Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides
(KAROLINE SABOIA ARGAO.)

I.3 La spécificité et l'affinité des lectines :

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité:

- 1- le mannose (Man)
- 2- le galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc)
- 3- le N-acétylglucosamine (GlcNAc)
- 4- le fucose (Fuc)
- 5- l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (Lis and Sharon 1998).

Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides.

Le constante de dissociation pour les monosaccharides est de l'ordre du millimolaire (mM), en revanche, pour les oligosaccharides elle est de l'ordre du micromolaire (μM) (**Dam and Brewer 2002**). Enfin, certaines lectines telles que PHA-L et PHA-E de *Phaseolus vulgaris* reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Cummings and Kornfeld 1982**).

Les similarités structurales entre les monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc.

Certaines lectines peuvent reconnaître le mannose et le fucose telles que DC-SIGN de mammifère (**van Liempt, et al. 2006**) ou PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* (**Imberty, et al. 2004**). Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire.

Certaines lectines aussi présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 de monosaccharides tels que l' α -methyl-galactoside et le β -methyl-galactoside. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park, et al. 2008**).

Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » (glycochips avec différents mono et oligosaccharides) la spécificité d'une lectine peut être déterminée.

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

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

Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multivalente plutôt qu'une seule interaction forte. Ainsi, ils peuvent assurer une haute spécificité et affinité entre ces récepteurs et les surfaces cellulaires des systèmes biologiques.

I.4.Distribution des lectines dans le monde vivant :

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants. Il existe une grande variété de lectine qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines .

La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont 6 d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 familles d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1 famille d'algues, Tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectines.

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

I.5. Lectines animales :

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

1-les galectines :

Les structures de *galectines* sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le b-galactose et plus précisément pour le lactose (bGal1-4Glc) et le Nacetyllactosamine (bGal1-4GlcNAc) (**Leffler, et al. 2004**).

La première structure tridimensionnelle d'une galectine humaine (la galectin-7 (hGal-7)) a été obtenue dans sa forme native et complexée avec le galactose, le galactosamine, le lactose, et le *N*-acétyllactosamine (**Leonidas, et al. 1998**).

2-les lectines de type C :

Les lectines du *type C* présentent un CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) bienconservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (**Drickamer1993**). On lestrouve soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers, et al. 2000**), Figure 2

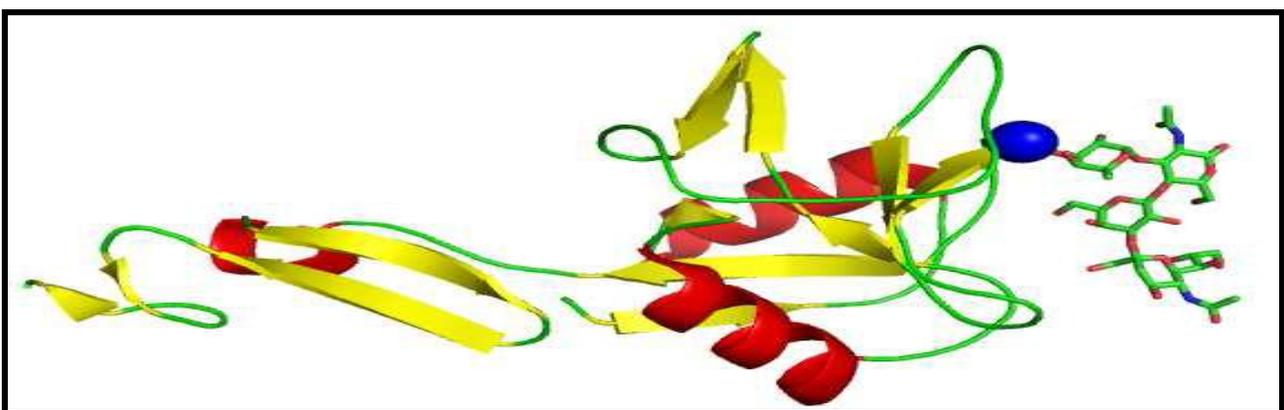


Figure 2 : Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers, et al. 2000**). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

3-Les *Siglecs* ou lectines de type I : constituent une famille de lectines qui reconnaissent

Les autres classes de lectines animales comprennent **les lectines du type P** qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CDMPR (**Roberts, *et al.* 1998**).

I.6. Localisation des lectines de vertébrés :

La plupart des lectines de vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes.

Rôle des lectines de vertébrés :

- un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire.

Exemple : dans le processus de fécondation, un glycoconjugué de la surface de l'ovule interagit avec une lectine (spermadhésine) du spermatozoïde (**Topfer-Petersen, *et al.* 1998**). Il a été aussi montré que l'embryon exprime à sa surface cellulaire la L-sélectine six jours après la fécondation. En se liant aux sucres spécifiques de l'endothélium utérin, la L-sélectine détermine ainsi la première étape indispensable à la fixation du blastocyste à la surface de l'endomètre et permet le début de la grossesse (**Genbacev, *et al.* 2003**).

I.7. Localisation des lectines de invertébrés :

La présence de lectines a été démontrée chez les invertébrés terrestres ou marins. Ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et présentent donc des spécificités pour les glucides présents à la surface d'organismes pathogènes (**Vasta 1992**).

Chez les invertébrés, les lectines sont distribuées dans toutes les classes et sous-classes étudiées. Nous pouvons donner en exemple : les gastéropodes avec la lectine d'escargot CHA-II de *Cepaea hortensis* (**Gerlach, et al. 2002**),

les échinodermes avec l'hémagglutinine de l'oursin *Hemicentrotus pulcherrimus* (**Yamada and Aketa 1982**)

les crustacés avec la lectine du crabe *Charybdis japonica* (**Umetsu, et al. 1991**)

les insectes avec la lectine du sphinx du tabac *Manduca sexta* (**Yu and Kanost 2000**).

Les lectines présentent des localisations variées : système digestif, appareil de reproduction, hémolymphe ou branchies.

Un nombre limité de lectines d'invertébrés a été cristallisé. La codakine purifiée à partir des branchies de la palourde blanche *Codakia orbicularis* est une lectine de type C qui a une forte spécificité pour des N-glycannes biantennés (**Gourdine, et al. in press**).

D'autres exemples de lectines de type C sont la lectine de tunicier *Polyandrocarpa misakiensis* (Poget, *et al.* 1999) et la lectine I (CEL-I) du concombre de mer *Cucumaria echinata* (Sugawara, *et al.* 2004).

Les structure 3D de lectines de type ricine ont aussi été obtenues telles que la lectine III (CEL-III) du même concombre (Uchida, *et al.* 2004)

la lectine du vers de terre *Lumbricus terrestris* (Suzuki, *et al.* 2004), ces deux lectines présentant une spécificité pour le galactose. La limule, *Tachypleus tridentatus*, est un fossile vivant qui présente un grand nombre de lectines impliquées dans l'immunité innée. Les structures de la tachylectine 2, un b-propeller (Beisel, *et al.* 1999) et de la tachylectine 5A, une protéine de type fibrinogène (Kairies, *et al.* 2001), ont été résolues en complexe avec le GlcNAc.

La structure de la lectine extraite de l'escargot *Helix pomatia* (HPA) (Sanchez, *et al.* 2006) a permis de définir une nouvelle famille de lectine, le type H, qui sera décrite dans la Section 1.3.7

I. 8. Lectines de plantes :

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

Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (Edelman, *et al.* 1972, Hardman and Ainsworth 1972). Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé «jelly roll » formé par deux feuillets

superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variété d'assemblage macromoléculaires sous la forme de dimères ou de tétramères (**Sinha, et al. 2007**). La Figure 3 représente un tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose (**Delatorre, et al. 2006**).

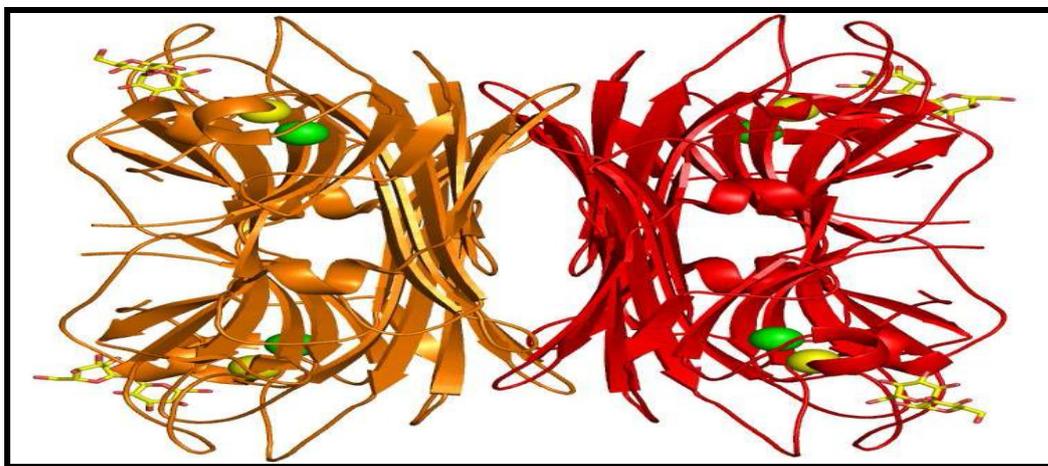


Figure 3 : Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre, et al. 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

La géométrie du site de fixation est fixée par la présence d'un ion manganèse et d'un ion calcium qui sont proches du ligand glucidique mais qui n'interagissent pas directement avec lui. Les variations en acides aminés autour du site de reconnaissance apporte la spécificité pour différents monosaccharides et oligosaccharides (**Loris, et al. 1998**).

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est

* la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (**Wright, C. S. 1980**).

*La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) (**Wright, C.S. and Hester 1996**).

* La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose telle que la jacaline isolée des graines de *Artocarpus integrifolia* (**Sankaranarayanan, et al. 1996**).

* La famille Amaranthaceae contient la lectine ACA de *Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée avec le Galb1-3GalNAc (**Transue, et al. 1997**).

*La famille Euphorbiaceae englobe les lectines qui présentent une grande toxicité, un exemple de lectine de cette famille est la lectine RCA isolée des graines de ricin *Ricinus communis*. La ricine est un hétérodimère où la chaîne B constitue les domaines lectines qui reconnaissent le galactose (**Rutenber, et al. 1991**).

*La famille Solanaceae englobe les lectines de pommes de terre et des tomates mais aucune structure n'a encore été déterminée.

Rôle des lectines de plantes :

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Chrispeels and Raikhel 1991, Rudiger and Gabius 2001**).

I. 9. Lectines de microorganismes :

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imberty and Varrot 2008**). L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (**Weis, et al. 1990**).

I. 10. Classification des lectines :

Selon la classification de (**PEUMANS W.I. et V. DAMME J.M. ;1995**) trois types majeurs de lectines sont présentes chez les plantes :

1-Les Mérolectines :

Des petites peptides, formé d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides. Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules. (**PEUMANS W.I. et V. DAMME J.M. ;1995**)

2- Les hololectines :

Contiennent deux domaines ou plus de liaison aux glucides quasi identiques, ou du moins très homologues. les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules. la majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines. (**PEUMANS W.J. et V.DAMME J.M. ;1995**)

3- les chimérolectines :

Possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-RIP Ribosom inactivating Proteine inactivant les ribosomes comme la ricine) (**PEUMANS W.J. et V.DAMME J.M.,1995**).

I. 11. Les caractéristiques physico-chimiques des lectines :

* Variété des lectines purifiés comprennent des sucres liés de façon covalente à la chaîne polypeptidique, et ils sont de ce fait des glycoprotéines (**PUSTZAI , 1991**) cependant, des lectines comme la conA et la GNA (Galanthus nivalis agglutinine) ne sont pas glycosylés (**SHIBUYA et al., 1998**)

* La masse moléculaires des lectines varie énormément d'une molécule à l'autre, l'agglutinine d'UrticadioicaL. est une très petite à une masse moléculaire de l'ordre de 8 à 9 KDa (**BROOKER et al., 2001**) alors que celle de *PHaseolus lunatus L.* est de 245 KDa (**SAUVION., 1995**).

* lectines sont des protéines oligomériques formé de dimère ou tétramère avec forte conservation de la sous unité monomérique qui peut être oligomériser par différents méthodes. (**REMY LORS et al., 1998**)

*pour certaines lectines, l'activité biologique est associée à la présence de cations bivalents. Ainsi, la ConM est une métalloprotéine, dont l'activité biologique nécessite obligatoirement la présence de manganèse (Mn^{2+}) et de calcium (Ca^{2+}) (**DELATORRE, et al., 2006**)

I. 12. Fonction des lectines :

1. Fonction des lectines chez l'homme :

*Les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification de glycoconjugués par spécificité, amènent aussi à leur caractérisation. (**HIRABAYASHI., 2004**)

*Certains lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains. (**BOYD et SHAPLEIGH., 1954**)

*Des lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales ont des propriétés anti-inflammatoires. (**ALENCAR et al., 2005**)

*Lectine extraite à partir de *S. littoralis* a des activités antimicrobiennes. (**SEUFI. et al., 2012**)

*Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques dans des cas de maladies telles que le cancer qui sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**GUILLOT et al., 2004**) ; c'est le cas de HPA est une protéine actuellement largement utilisée en histopathologie comme marqueur spécifique de certains cancers. (**DENNIS, et al., 1999**) .

2. Fonction de lectines dans les plantes :

Les premiers travaux sur les lectines sont principalement dirigés vers les protéines des graines, mais leur distribution ne se limite pas seulement à cet

organe de réserve. Des lectines sont détectées aussi bien dans les feuilles, que dans les tiges ou les racines. (SAUVION., 1995)

*des nombreuses fonctions ont été proposées pour les lectines végétales tel que la protection contre les pathogènes et les insectes, le transport et le stockage des glucides et la reconnaissance cellulaire (dans la cellule, entre les cellules ou entre organismes). (PUSTZAI., 1991)

Elles ont été également considérées comme des protéines de réserve ou comme des régulateurs de croissance. (PUSTZAI., 1991)

I. 13 .L'agglutination cellulaire :

Beaucoup de lectines sont déjà décrites dans la littérature scientifique. Des nombreuses lectines sont capables de se fixer aux cellules sanguines et provoquer leur agglutination. On parle alors de phyto-agglutination et plusieurs d'entre elles le font avec une spécificité de groupe. C'est pourquoi celles-ci sont utilisées comme réactif de groupage ; c'est le cas de la lectine de *dolichos biflorus* qui agglutine spécifiquement les hématies A1. (BIRD., 1951)

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (GOLDSTEIN, et al. 1980 ; RUDIGER, 1993), 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 (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse et sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimale de lectine montrant une agglutination évidente. Les érythrocytes de plusieurs mammifères sont parmi les plus utilisées (humain, lapin, mouton, porc, etc...). (KAROLINE SABOIA ARAGAO., 2009).

II .1.Généralités :

A travers les âges, l'aloé a été vénéré par de nombreuses civilisations et cultures, tant et si bien qu'il a acquis le nom de plante divine. A l'heure actuelle, personne ne peut vraiment dire de quand datent les premières traces d'utilisation de l'aloé en tant que plante médicinale. Cependant, on dispose de nombreuses preuves qui montrent qu'il est utilisé depuis plus de 5000ans, dans des régions du Monde aussi éloignées les unes des autres, telles que le sud de l'Europe, l'Asie, le nord de l'Afrique, l'Amérique et l'Extrême Orient.

II .2.Etymologie :

On pense aujourd'hui que le mot « aloès » est dérivé d'un ancien mot arabe « alloeh », qui signifie « substance amère qui brille », tandis que « véra » est le mot latin pour « vrai », parce que depuis la nuit des temps, cette espèce a été considérée comme la plus efficace en termes d'utilisation thérapeutique et médicale générales (**A. BARCROFT,1998.**)

II .3.Une plante (Presque miraculeuse) :

L'aloé Véra (*Aloe barbadensis*), l'une des 300 espèces d'aloès, est originaire de la Péninsule Arabique, d'Afrique du Nord, des îles Canaries et du Cap-Vert. C'est une plante vivace connue depuis l'Antiquité en Mésopotamie, dans l'Égypte pharaonique (on dit que Nefertiti et Cléopâtre en usaient quotidiennement) et dans la Grèce antique. Elle est aussi connue depuis des millénaires en Chine et dans la culture Maya. (**Nicolas MARTIN.2011**)



FIGURE 4 : photo d'*Aloe barbadensis*

II.4. Description de la plante :

On reconnaît l'aloé véra à ses feuilles épineuses qui peuvent atteindre 60/80 centimètres de haut et ses fleurs jaunes ou parfois oranges. C'est une plante dépolluante. La feuille d'aloé véra, qui peut atteindre un poids de 2 kg (à Madère), contient plus de 75 éléments nutritifs, une vingtaine de minéraux, 18 acides aminés et 12 vitamines (COLLINS E, COLLINS C. ROENTGEN. 1993).

II.5. Propriétés :

On la trouve dans la plupart des régions tropicales ou subtropicales, et même dans le sud de l'Europe. Certaines espèces utilisées en corderie, fournissent jusqu'à l'apparition des fibres synthétiques, une matière première naturelle imputrescible pour la fabrication des cordages marins. Aujourd'hui encore, on en fait dans certaines parties du monde, des nattes et des tissus très résistants (M. SCHWEIZER, 2012)

1. PROPRIETES CICATRISANTES DANS DIVERSES AFFECTIONS DERMATOLOGIQUES :

In vitro, la capacité cicatrisante de la plante s'explique par le fait que certains de ses composants augmentent la réticulation des tissus et la synthèse de collagène par stimulation de la production de cytokines et macrophages. L'acemannan contenu dans le gel est responsable de la stimulation de la production de macrophages (ZHANG L, TIZARD IR., 1996)

Les polysaccharides contenus dans le gel d'*Aloé véra* seraient bénéfiques pour la protection des cellules épithéliales en favorisant la prolifération cellulaire en induisant la progression des cellules épidermiques de la phase G0/G1 G2/M et S (CHEN XD, WU BY, JIANG Q, WANG SB, HUANG LY, WANG ZC., 2005)

Ils favoriseraient également la prolifération des fibroblastes et la production d'acide hyaluronique et d'hydroxyproline dans ces cellules. Ils joueraient donc un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de la cicatrisation des plaies (LIU LY, CHEN XD, WU PAR, JIANG., 2010)

L'acide ascorbique présent dans l'*Aloé vera* améliore la synthèse du collagène et contrebalance sa dégradation (STONE N, MEISTAR A., 1965)

Comme le gel est composé essentiellement d'eau, il empêche le dessèchement de la plaie et augmente la migration des cellules épithéliales (NICIFOROVIC A, ADZIC M, ZABRIC B, RADOJCIC MB., 2007)

II .6.Classification de l'aoé vera : (Emmanuel morin .,2008)

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne :	<i>Tracheobionta</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe :	<i>Liliidae</i>
Ordre :	<i>Liliales</i>
Famille :	<i>Aloeaceae</i>
Genre :	<i>Aloe</i>

II .7.Caractères Botaniques :

L'Aloès est une plante vivace sans tige originaire d'Afrique équatoriale de la famille es liliacées.

C'est une plante charnue, adaptée aux périodes de sécheresse et au climat chaud, ses feuilles épineuses peuvent atteindre 60 cm.

Les feuilles en bouquet sont charnues, lancéolées, épaisses, rigides et à bord épineux. Les fleurs sont jaunes réunies en grappe portée par une hampe florale de grande taille. Le fruit est une capsule. (BERNARDES I., 2012)

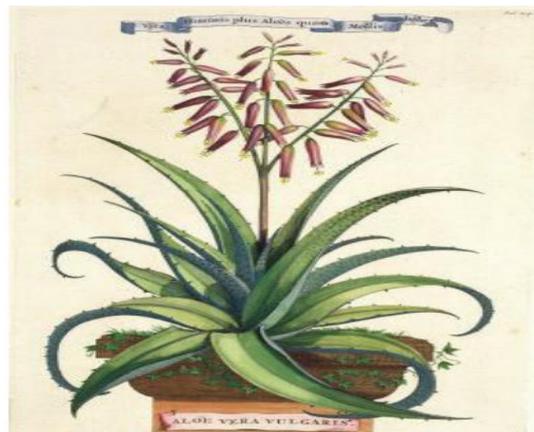


FIGURE 5 : DESSIN REPRESENTANT LA PLANTE ENTIERE

Feuille :

Sur la tige robuste, très courte et ligneuse, se dressent des feuilles vertes de plus de 80cm, charnues, à cuticule épaisse et bords épineux, disposées en rosette (**B. BOULLARD**). La forme caractéristique des feuilles a valu à la plante le surnom de « langue de crocodile », sans nul doute une particularité idiomatique de la région du monde où elle s'est fait le plus connaître.

La coupe transversale de la feuille permet de distinguer successivement, en allant de l'extérieur vers l'intérieur : la cuticule, une couche épidermique chlorophyllienne ; un derme cellulosique dans lequel circule une sève (ou suc) rouge brunâtre, substance très amère ; et enfin, au centre, la pulpe proprement dite, parenchyme mucilagineux incolore très épais qui contient le fameux gel, partie la plus riche et la plus active de la plante contenant les nombreuses substances thérapeutiques (vitamines, acides aminés, minéraux, oligo-éléments, sucres, enzymes,...) (**ZHANG L, TIZARD IR**)

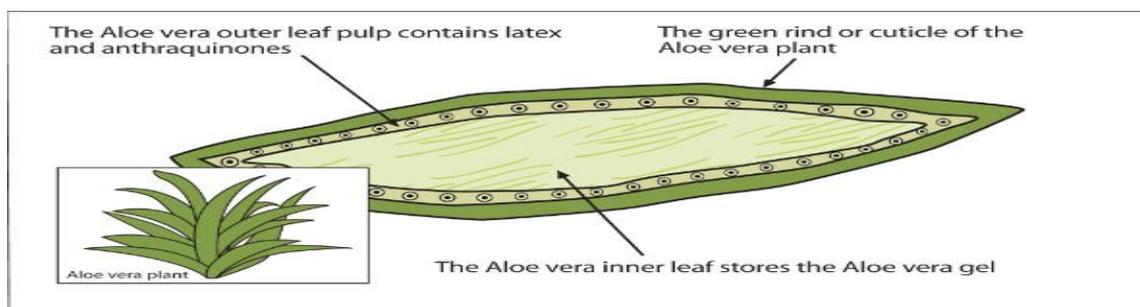


FIGURE 6 : COUPE TRANSVERSALE DE FEUILLE D'ALOE VERA

A l'heure actuelle, seule la feuille est utilisée, les autres parties telles que les racines et les fleurs ne présentent pas d'intérêt médical.

III.8. Intérêt d'Aloès Vera :

- **Brûlures.** l'application externe d'aloès peut être utile pour accélérer la guérison
- de brûlures au 1er et 2e degré. (**DEVARAJ S. et al., 2013**)

- ❖ **Lichen plan.** Il s'agit d'une maladie auto-immune qui se manifeste par des lésions sur la peau et les muqueuses. utilisation de gel d'Aloès Vera plus efficace pour
- Accélérer la guérison de cette maladie. (**SEHGAL I et al., 2013**)

- ❖ **Plaque dentaire et gingivite.** Un dentifrice contenant de l'aloès utilisé durant 30 jours n'a pas eu plus d'effets sur la plaque dentaire et la gingivite qu'un
- dentifrice fluoré ordinaire. (**QIN PAN et al., 2013**)

- ❖ **Psoriasis.** A donné lieu à deux expériences en 1996 et 2005 ; les résultats confirment que l'utilisation de la crème contenant de l'aloès est le traitement
- standard pour l'élimination de cette maladie. (**ALI SA et al., 2012**)

- ❖ **L'Aloès** est également utile pour le traitement d'autres maladies, telles que:
- La dermatite séborrhéique (inflammation du cuir chevelu)
- Les aphtes
- Les lésions cutanées causées par l'exposition professionnelle ou expérimentale.
- La douleur et la guérison après hémorroïdectomie. (**TABOLACCI C et al., 2013**)

- ❖ Est également utilisé le gel d'Aloès Vera dans les cosmétiques (gels, crèmes, écrans solaires, masques). (**HADDAD P et al., 2013**).

Notre travail a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques relevant du laboratoire de biochimie.

Nos travaux ont été effectués sur *l'aloë vera Barbadosensis*

III.1.les méthodes de travail

III.1.1. Extraction des lectines

Nous avons suivi pour l'extraction des lectines la méthode de Suzuki et al(1979) en présence de tampon phosphate (PBS, pH =8,0)

100g d'aloë-véra ont été broyés dans un mélangeur et ensuite soumis à une centrifugation à 6000tr/mn pendant 30 minutes à température ambiante.

Un dosage de protéines ainsi qu'un test d'hémagglutination ont été effectués respectivement sur le surnageant et le culot obtenus afin de repérer la présence ou l'absence de lectines. Seul le surnageant présentant une hémagglutination positive a été utilisé pour la suite des opérations. Du sulfate d'ammonium solide a ensuite été ajouté pour obtenir 40 % de saturation (40 g dans 100 ml) . Le précipité a été recueilli après centrifugation à 6000tr/mn pendant 30mn est dissous dans du tampon carbonate – bicarbonate 0,05 M (pH 9,5) , puis re-centrifugé. De l'acide acétique 1 M a été ajouté au surnageant pour amener le pH à 4,4 . Le précipité est ensuite dissous dans suffisamment de tampon phosphate (0,01 M pH 8,0) jusqu'à dissolution complète .Ce dernier a été soumis à une Chromatographie sur colonne sur gel Sephadex G- 200 équilibrée et éluée avec le même tampon phosphate (0,01 M pH 8,0) ,avec un débit d'environ 0,5ml/mn. Toutes les fractions obtenues ont fait l'objet d'un dosage de protéines à 280nm et 260nm, et seules les fractions contenant des protéines subiront un test d'hémagglutination.

Une électrophorèse SDS page en conditions dénaturantes et non dénaturantes sera réalisée pour apprécier l'état de pureté de nos échantillons partiellement purifiés.

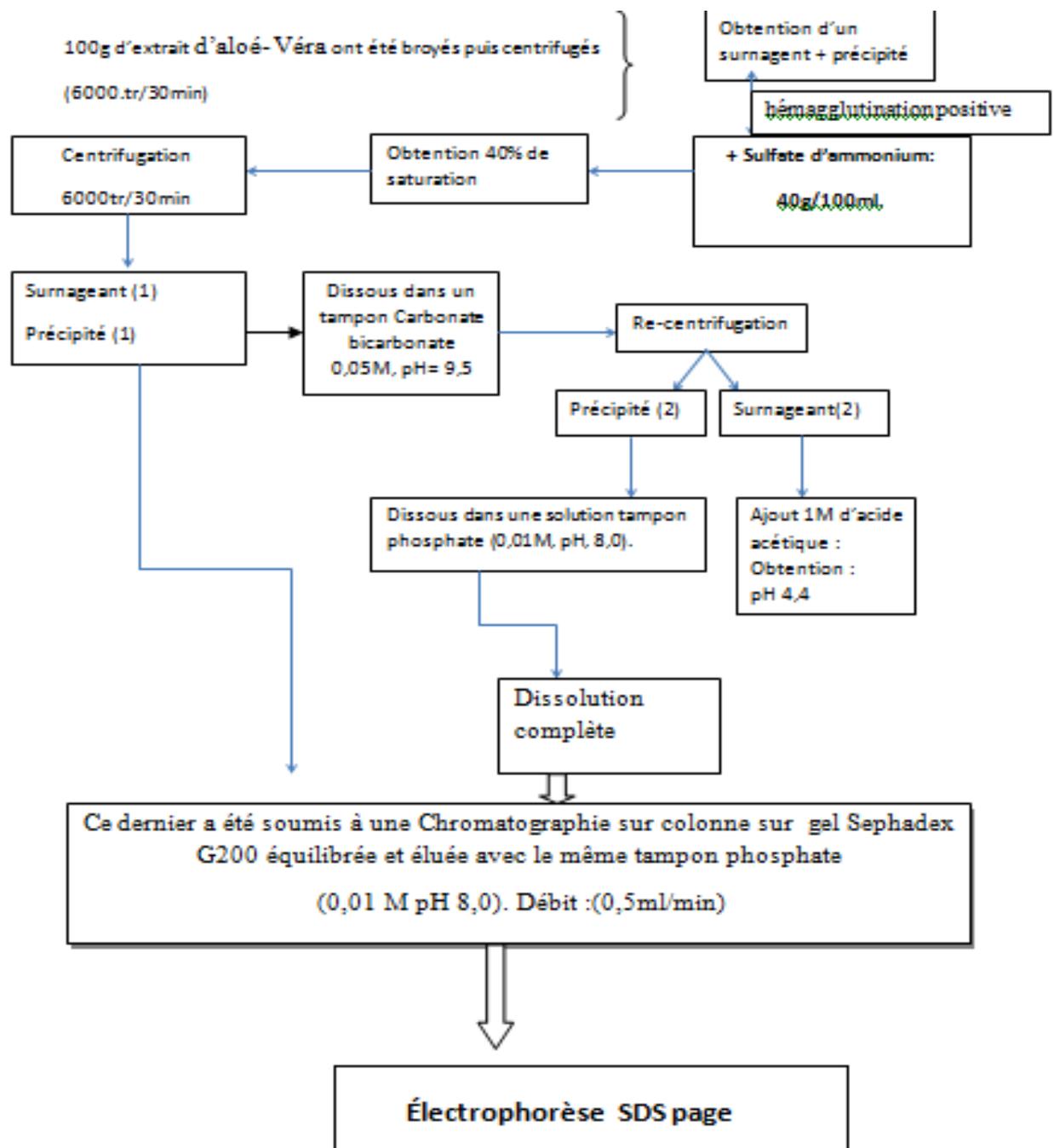


Figure 7: technique d'extraction des lectines à partir des feuilles d'aloé vera

III.1.2. Dosage des protéines

Nous avons procédé au dosage des protéines en mesurant l'absorbance au spectrophotomètre des différents extraits à 280nm pour les protéines et 260 pour les acides nucléiques éventuellement présents dans nos extraits qui contaminent souvent les préparations de protéines ; méthode développée par Warburg et Christian(1941) qui ont étudié les propriétés spectrales de ces macromolécules pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques . Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à 280nm, pour les protéines, et à 260nm pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

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

III.1.3. Test d'hémagglutination :

Ce test est réalisé sur les hématies de lapin, dans des microplaques de titration de 96 puits qui serviront au dépôt de l'extrait de l'aloé-vera , du PBS ,et des érythrocytes de lapin , pour mettre en évidence le processus d'agglutination visuellement par le microscope optique après une heure d'incubation à température égale à 37°C.

III.1.4. collecte des hématies :

Les hématies de lapin ont été obtenues à l'animalerie de l'Université des frères Mentouri de Constantine

III.1. 5. Préparation des hématies 4% :

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de Higuichi et al (1989) avec quelques modifications.

Dans un tube héparine, le sang de lapin est recueilli dans du NaCl à 9g/l . Le mélange est ensuite centrifugé à 4000t/ mn pendant 10mn, a température

ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est redissous, et remplacé par le tampon phosphate salin, puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Cette opération a été reprise trois fois (la transparence du surnageant nous indique l'arrêt de l'opération de centrifugation). Le culot obtenu est dilué dans du PBS à raison de 1ml de culot pour 24 ml de PBS, afin obtenir une suspension d'hématies à 4%.

III.1. 6. Les limites d'hémagglutination :

La mesure de l'activité hémagglutinante et le test le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**goldstein, et al .1980 Rudiger**). A l'aide d'une micropipette, 50µl de solution tampon phosphate ont été ajoutés dans chaque puits de la microplaque, suivis de 50µl d'extrait brut d'aloé- vera, qui lui est placé uniquement au niveau du premier puits. On mélange bien l'ensemble et on reprend 50µl du premier puits pour l'ajouter au second puits et ainsi de suite jusqu' au douzième puits. On fera en sorte de jeter 50 µl du mélange à partir du dernier puits pour respecter les taux de dilutions de chacun d'eux.

La lecture a été effectuée 1 heure après le dépôt des hématies à 37°C , au microscope optique.

III.1.7. La chromatographie sur colonne de sephadex G 200

1. préparation de la colonne de sephadex

-Le gel sephadex G-200 est mis à gonfler dans du PBS à raison de [35-40] ml par gramme, selon les recommandations du Producteur. (Healthcare), et incubé à 90°C au bain marie pendant 5heures.

- Le séphadex est ensuite placé dans une colonne chromatographique
-Lors du remplissage, bien faire attention à la présence des bulles d'air : le remplissage de la colonne doit-être parfaitement homogène.
(MCCLOUGHLIN D.J. , 1992).

La forme d'une colonne de filtration devrait être étroite et longue pour une meilleure séparation, les molécules sont uniquement séparées en fonction de leur taille et donc de leur poids moléculaire. L'intervalle de fractionnement des protéines du sephadex G200 se situe entre [5000 - 800 000] Daltons.

III.1. 8. Extraction d'extrait brut positif :

Après la préparation de la colonne de séphadex, on laisse le gel se stabiliser en prenant soin d'ajouter du tampon(PBS). L'extrait brut est ensuite ajouté dans la colonne. L'élution se fera grâce au PBS. Des fractions de 5 ml chacune seront collectées avec un débit d'environ 0,5ml/mn .

Le volume mort a été auparavant déterminé au bleu de Dextran.

Une lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 280 nm puis à 260 nm et des tests d'agglutination seront réalisés sur chaque fraction.

III.1. 9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :SDS page

1. Préparation des gels:

-Le gel de séparation est utilisé à T=12,8% (T=acrylamide +bis acrylamide à 35% (P/V), il contient du N,N-méthylène-bis acrylamide à 2%, du tris HCl 1M à pH 8,8, du SDS à 10% et de l'eau distillée (annexe I).pour favoriser la polymérisation on ajoute des catalyseurs: persulfate d'ammonium (APS) à 1% P/V et la tétra méthylène-diamine (TEMED).

-le gel de concentration est préparé à T=2,8% avec du tris HCl Ph 6.8.

2 .Tampon d'électrophorèse:

Les cuves d'électrophorèse sont remplies avec un tampon composé de glycine, tris et d' SDS

La migration est menée à une intensité de courant de 80mA par gel , pendant environ 3heures.

3 .Coloration et décoloration des gels:

-Après sortie du front de migration, les gels sont démoulés, les gels de concentration sont éliminés et les gels de séparation sont mis sous agitation pendant une nuit dans une solution de coloration contenant du TCA 60% et du bleu de coomassie R-250

-La décoloration se fait ensuite par des rinçages répétés à l'eau du robinet.

-Pour être conservés, les gels sont mis en agitation dans une solution de glycérol à 10% pendant une heure, puis séchés à température ambiante entre deux feuilles de polyéthylène.

-Les diagrammes électrophorétiques sont lus selon la mobilité relative et l'intensité des bandes, le PM des protéines est déterminé par rapport à des protéines marqueurs de masse moléculaire connue, commercialisées en kit.

Les résultats obtenus sont les suivants :

IV.1. Dosage de protéines :

On a après dilution de 10 µl d'échantillon dans 3 ml de PBS , les absorbances suivantes :

Tableau 2 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines .

Tubes	S1	S2	P1	P2
Absorbances	0.450	0.324	1.100	0.748

S1: surnageant 1

S2: surnageant 2

P1: Précipité 1

P2: précipité 2

Tableau 3 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques

Tubes	S1	S2	P1	P2
Absorbances	0.471	0.366	1.164	0.712

Les concentrations réelles des protéines sont les suivants :

Les concentrations ont été calculées d'après la formule (protéines mg/ml)=
1.55A₂₈₀ -0.76A₂₆₀. (Warburg et Christian 1941)

Tableau 4 : concentration des protéines dans chaque fraction

Tubes	S1	S2	P1	P2
Concentrations (mg/ml)	102.04	77.04	246.93	186.10

Parmi les fractions de la plante utilisée, on observe que la majorité des protéines sont réparties entre le précipité 1 et le précipité 2, et dans une moindre mesure dans le surnageant 1 et 2.

Pour cela, un test d'hémagglutination est nécessaire pour nous permettre de sélectionner quelles sont les fractions qui l'on va retenir (entre le P1 et P2 ou le S1 et le S2)

IV.2. Les tests d'agglutination :

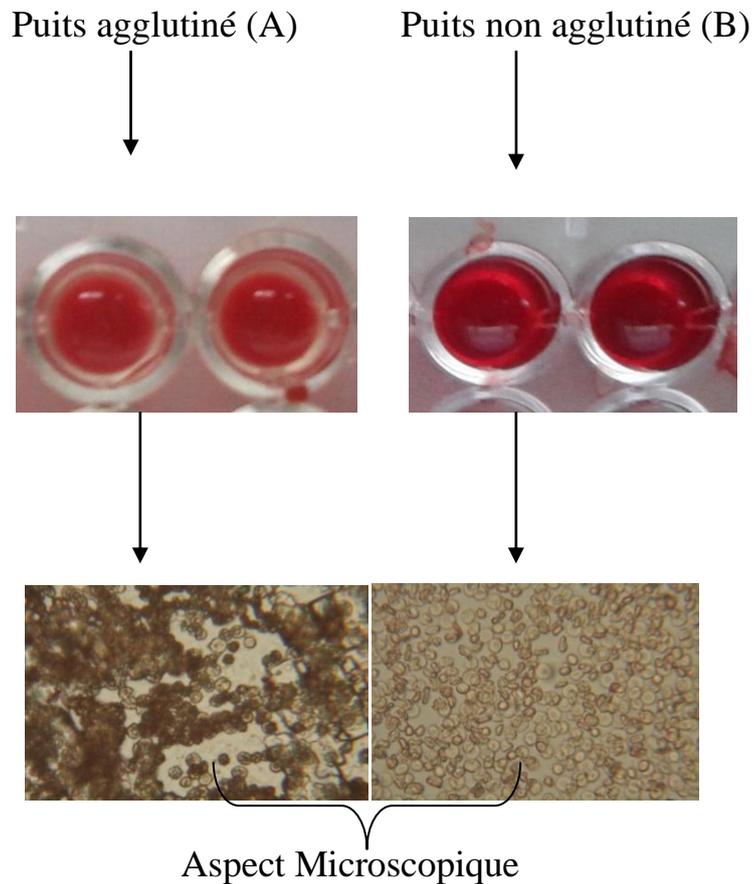


Figure 8 : exemple des puits agglutinés et non agglutinés à l'œil nu et au microscope optique (G X40) réalisé au labo

A : précipité 1 + hématies de lapin + PBS

B : hématies de lapin + PBS (témoin)

2. Résultats des tests d'agglutination réalisés avec les solutions (P1, P2 et S1 , S2) en présence d'hématies de lapin

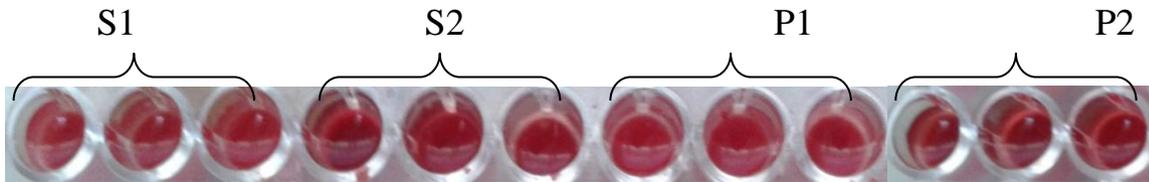


Figure 9 : tests d'agglutination en présence d'hématies de lapin vu à l'œil nu de P1 , P2 et S1 , S2 .

Tableau 5 : les résultats des tests d'agglutination avec les solutions P1, P2, et S1, S2

Extraits	Résultats
S1	++
S2	--
P1	+++
P2	--

+++ : très forte agglutination

++ : forte agglutination

-- : Absence d'agglutination

Les résultats obtenus par le test d'hémagglutination (Figure 2) montrent que seuls le Précipité 1 et le surnageant 1 donnent lieu à une réponse positive .

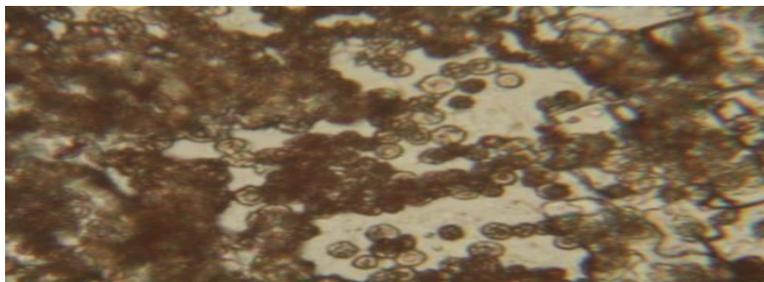


Figure 10 : observation microscopique d'hémagglutination du précipité 1 (GX40)

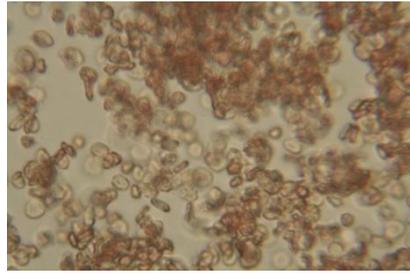


Figure 11 : observation microscopique d'agglutination du surnageant 1 (GX40)

Parmi les 4 échantillons extraits de l'aloë vera, Le précipité P1 et le surnageant S1 ont montré des fortes agglutinations vis-à-vis des hématies de lapin. Cette agglutination a été observée à la fois à l'œil nu et au microscope qui prouve que l'aloë vera contient des lectines.

L'interaction entre les lectines et les globules rouges, se manifeste généralement lors du dépôt des lectines au niveau du puits contenant les hématies, ces dernières vont sédimenter au fond du puits, alors que les lectines vont interagir avec elles, et former un amas homogène ; c'est l'hémagglutination.

Les deux autres échantillons (précipité P2 et surnageant S2) n'ont pas donné lieu à une agglutination décelable.

IV.3.Les limites d'agglutination :

Les limites d'agglutination sont exprimées en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination. les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5 et la Figure 5 .

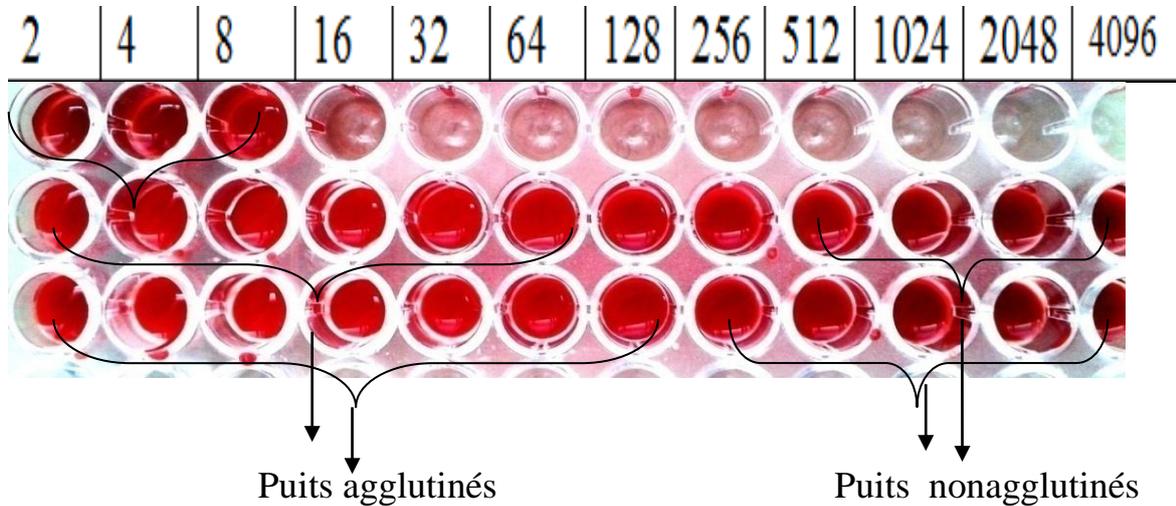


Figure 12 : limites d’hémagglutination de précipité 1 et surnageant 2

Ligne 1 : puits 1.2.3. Contrôle négatif (sans extrait), 4 à 12 vides

Ligne 2 : puits 1 à 12 précipité 1 dilution de 2 à 4096

Ligne 3 : puits 1 à 12 surnageant 1 dilution de 2 à 4096

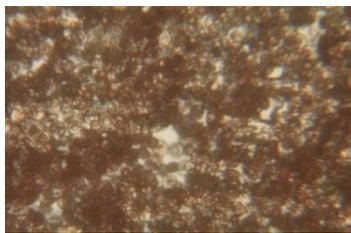
Tableau 6 : les limites d’agglutination avec le sang de lapin

Dilution	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
P1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	--	--	--	--
S1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	--	--	--	--	--
P2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
S2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

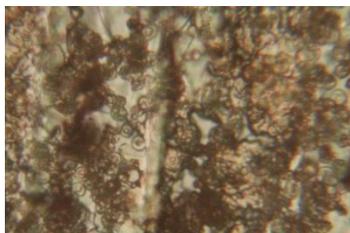
+++ :Très forte agglutination
 ++ : Forte agglutination
 +: Faible agglutination
 -- : Absence d’agglutination

Tableau 7 : Dilution des protéines en (mg /ml) à 280 nm

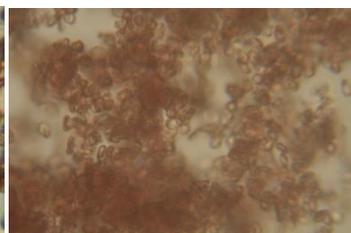
2	3.64
4	1.82
8	0.91
16	0.455
32	0.2275
64	0.11375
128	0.056875
256	0.0284375
512	0.01421875
1024	0.00710938
2048	0.00355469
4096	0.00177734



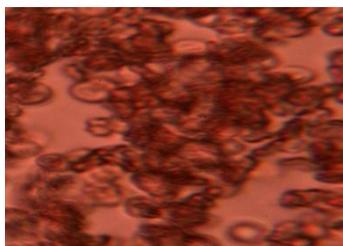
P1 = 1



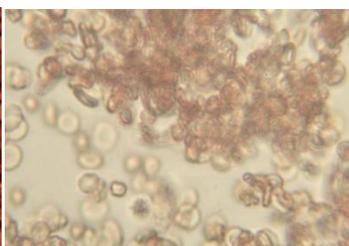
P1 = 2



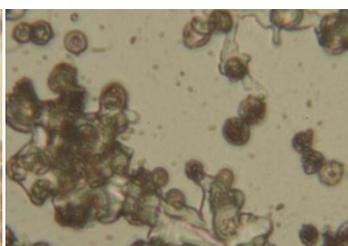
P1 = 3



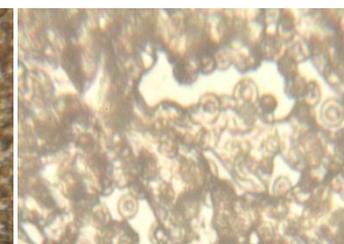
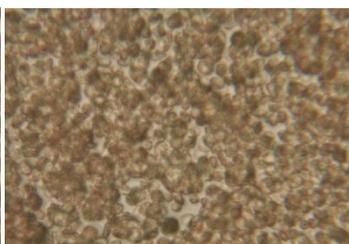
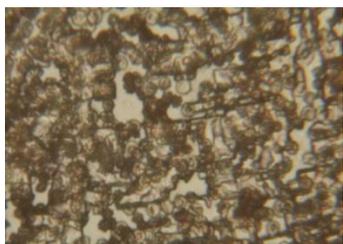
P1 = 4



p1 = 5



P1 = 6



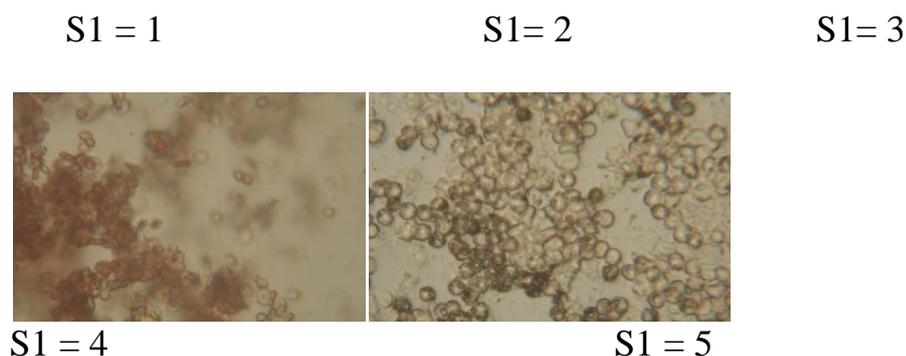


Figure 13 : Aspect microscopique de quelques échantillons de différentes dilutions (GX 40)

Pour P1 , on a observé une très forte agglutination à partir de la première dilution jusqu'à la dilution 256, dont l'unité d'hémagglutination obtenue est de **0.0284375 mg/ml**

Pour S1 il y 'a une forte agglutination au niveau de la première jusqu'à la dilution 128 , dont l'unité hémagglutination est de **0.056875 mg/ ml**

Pour le P2 et S2 aucune agglutination n'a été observée pour toutes les dilutions.

Donc les résultats du tableau 5 et les figure 5 et 6 montrent que le précipité 1 contient une grande quantité de lectine et le S1 contient une quantité moyenne ce qui explique le degré d'agglutination dans chacun d'eux, par contre le P2 et le S2 ne contiennent pas de lectine ce qui explique l'absence d'agglutination dans les deux autres extraits.

IV.4. La chromatographie sur colonne de sephadex G 200.

Dans le but d'améliorer l'extraction des lectines , nous avons procédé à une chromatographie sur gel de sephadex G 200 en présence de PBS (PH = 8)

Les résultats concernent les fractions obtenues après élution avec le tampon PBS (PH =8.), sont représentés dans le tableau 8, et illustré par la courbe de la figure 14.

Tableau 8 : les concentrations des protéines de chaque fraction après la chromatographie .

Tube	Concentrations (mg/ml)
1	63.126
2	96.69
3	122.75
4	154.81
5	165.81
6	179.80
7	236.97
8	212.93
9	171.843
10	168.336
11	168.30
12	129.76
13	110.22
14	89.178
15	39.58
16	1.5
17	0.001
18	0,001

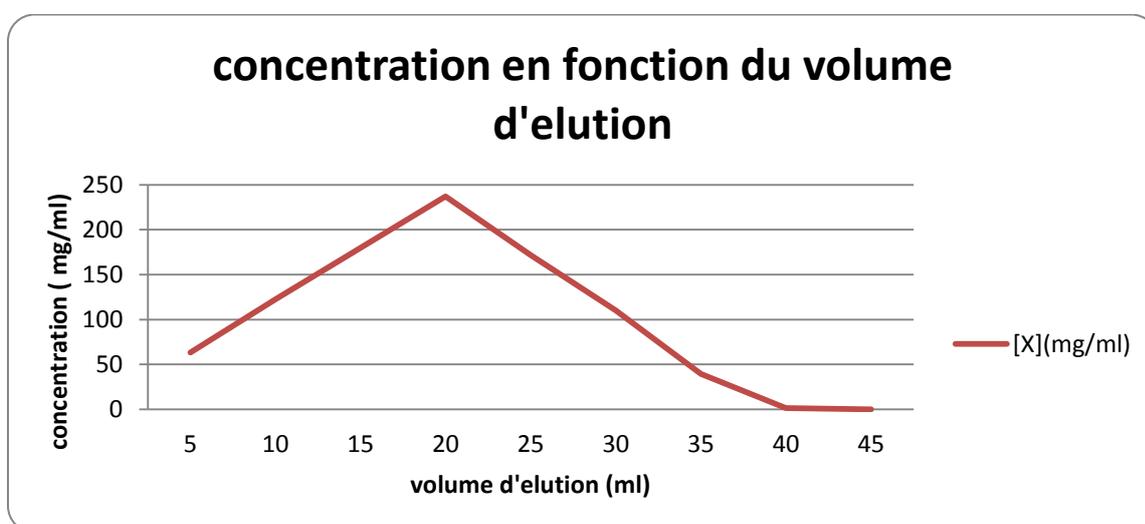


Figure 14 : courbe représentant le profil d'éluion des concentrations des fractions de précipité 1 en fonction du volume d'éluion.

La separation des protéines de l'extrait de l'aloée vera barbadensis sur colonne de sephadex G 200 et la lecture à 280 et 260 nm a montré un pic et deux zones :
 Une première zone correspondante aux concentrations situées entre (63 ,126 et 236,97) mg/ml.

Cette zone correspond apparemment à des protéines à haut poids moléculaire ,Une deuxième zone correspondante aux concentration situées entre (212,93 et 0 ,001)mg/ml

Cette zone correspond apparemment à des protéines à faible poids moléculaire.

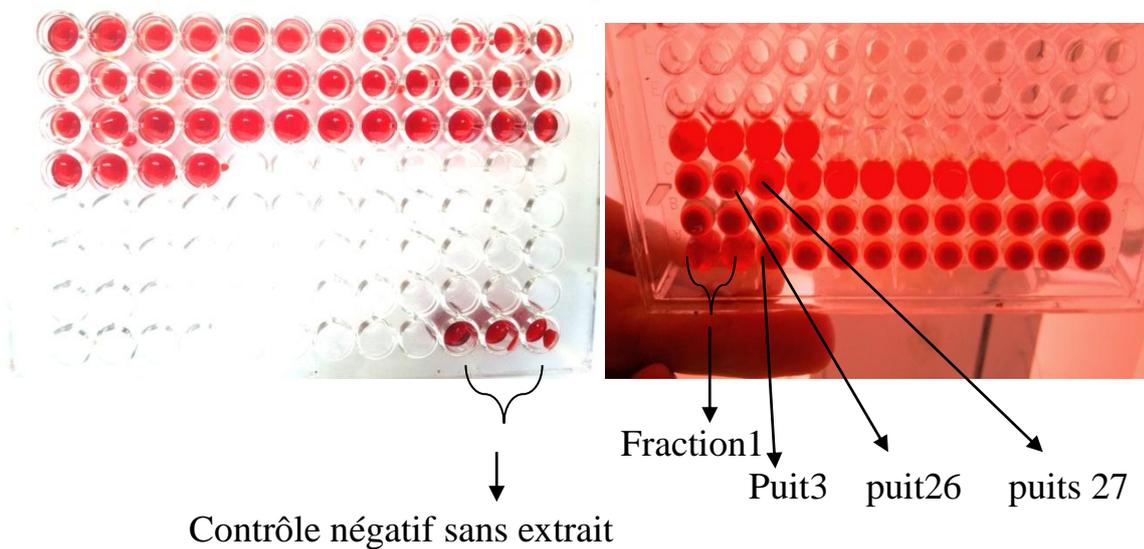


Figure :15

figure :16

Les puits 3 à 26 montrent une hémagglutination positive
 Les puits 1 ,2 et 27 à 40 montrent une hémagglutination négative

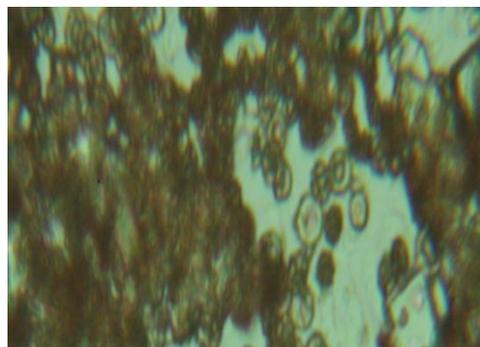
Photo 15 et 16 : tests d'hémagglutination de chaque fraction après chromatographie

Toutes les fractions recueillies après chromatographie sur sephadex G 200 , qui sont au nombre de 20 (2 puits pour chaque fraction) , ont fait l'objet d'un test d'hémagglutination (figure 15 et figure 16). On observe clairement sur la figure N° 16 que seuls les puits 3 à 27 correspondant aux fractions 2 à 12 présentent une forte hémagglutination.

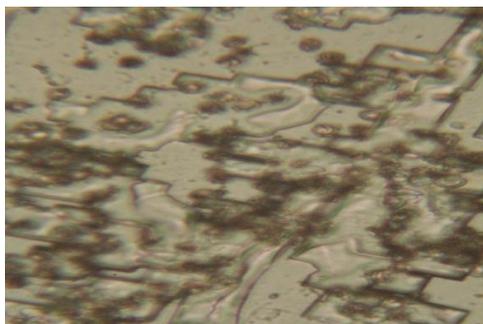
Pour cela nous avons opté pour une vérification par microscopie pour seulement les fractions relatives aux tubes (6) , (7) , (8) et (9) .



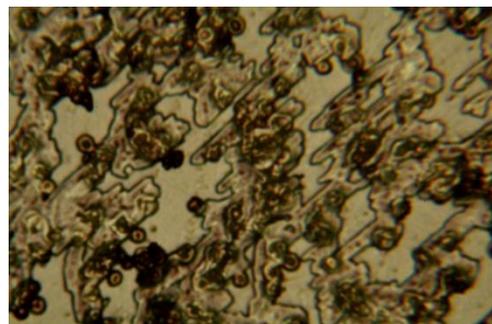
Tube 6



Tube 7



Tube 8



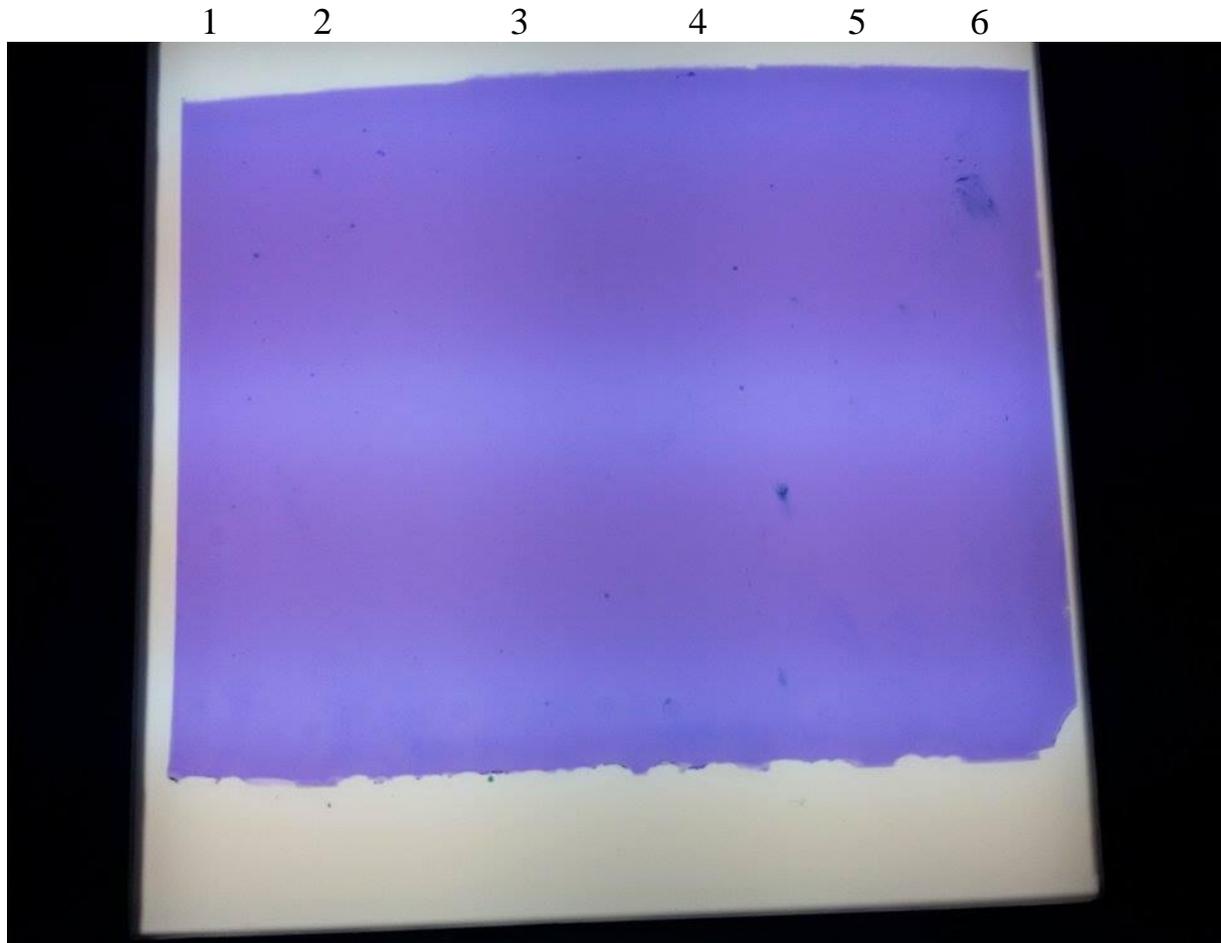
tube 9

Figure 16 : Aspect microscopique des quatre échantillons à hémagglutination positive après chromatographie (G 200)

Nous avons ensuite procédé à une électrophorèse SDS page pour apprécier l'état de purification des fractions f 2 à f 12.

IV. 5. Electrophorèse sur gel SDS :

Nous avons obtenu après coloration un gel ne reflétant aucune bande protéique



- 1 : surnagent 1
- 2 : surnagent 2
- 3 : précipité 1
- 4 : précipité 2
- 5 : p1 après chromatographie
- 6 : p1 après sac de dialyse

Par manque de moyens matériel en notre possession, et au regard des résultats négatifs ressortis lors de cette électrophorèse SDS page, nous suggérons pour résoudre ce problème l'utilisation d'autres techniques de séparation à haut pouvoir de séparation telles que la technique western blot ou l'électrophorèse bidimensionnelle, immuno-électrophorèse, dont les pouvoirs des résolutions sont nettement meilleurs. On pense aussi que la concentration en mg/ml de nos échantillons utilisés lors de la SDS page est trop faible (50µl par puits), pour être détectée.

Conclusion :

L'objectif de notre travail est la mise en évidence des propriétés hémagglutinantes des lectines de l'Aloé-véra.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus, aussi peu appréciables soient-ils, nous permettent tout de même d'affirmer sans aucun doute que *Aloé-véra barbadensis* possède une activité hémagglutinante certaine qui est une indication de la présence de propriétés de type lectine. Des résultats similaires de l'extrait d'éthanol d'*Aloé-véra. barbadensis* ont été rapportés par **Bouther et al. 1996** qui décrivent cette lectine comme ayant des effets hémagglutinants très forts à l'égard des érythrocytes humains .

L'activité d'agglutination d'une autre espèce d'*Aloé-véra excelsa* (**Saito et al, 1982;** **Imanishi et Suzuki, 1984**), a en outre indiqué un large spectre d'utilisation de ses extraits et a justifié l'utilisation de cette espèce par les guérisseurs traditionnels et les populations autochtones pour les maladies chroniques telles que les brûlures, l'arthrite, des plaies, des coupures et le diabète. Par conséquent, en dépit du fait que les guérisseurs traditionnels et les populations autochtones n'ont aucune connaissance «scientifique» sur la composition chimique de l'Aloé-véra , la présente étude peut nous orienter vers une justification scientifique et le soutien que les différentes espèces d' Aloé-véra peuvent être utilisées comme plante médicinale pour divers maux tels que cela a été fait auparavant par les guérisseurs traditionnels et les populations autochtones . Il est évident que cela doit nécessairement être appuyé par des études de laboratoires de recherches.

Il est aussi regrettable que notre électrophorèse SDS page ne nous a pas fourni les résultats escomptés, mais l'exploitation de la bibliographie nous permet de dire que différentes espèces d'Aloé-véra ont fait l'objet de purifications et ont donné lieu, comme c'est le cas d'une lectine spécifique de mucine qui a été isolée à partir de pâte de feuille d'Aloe vera (L.) Burm. f., famille *Aloaceae* (**Kaur et al.2011**); dont la procédure d'isolement employée a été la chromatographie d'affinité sur des acides activés de billes de silice liées à la mucine. La pureté de la préparation de lectine a révélé une bande unique sur une SDS-PAGE à pH 8,3 et une PAGE natif à pH 4,5. Cependant, plusieurs bandes ont été obtenues dans la focalisation isoélectrique et PAGE native à un pH de 8,3 indiquant la présence d'isolectines. Cette même lectine a montré un pic

Conclusion

unique en chromatographie sur Biogel P-200 et la masse moléculaire native a été calculée à 53 kDa.

En ce qui nous concerne , la chromatographie sur colonne Séphadex G200 a fourni un seul pic qui peut pourquoi pas ,être considéré sous toutes réserves comme le reflet de la présence d'une seule forme de lectine .

D'autres travaux opérés sur une autre lectine de la famille Aloé-véra ont permis sa purification en une seule étape ,grace à une Chromatographie d'affinité basée sur du bromure de cyanogène (CNBr) lié à du Sepharose 4B lié à de l'ovalbumine. La lectine a été purifié 60 fois.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif (PAGE) montre un poids moléculaire apparent de 45 000 kDa. Le fait que le dodécylsulfate de sodium (SDS) -PAGE a donné une sous-unité de poids moléculaire de 14 400 kDa laisse supposer que la lectine est composée de trois sous-unités (**N. Ozsoy et al, 2012**)

Parmi les 360 espèces d'aloès, l'aloé vera est la plus populaire. En effet, celui-ci est riche en glycoaminoglycanes, en vitamines, en oligo-éléments, en acides aminés et en glycoprotéines. Très plébiscitée en médecine traditionnelle, l'Aloe Vera attire l'intérêt de nombreux scientifiques et de nombreuses propriétés ont été mises en avant : antibactériennes (**H. Wang,1999**),antivirales (**J.S. Montaner, J. Gill, J. Singer, 1996**) antifongiques (**K. Kawai, H. Beppu, K. Shimpo, 1998**) et plusieurs autres vertus. (**Devi R and Rao M, 2005.**), (**Surjushe A et al. 2008**),(**Vogler BK and Renst R1999**).

Nos perspectives d'avenir ne sont donc pas du tout limitées, il reste beaucoup de choses à faire sur les plantes ayant des vertus pharmacologiques et médicinales, entre autres l'Aloé-véra.

Annexe

Annexe 1 : préparation des tampons

1. Préparation de tampon carbonate-bicarbonate (PH 9.5)

0.05 M de tampon carbonate-bicarbonate (PH 9.5)

.Na₂CO₃

$$PM(\text{Na}_2\text{CO}_3) = PM(\text{Na} * 2) + PM(\text{C}) + PM(\text{O} * 3)$$

$$= 106 \text{ g}$$

$$106\text{g} \qquad 1 \text{ mol} \qquad 1\text{L}$$

$$X \text{ g} \qquad 0.05 \text{ mol} \qquad 1\text{L}$$

$$PM(\text{Na}_2\text{CO}_3) \quad \boxed{5.3\text{g}/\text{mol /L}} \quad (0.05 \text{ M}) =$$

. NAHCO₃

$$PM(\text{NaHCO}_3) = PM(\text{Na}) + PM(\text{H}) + PM(\text{C}) + PM(\text{O} * 3)$$

$$= 23+1+12+(16*3)$$

$$= 85\text{g}$$

$$85\text{g} \qquad 1\text{mol} \qquad 1\text{L}$$

$$X\text{g} \qquad 0.05 \text{ mol} \qquad 1\text{L}$$

$$PM(\text{NaHCO}_3 \quad \boxed{4.25 \text{ g/mol / L}}) =$$

2. Préparation de tampon phosphate PBS (PH = 8.0) 0.01 M

kH₂PO₄ + k₂HPO₄

. k₂HPO₄

Annexe

$$\text{PM}(\text{K}_2\text{HPO}_4) = \text{PM}(\text{K} \times 2) + \text{PM}(\text{H}) + \text{PM}(\text{P}) + \text{PM}(\text{O} \times 4)$$

$$= 174\text{g}$$

$$174\text{g} \qquad 1\text{mol} \qquad 1\text{L}$$

$$\text{X g} \qquad 1\text{mol} \qquad 1\text{L}$$

$$\text{PM}(\text{K}_2\text{HPO}_4) \text{ 0.01} \quad \boxed{1.74 \text{ g} / \text{mol/L}} \quad \text{M} =$$

. KH₂PO₄

$$\text{PM}(\text{KH}_2\text{PO}_4) = \text{PM}(\text{K}) + \text{PM}(\text{H} \times 2) + \text{PM}(\text{P}) + \text{PM}(\text{O} \times 4)$$

$$136\text{g}$$

$$136\text{g} \qquad 1\text{mol} \qquad 1\text{L}$$

$$\text{X g} \qquad 0.01 \text{ mol} \qquad 1\text{L}$$

$$\text{PM}(\text{KH}_2\text{PO}_4) \text{ (0.01} \quad \boxed{1.36\text{g/ mol/L}} \quad \text{M) =}$$

2. concentration des protéines :

On a après dilution de 10µl d'échantillon dans 3 ml de PBS :

1.1. Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm

Tubes	S1	S2	P1	P2
Absorbances	0.450	0.324	1.100	0.748

Annexe

Tableau 2 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques

Tubes	S1	S2	P1	P2
Absorbances	0.471	0.366	1.164	0.712

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

$$[\text{proteins}] = 1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$$

. Concentration des protéines après dilution :

. Concentration des protéines dans l'échantillon S1:

$$\begin{aligned} [\text{protéines}] &= 1.55 \cdot 0.450 - 0.76 \cdot 0.471 \\ &= \mathbf{0.339 \text{ mg/ml}} \end{aligned}$$

. Concentration des protéines dans l'échantillon S2:

$$\begin{aligned} [\text{protéines}] &= 1.55 \cdot 0.324 - 0.76 \cdot 0.366 \\ &= \mathbf{0.224 \text{ mg / ml}} \end{aligned}$$

. Concentration des protéines dans l'échantillon P1:

$$\begin{aligned} [\text{protéines}] &= 1.55 \cdot 1.100 - 0.76 \cdot \mathbf{1.164} \\ &= \mathbf{0.820 \text{ mg/ml}} \end{aligned}$$

. Concentration des protéines dans l'échantillon P2:

$$\begin{aligned} [\text{protéines}] &= 1.55 \cdot 0.712 - 0.76 \cdot 0.748 \\ &= \mathbf{0.618 \text{ mg / ml}} \end{aligned}$$

2.2. Les concentration réelles des protéines :

On peut calculer la concentration réelle des protéines par la loi de dilution :

$$C1 V1 = C2 V2$$

2.2. Concentration réelles des protéines dans l'échantillon S1 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.339 \cdot 3010$$

$$C1 = 0.339 \cdot 3010 / 10$$

$$C1 = 102.04 \text{ mg/ ml}$$

2.2.2. Concentration réelles des protéines dans l'échantillon S2 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.224 \cdot 3010$$

$$C1 = 0.224 \cdot 3010 / 10$$

$$C1 = 77.04 \text{ mg/ ml}$$

2.2.3. concentration réelles des protéines dans l'échantillon P1:

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.820 \cdot 3010$$

$$C1 = 0.820 \cdot 3010 / 10$$

$$C1 = 246.93 \text{ mg/ml}$$

2.2.4. concentration réelles des protéines dans l'échantillon P2:

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.618 \cdot 3010$$

$$C1 = 0.618 \cdot 3010 / 10$$

$$C1 = 186.10 \text{ mg/ ml}$$

3. concentration des protéines après chromatographie :

On à après dilution:

Tube	Dilution(échantillon → (Pbs)	A 280	A 260
1	10μL 5 ml →	0.144	0.128

Annexe

2	10 μ L	5 ml	→	0.384	0.529
3	10 μ L	5 ml	→	0.441	0.576
4	10 μ L	5 ml	→	0.492	0.597
5	10 μ L	5 ml	→	0.519	0.624
6	10 μ L	5 ml	→	0.486	0.525
7	10 μ L	5 ml	→	0.456	0.490
8	10 μ L	5 ml	→	0.619	0.640
9	10 μ L	5 ml	→	0.550	0.562
10	10 μ L	5 ml	→	0.501	0.570
11	10 μ L	5 ml	→	0.487	0.553
12	10 μ L	5 ml	→	0.470	0.515
13	10 μ L	5 ml	→	0.468	0.510
14	10 μ L	5 ml	→	0.403	0.480
15	10 μ L	5 ml	→	0.345	0.413
16	10 μ L	5 ml	→	0.306	0.389
17	10 μ L	5 ml	→	0.201	0.305
18	10 μ L	5 ml	→	0.102	0.204

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

$$[\text{protéines}] = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

Les concentrations des protéines après dilution :

Tube 1 :

$$[\text{proteins}] = 1,55 \cdot 0.144 - 0,76 \cdot 0.128$$

Annexe

$$= 0.126 \text{ mg/ml}$$

Tube 2

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,384 - 0,76 \cdot 0,529 \\ &= 0,193 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

Tube 3

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,441 - 0,76 \cdot 0,576 \\ &= 0,245 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Tube 4 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,492 - 0,76 \cdot 0,597 \\ &= 0,309 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

Tube 5 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,519 - 0,76 \cdot 0,624 \\ &= 0,330 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

Tube 6 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,486 - 0,76 \cdot 0,525 \\ &= 0,358 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Tube 7 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,456 - 0,76 \cdot 0,490 \\ &= 0,334 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Tube 8 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1,55 \cdot 0,619 - 0,76 \cdot 0,640 \\ &= 0,473 \text{ mg/ ml} \end{aligned}$$

Annexe

Tube 9 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.550 - 0.76 \cdot 0.562 \\ &= 0.425 \text{ mg / ml}\end{aligned}$$

Tube 10 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.501 - 0.76 \cdot 0.570 \\ &= 0.343 \text{ mg / ml}\end{aligned}$$

:

Tube 11 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.487 - 0.76 \cdot 0.553 \\ &= 0.336 \text{ mg / ml}\end{aligned}$$

Tube 12:

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.470 - 0.76 \cdot 0.515 \\ &= 0.337 \text{ mg/ ml}\end{aligned}$$

Tube 13 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.468 - 0.76 \cdot 0.510 \\ &= 0.259\end{aligned}$$

Tube 14 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.403 - 0.76 \cdot 0.480 \\ &= 0.220 \text{ mg / ml}\end{aligned}$$

Tube 15 :

$$\begin{aligned}[\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.345 - 0.76 \cdot 0.413 \\ &= 0.178 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

Tube 16:

$$[\text{proteins}] = 1.55 \cdot 0.306 - 0.76 \cdot 0.389$$

Annexe

$$= 0.079 \text{ mg/ml}$$

Tube 17 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.201 - 0.76 \cdot 0.305 \\ &= 0.003 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Tube 18 :

$$\begin{aligned} [\text{proteins}] &= 1.55 \cdot 0.102 - 0.76 \cdot 0.204 \\ &= 0.001 \end{aligned}$$

.les concentration réels des protéines :

On peut calculer la concentration réelle des proteines par la loi de dilution :

$$C1 V1 = C2 V2$$

Tube1

$$\begin{aligned} C1 \cdot 10 \mu\text{l} &= 0.126 \cdot 5010 \\ C1 &= 0.126 \cdot 5010/10 \\ &= 63.125 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Tube 2 :

$$\begin{aligned} C1 \cdot 10\mu\text{l} &= 0.139 \cdot 5010 \\ C1 &= 0.139 \cdot 5010/10 \\ C1 &= 96.69 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

Tube 3 :

$$\begin{aligned} C1 \cdot 10 \mu\text{l} &= 0.245 \cdot 5010 \\ C1 &= 0.245 \cdot 5010 /10 \\ C1 &= 122.75 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

Annexe

Tube 4 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.309 \cdot 5010$$

$$C1 = 154.81 \text{ mg / ml}$$

Tube 5 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.330 \cdot 5010$$

$$C1 = 165.81 \text{ mg/ml}$$

Tube 6 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.358 \cdot 5010$$

$$C1 = 179.81 \text{ mg/ml}$$

Tube 7 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.334 \cdot 5010$$

$$C1 = 236.97 \text{ mg/ml}$$

Tube 8 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.473 \cdot 5010$$

$$C1 = 212.93 \text{ mg/ml}$$

Tube 9 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.425 \cdot 5010$$

$$C1 = 171.843 \text{ mg/ml}$$

Tube 10 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.343 \cdot 5010$$

$$C1 = 168.336 \text{ mg/ml}$$

Tube 11 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.236 \cdot 5010$$

Annexe

$$C1 = 168.8 \text{ mg/ml}$$

Tube 12 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.337 \cdot 5010$$

$$C1 = 129.76 \text{ mg/ml}$$

Tube 13

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.259 \cdot 5010$$

$$C1 = 110.22 \text{ mg/ml}$$

Tube 14 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.220 \cdot 5010$$

$$C1 = 89.178 \text{ mg/ml}$$

Tube 15 :

$$C1 \cdot 10 \mu\text{l} = 0.178 \cdot 5010$$

$$C1 = 39.58 \text{ mg/ml}$$

Tube 16 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{l} = 0.079 \cdot 5010$$

$$C1 = 1.50 \text{ mg/ml}$$

Tube 17 :

$$C1 \cdot 10\mu\text{L} = 0.003 \cdot 5010$$

$$C1 = 0.001 \text{ mg/ml}$$

Annexe

Annexe 2. Solutions utilisées pour la SDS-PAGE

Solution mère d'acrylamide à 40% (à préparer avec gants et masque)

Acrylamide	40 g
Eau distillée	100 ml

Solution mère de bisacrylamide à 2 % (à préparer avec gants et masque)

Bisacrylamide	2 g
Eau distillée	100 ml

Solution stock de SDS à 10 %

Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	10 g
Eau distillée	100 ml

Solution d'Ammonium persulfate à 1% (à préparer temporairement)

APS	0.1 g
Eau distillée	10 ml

Tampon Tris HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris	60,57 g
Eau distillée	qsp 400 ml
Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant	8 à 10 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

Tampon Tris HCl pH 6,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris	30,285 g
Eau distillée	qsp 200 ml
Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant	19,5 ml
Eau distillée	qsp 250 ml

Annexe

Tampon d'électrophorèse

Glycine	70,55 g
Tris	15 g
SDS	5 g
Eau distillée	qsp 5000 ml

Annexe 1. (Suite)

Solution de coloration (pour deux gels)

TCA 60%	100 ml
Solution mère de bleu de coomassie R250	25 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	10 g
Ethanol 95°	qsp 1000 ml

L'éthanol est mis en agitation, le bleu de Coomassie est ensuite ajouté, pour qu'il ne prenne pas de masse, laisser agiter au moins deux heures, la solution est ensuite filtrée.

Annexe 2. Préparation des gels pour la SDS-PAGE

Gel de séparation (running gel) T : 12.52%, C : 0.97%

Acrylamide	23.9 ml
------------	---------

Annexe

Bisacrylamide	4.7 ml
Eau distillée	16.5 ml
Tris-HCl pH 8.8	29.3 ml
SDS à 10 %	1 ml
APS à 1%	1.93 ml
TEMED	0.039 ml

Gel de concentration (stacking gel) T : 2.88%, C : 1.42%

Acrylamide	2 ml
Bisacrylamide	0.6 ml
Eau distillée	20.4 ml
Tris-HCl pH 6.8	3.4 ml
SDS à 10 %	0.28 ml
APS à 1%	1.40 ml
TEMED	0.028 ml

References

references:

A. barcroft. *aloe vera*, remede naturel de legende. *editions medicis-entrelacs*,1998.

acc. chem. res., 28, 321–327.

Alencar n.m.,cavalcante c.f., vasconcellos m.p., leite k.b., aragao k.s, assreuy a.m., nogueira n.a., cavada b.s. et vale m.r.(2005). anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *lonchocarpus sericeus* in an experimental rat model of infections peritonitis. *j.pharm.pharmacol.*, 57,919-222.

Ali sa, galgut jm, choudhary rk.(2012). on the novel action of melanolysis by a leaf extract of aloe vera and its active ingredient aloin, potent skin depigmenting agents. *planta med.* 78(8), 767-71.
applications. *glycoconj j*, 18, 589-613.

B. boullard. plantes medicinales du monde, croyances et realites. *edition estem*,2001, p.27.

Beisel, h.g., kawabata, s., iwanaga, s., huber, r. and bode, w. (1999) tachylectin-2: benzyl t-antigen disaccharide bound to *amaranthus caudatus* agglutinin. *nat. struct. biochim. biophys. acta*, 1383, 9-36. *biol chem biol.*, 10, 779-783.

Bird,g.(1951), plant and other agglutinins in the study or human red corpuscles in extract of *dolichos biflorus*. *cunsci*, 20-29
bound to slex and psgl-1. *cell*, 103, 467-479.

Bouther cf, shirf vr, winters, wd (1996). semi-purification and characterization of haemagglutin substance from *aloe arborescens* miller. *phytotherapy res.*, 10: 54-57.

Boyd w.c. et shapleigh e.(1954).specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins).*science*, 49,119-419.

Boyd w.c. et shapleigh e.(1954).specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins).*science*, 49,119-419

References

Brooker c.(2001). le corps humain: etude, structure et fonction, le role infirmer dansla pratique clinique. 2eme edition, de boeck : 196

Chen xd, wu by, jiang q, wang sb, huang ly, wang zc. influence of polysaccharide from *aloe vera* on the proliferation of the human epithelial cells cultured in vitro. *zhonghua shao shang za zhi*, 2005, 21 (6):430-3.

Chrispeels, m.j. and raikhel, n.v. (1991) lectins, lectin genes, and their role in plant coagulation systems. *proc natl acad sci u s a*, 98, 13519-13524.

Collins e, collins c. roentgen. dermatitis treated with fresh whole leaf of aloe vera. *am j roentgenol*, 1935, 33:396f7. complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in cona-like lectins. j composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins crystal structure of a specific glcnac/galnac-binding lectin involved in the innate crystallization and preliminary x-ray crystallographic studies of the c-terminal domain crystallogr d *biol crystallogr*, 60, 1895-1896. c-type lectin and biantennary complex-type n-glycan revealed by crystallography and

Cummings, r.d. and kornfeld, s. (1982) characterization of the structural determinants *curr opin struct biol*, 17, 498-505. *curr. opin. struct. biol.*, 3, 393-400.

Dam, t.k. and brewer, c.f. (2002) thermodynamic studies of lectin-carbohydrate defense. *plant cell*, 3, 1-9.

Delatorre, p., et al. (2006) crystal structure of a lectin from *canavalia maritima* (conm) in

Dennis,j. w., granovsky, m. et warren, c.e. (1999). glycoprotein glycosylation and cancer progression. *biochim.biophys.acta*, 1473,21-34.

Devaraj s, yimam m, brownell la, jialal i, singh s, jia q.(2013). effects of aloe vera supplementation in subjects with prediabetes/metabolic syndrome.,*metabsyndrrelatdisord.* 35-40.

References

Devi r and rao m cosmeceutical application of aloe gel. natural product radiance, 4(4): 322-327; 2005 discii de dictyosteliumdiscoideumthese de doctorat d'universit ygrenoble i joseph fourierecoledoctorale chimie et sciences du vivant.

Drickamer, k. (1993) ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins.

Edelman, g.m., cunningham, b.a., reeke, g.n., becker, j.w., waxdal, m.j. and wang, j.l.(1972) the covalent and three-dimensional structure of concanavalin a. proc. nat.acad. sci. usa, 69, 2580-2584 from the marine invertebrate *cucumaria echinata*: implications of domain structure for function. in allen, h.j. and kisailus, e.c. (eds), glycoconjugates, composition, galectins. glycoconj. j., 19, 433-440.

Genbacev, o.d., et al. (2003) trophoblast l-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal

Gerlach, d., wagner, m., schlott, b., zahringer, u. and schmidt, k.h. (2002) chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from cepaea germ agglutinin and its biological significance. j mol biol, 141, 267-291. glycans. febs lett, 580, 6123-6131. glycobiology, 3, 97-130. glycoconjugates. curr. opin. struct. biol., 18, 567-576.

Goldstein ij hughes rc monsigny m osawat and sharon

Gourdine, j.-p., cioci, g., miguet, l., unverzagt, c., varón-silva, d., varrot, a., gautier, c., smith-ravin, e.j. and imberty, a. (in press) high affinity interaction between bivalve

Guillot j. guerry . m .konska .g . caldefie c .f . de .latour m. et penault .l .f.(2004). modification des glycocnjugues au cours du processus de cancerisation . cas des carcinomes mammaires bull cancer . 91 , 141 - 158 .

H. wang, j. chung, c. ho, l. wu, s. chang, "aloe-emodin effects on arylamin n-acetyltransferase activity in the bacterium helicobacter pylori", planta.medica., 64, 176-8 (1998). ractice, 49(447): 823-828; 1999.

Haddad p, amouzgar-hashemi f, samsami s, chinichian s,oghabian ma.(2013). aloe vera for prevention of radiation-induced dermatitis: a selfcontrolled clinical trial,4,345-8

References

Hardman, k.d. and ainsworth, c.f. (1972) structure of concanavalin a at 2.4 a resolution. *biochemistry*, 11, 4910-4919.

Hirabayashi j.(2004).lectin based stracluraleglycomicsglyoprotecomics and glycan profiling glycoconj j ,21, 34-40 . hortensis. *fems microbiol lett*, 214, 61-68.

Huber, r. and kawabata, s. (2001) the 2.0-a crystal structure of tachylectin 5a
imanishi k, suzuki i (1984). augmentation of natural cell-mediated cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells by aloctin a. *int. j. immunopharmacol.*, 5: 539-543. n. ozsoy, e. candoken, n. akev* purification and antioxidant activity of *aloe vera* leaf lectin *istanbul ecz. fak. derg. /j. fac. pharm. istanbul* 42(1) 2012 s. 1-11

Imberty, a. and mitchell, e.p. (2006) biochemical and structural analysis of *helix*

Imberty, a. and varrot, a. (2008) microbial recognition of human cell surface
imberty, a., wimmerova, m., mitchell, e.p. and gilboa-garber, n. (2004) structures of the lectins from *pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan immobilized phaseolus vulgaris leukoagglutinating and erythroagglutinating lectins. j interactions by isothermal titration calorimetry. *chem. rev.*, 102, 387-429. interface. *science*, 299, 405-408 its membrane pore-formation mechanism. *j. biol. chem.*, 279, 37133-37141.

J.s. montaner, j. gill, j. singer, “double-blind placebo-controlled pilot trial of acemannan in advanced human immunodeficiency virus disease”, *j. acquir. immune defic. syndr. hum. retrovirol.*, 12,153-7 (1996). japonica). *j biochem*, 109, 718-721.

K. kawai, h. beppu, k. shimpo, in vivo effects of *aloe arborescens miller var. natalensis berger* on experimental tinea pedis in guinea pig feet’,

Kairies, n., beisel, h.g., fuentes-prior, p., tsuda, r., muta, t., iwanaga, s., bode, w., karoline sabola aragao.(2009).etudes structure fonction de lectinesdiscl et **kaur, manpreet; singh, jatinder; kamboj, sukhdev singh; saxena, a. k.(2011).** purification and characterization of a lectin from leaf pulp of *aloe vera* (l.) burm. f *journal of pharmacy research*;jul2011, vol. 4 issue 7, p2441

References

lectin, cel-i, revealed by x-ray crystallographic analysis. *j. biol. chem.*, 43, 45219-

Lee, y.c. and lee, r.t. (1995) carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology.

Leffler, h., carlsson, s., hedlund, m., qian, y. and poirier, f. (2004) introduction to

Leonidas, d.d., vatzaki, e.h., vorum, h., celis, j.e., madsen, p. and acharya, k.r. (1998) structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *biochemistry*, 37, 13930-13940.

Lis .h. sharon .n.(1998). lectins. carbohydrate.specific proteins that mediate cellular recognition *chem rev* .98,637-674.

Liu ly, chen xd, wu par, jiang. influence of aloe polysaccharide on proliferation and hyaluronic acid and hydroxyproline secretion of human fibroblasts *in vitro*. *q zhong xi yi jie he xue bao*, 2010, 256-62.

Loris, r., hamelryck, t., bouckaert, j. and wyns, l. (1998) legume lectin structure.

M. schweizer, aloes, la plante qui guerit, *apophtegme*, 2012, p.9.
major carbohydrate fraction of aloe vera. *immunopharmacology*, 1996, 35:119-28.
microcalorimetry *j. biol. chem.*
model. structure, 4, 1339-1352.

Nicolas martin .l'aloé vera : les vertus d'un des plus vieux cosmétiques du monde .2011)
of galactose-binding lectin ew29 from the earthworm *lumbricus terrestris*. *acta*

Park, s., lee, m.r. and shin, i. (2008) chemical tools for functional studies of glycans. *chem soc rev.*, 37, 1579-1591.
phytotherapy research, 12, 178-82 (1998)

Poget, s.f., legge, g.b., proctor, m.r., butler, p.j., bycroft, m. and williams, r.l. (1999) the structure of a tunicate c-type lectin from *polyandrocarpa misakiensis* complexed

References

pomatia agglutinin (hpa): a hexameric lectin with a novel fold. *j. biol. chem.*, 281, provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood

Pusztai .a.(1991).plantlectins chemistry and pharmacology of natural products cambridge (gbr).cambridge university press 253.

Qin pan, hongming pan, haizhou lou, yinghua xu and lutian.(2013).inhibition of the angiogenesis and growth of aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. recognition. *microb. infect.*

Remy . loris .thomas hamelryck .julie bouckaert et lode wyns.(1998) legume lectin stucture *biochimica et biophysica acta* 1383,9-36. required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with

Roberts, d.l., weix, d.j., dahms, n.m. and kim, j.j. (1998) molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *cell*, 93, 639-648.

Rudiger h.(1993). purification of plant lectins in *gadius h j g s edlectins and glycobiology springer berlin* 31-46.

Rudiger, h. and gabius, h.j. (2001) plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and

Rutenber, e., katzin, b.j., ernst, s., collins, e.j., mlsna, d., ready, m.p. and j.d., r. (1991) crystallographic refinement of ricin to 2.5 a. *proteins*, 10, 240-250.

Saito h, ishiguro t, imanishi k, suzuki i (1982). pharmacological studies on a plant lectin aloctin a. ii. inhibitory effect of aloctin a on experimental models of inflammation in rats. *j. pharmacol.*, 32: 139-142.

Sanchez, j.f., lescar, j., chazalet, v., audfray, a., gagnon, j., alvarez, r., breton, c., sankaranarayanan, r., sekar, k., banerjee, r., sharma, v., surolia, a. and vijayan, m. sauvion . n .(1995). effets et modes d'action de deux lectins a mannose sur le puceron du pois . *acyrthosiphonpisum (harris)*. potentiel

References

d'utilisation des lectines vegetal dans une strategies de creation de plantes transgeniques resistantes aux pucerons.64(9)..45-47.

Sehgal i, winters wd, scott m, kousoulas k.(2013). an in vitro and in vivotoxicologic evaluation of a stabilized aloe vera gel supplement drink in mice. *food chemtoxicol*, 55,363-70.

Seufi al, galal fh et hafez ee.(2012). caractérisation of multisugar-binding c-type lectin (splilec) from a bacterial-challenged cotton leafworm, *spodopteralittoralis*.*journal.pone*,7(8), 0042795.

Shibuya,n., golgstein i.j.,van damme e.j.m. et peumans w.j.(1988). binding propertes of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*galanthusnivalis* l) bulb.*j.biol.chem.*,363,728-73

Sinha, s., gupta, g., vijayan, m. and surolia, a. (2007) subunit assembly of plant lectins. snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding

Somers, w.s., tang, j., shaw, g.d. and camphausen, r.t. (2000) insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of p- and e-selectin specificities of a blood type b binding lectin from hemolymph of a crab (*charybdis*

Stone n, meistar a. function of ascorbic in the conversion of proline to collagen hydroxyproline. *nature*, 1965, 194:555-57.
struct biol, 154, 280-286.
structure and function. marcel dekker, new york.

Sugawara, h., kusunoki, m., kurisu, g., fujimoto, t., aoyagi, h. and hatakeyama, t.

surjushe a et al., aloe vera : a short review. indian j dermatol, 53(4): 163-166; 2008 vogler bk and renst r aloe vera : a systematic review of its clinical effectiveness., *british journal of general p*

Suzuki, r., fujimoto, z., kuno, a., hirabayashi, j., kasai, k. and hasegawa, t. (2004) **tabolacci c, rossi s, lentini a, provenzano b, turcano l, facchiano f, beninati s.(2013).** aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in b16-f10

References

melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation. *amino acids*, 44(1), 293-300.

Topfer-petersen, e., romero, a., varela, p.f., ekhlasi-hundrieser, m., dostalova, z., sanz,l. and calvete, j.j. (1998) spermadhesins: a new protein family. facts, hypotheses and perspectives. *andrologia*, 30, 217-224.

Transue, t.r., smith, a.k., mo, h., goldstein, i.j. and saper, m.a. (1997) structure of

Uchida, t., yamasaki, t., eto, s., sugawara, h., kurisu, g., nakagawa, a., kusunoki, m. and hatakeyama, t. (2004) crystal structure of the hemolytic lectin cel-iii isolated

Umetsu, k., yamashita, k. and suzuki, t. (1991) purification and carbohydrate-binding

Van damme, e.j.m., peumans, w.j., barre, a. and rougé, p. (1998) plant lectins: a

Van liempt, e., et al. (2006) specificity of dc-sign for mannose- and fucose-containing

Varki, a. (1993) biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.

Vasta, g.r. (1992) invertebrate lectins: distribution, synthesis, molecular biology and virus hemagglutinin by simulated annealing. *j mol biol*, 212, 737-761.

Weis, w.i., brunger, a.t., shehel, j.j. and wiley, d.c. (1990) refinement of the influenza with d -galactose. *j. mol. biol.*, 290, 867-879.
with diverse biological roles. *critical rev. plant sci.*, 17, 575-692.

Wright, c.s. (1980) crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat

Wright, c.s. and hester, g. (1996) the 2.0 a structure of a cross-linked complex between

References

Yamada, y. and aketa, k. (1982) purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *hemicentrotus pulcherrimus*. *biochim biophys acta*, 709, 220-226.

Yu, x.q. and kanost, m.r. (2000) immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *j biol chem*,

Zhang l, tizard ir. activation of mouse macrophage cell line by acemannan; the

Résumé

Abstract:

Lectins are proteins or glycoproteins of animal, plant, bacterial and fungal.

The objective of this study is the identification of hemagglutinating lectins properties of Aloe vera. This property is tested on crude extracts, and other obtained after chromatography on Sephadex G200 column.

The extraction of lectins was conducted from the barbadensis species All the results we have obtained, we used to say without any doubt that the Aloe vera barbadensis has some HA activity is an indication of the presence of lectin-like properties.

ملخص

الليكتينات عبارة عن بروتينات أو بروتينات سكرية من أصل حيواني، نباتي، بكتيري و فطري.

هدف هذه الدراسة هو هو تحديد خصائص تراص ليكتينات الألوّة فيرا هذه الميزة أجريت على مستخلصات نقية وغيرها تم الحصول عليها بعد الكروماتوغرافية العمودية sephadex G 200

استخلاص الليكتينات أجري على النوع *barbadensi*

جميع النتائج التي حصلنا عليها،تسمح بالتأكد دون أي شك في أن الألوّة فيرا *barbadensi* يمتلك بعض نشاط التراص الذي يعد مؤشرا على وجود خصائص من نوع لكتين.

الكلمات المفتاحية : لكتين إستخلاص تراص، الألوّة فيرا *barbadensi*

Résumé

Boutebakh nabil
Taïk meriem

Date de soutenance : 12. 07. 2015

Thème : Mise en évidence des propriétés hémagglutinantes des lectines de l'Aloé-véra

Diplôme : Master en Biochimie, option Biochimie Moléculaire et Santé

Résumé :

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origines animale, végétale, bactérienne et fongique.

L'objectif de cette étude est la mise en évidence des propriétés hémagglutinantes des lectines de l'Aloé-véra . Cette propriété est testée sur des extraits bruts, et d'autres obtenus après une chromatographie sur colonne de sephadex G 200.

L'extraction des lectines a été réalisée à partir de l'espèce *barbadensis* L'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous permettent d'affirmer sans aucun doute que *l'Aloé-véra barbadensis* possède une activité hémagglutinante certaine qui est une indication de la présence de propriétés de type lectine.

Mots clés : Lectine, glycoprotéines, Aloé-véra, Test d'hémmagglutination.

Laboratoire de biochimie, département de biochimie, faculté des sciences de la nature et de la vie,
Université Frères Mentouri Constantine

Jury de soutenance

Président : NECIB Y . Pr.

Rapporteur : ZITOUNI .A. M C.

Examinatrice : BAHY .A . M C .

Université Frères Mentouri Constantine

Université Frères Mentouri Constantine

Université Frères Mentouri Constantine