

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique



جامعة الأخوة منتوري قسنطينة
UNIVERSITÉ DES FRÈRES
MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie /Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° série:

N° ordre:

Mémoire de Master

Spécialité : Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé

Présenté par :

MERAHI Ilhem et BENCHEHIDA Zeyneb

Intitulé :

**Etude de la lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* :
extraction, purification partielle, caractérisation et activité
antioxydante**

Date : le 28 Juin 2017

Jury :

Président du Jury : Mr ZITOUNI A.

Rapporteur : Mr NECIB Y.

Examinatrice : Mme BAHY A.

M.C.B, Université des Frères Mentouri Constantine 1

Prof. , Université des Frères Mentouri Constantine 1

M.C.B, Université des Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Nos vifs remerciements tout d'abord au bon DIEU de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et la volonté pour achever ce travail.

Notre travail de mémoire de Master est effectué au sein du Laboratoire Génie-Microbiologie et Applications (GMA) Faculté SNV, Université des Frères Mentouri Constantine 1. sous la direction du Professeur. NECIB Y., à qui nous adressons chaleureusement nos remerciements pour l'accueil au sein de son équipe Nous le remercions également pour sa grande rigueur scientifique, sa patience et ses conseils fructueux pour faire aboutir ce modeste travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de Jury qui ont accepté d'évaluer notre travail: Président : Mr. ZITOUNI A. M.C.B et l'examinatrice : Mme BAHI A., M.C.B

Nos remerciements vont également à Mrs BAHRI, Maître Assistant A. et BOULDJADJ R. Maître Assistant A. à la Faculté de Sciences et de la Nature et de la Vie Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui ont l'amabilité de nous fournir du sang de lapin (Animalerie Chaab Ersas, Constantine1).

Nous tenons à remercier le Doctorant Mr TOUMI S. de nous avoir initiées à la recherche sur les lectines et Mr BOULDJADJ R. Maître Assistant A de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui nous a aidées à réaliser le test biologique de l'activité anti-oxydante.

Melles MERAHI I. et BENCHEHIDA Z.

- Dédicaces -

À ma très chère mère **Zahia** et mon Enseignante à l'université ; tu es le modèle qui je souhaite avoir, surtout pour tes compétences. Tes conseils m'encouragent à aller de l'avant surtout pour la Science du vivant que j'apprécie énormément Ton appui , tes sacrifices et tes soutiens durant toutes mes années d'études m'ont permis d'acquérir en moi la confiance, le courage et la sécurité. Je prie Dieu le tout puissant de te préserver, t'accorder une longue vie pleine de santé et d'épanouissement.

Je t'aime Maman.

Je dédie ce modeste travail à ma petite famille :

Ma sœur **Imène** et sa jolie fille **Jouri** que j'aime tant

Mon Frère **Zaki** et son fils aimable **A Y A D** que j'aime tant et sa femme

Mon Frère **Quanis Adib**

Mes tantes **Rabaa et Fella**

Ma cousine **Wassila** et ses bouts de choux : **S F O U, Selsabil, Ritedj et Mayar**

À mon binôme **Zeyneb** qui a partagé avec moi des périodes difficiles pour réaliser ce travail.

A mes chères amies : **Fatima, Lamiss**

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de pré ou de loin, à la réalisation de ce travail.

À tous ceux qui ont la **passion pour la science du vivant**

Ilhem

Dédicaces

*À l'aide de dieu "Allah" tout puissant
Qui m'a tracé le chemin de ma vie,
J'ai pu réaliser ce travail.*

Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.

*À ma très belle chère mère **Saida** ; tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, et puisse Dieu le tout puissant te préserver, t'accorder la santé, longue vie et bonheur. Je t'aime Maman.*

*À mon très cher père **Saïd** ; Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation, et puisse dieu t'accorder santé et longue vie. Je t'aime
Papa.*

*À mon petit très chère frère unique ; **Kosay***

*À mes très chers sœurs; **Rayane et Selma, et son fesse Joud***

*À mon binôme **Uham** qui est partagée avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

À mes chères amies ; fatima, lamiss, Siham, Amina, et Nour el houda.

Je remercie toute les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de pré ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

À tous ceux qui aiment la science.

Zeynb

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Etude Bibliographique

1. Généralités sur les lectines et leurs propriétés biologiques.....	3
1.1. Généralités sur les lectines	3
1.2. Structures des lectines	4
1.4. Spécificité et classification des lectin	4
1.5. Activités biologiques des lectines	6
1.6. Distribution des lectines dans le monde vivant	10
1.7. Applications biotechnologiques des lectines	11
1.8. Les fonctions biologiques des lectines	13
2. La plante <i>Eucalyptus globulus</i>	14
2.1. Généralités	14
2.2. Classification systématique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	14
2.3. Utilisations d' <i>Eucalyptus</i>	15
3. Groupes sanguins	16
3.1. Généralités	16
3.2. Groupes ABO, Lewis	16

3.3. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO	17
3.4. Lectines spécifiques des groupes sanguins	18

Matériels et Méthodes

1. Etude phytochimique

1.1. Préparation des échantillons de variétés locale.....	19
1. 2. Préparation d'une suspension d'hématies de lapin à 4%	21
1.3. Test d'agglutination	21
1.4. Préparation de l'échantillon des fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i>	21
1.5. Limite agglutinante des fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i>	22
1.6. Précipitation au sulfate d'ammonium	22
1. 7. Limite d'agglutination après précipitation par le sulfate d'ammonium.....	22
1.8. Dialyse	22

2. Etude des caractéristiques de l'extrait de lectine

2.1. Effet de la température sur l'activité agglutinante	23
2.2. Effet du pH sur l'activité agglutinante	23

3. Inhibition d'agglutination par les glucides

3.1. Test d'agglutination	23
3.2. La limite d'inhibition d'agglutination par des glucides	23

4. Test d'agglutination sur les hématies humaines ABO

5. Purification partielle de l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus*

6. Dosage des protéines

7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH	25
---	----

Résultats et Discussions

1. Etude phytochimique

1.1. Test d'agglutination	27
1.2. Activité hémagglutination de l'extrait brut des graines et des corpuscules d' <i>E. globulus</i>	28
1.3. Précipitation de lectine des corpuscules au sulfate d'ammonium	29
1.4. Limites d'hémagglutination des fractions F 50-70% et F 70-90%	30

2. Caractéristiques physico-chimiques de la lectine des corpuscules

d' <i>Eucalyptus Globulus</i>	31
2.1. Effet de température sur l'activité l'agglutination	31
2.2. Effet de pH sur l'agglutination	33

3. Tests d'inhibition de l'activité agglutinante.

3.1. Test d'inhibition par les glucides	35
3.2. Test de la limite inhibitrice d'agglutination par la fêtuine	36

4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO

5. Purification partielle de l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus*

6. Test d'agglutination des fractions partiellement purifiées

7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

Conclusion et Perspectives

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des Abréviations

- BHA** : Butyl hydroxyanizole.
- BHT** : Butylhydroxytoluène.
- BSA** : Bovine serum albumin
- Con A** : Concavoline A
- DPPH** : 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl
- E.B** : Extrait brut
- Fru** : Fructose
- Gal** : Galactose.
- Gal Nac** : N-acetyl Galactosamine
- Glu** : Glucose
- HE** : Huile essentielle / Huiles essentielles
- IC50** : Concentration inhibitrice IC50
- Mal** : Maltose
- Man** : Mannose
- PBS** : Phosphate Buffer Saline
- ROS** : Espèce réactive de l'oxygène
- TCA** : Trichloro Acetic Acid
- VIH** : Human immunodeficiency virus type 1

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Spécificité des lectines vis-à-vis des monosaccharides (Sharon N., 2007)	6
Tableau 2 : Origine et distribution de quelques lectines et leurs propriétés biologiques	11
Tableau 3 : Domaines d'application des lectines	12
Tableau 4 : Rôles de quelques lectines dans les organismes vivants (Drickamer K., 1993)	13
Tableau 5 : Différentes groupes sanguine du system A, B, O (Bailly P. <i>et al.</i> , 2015)	16
Tableau 6 : Les groupes sanguins et leur lectine spécifique.....	18
Tableau 7 : Comparaison des tests d'agglutination des extraits bruts.....	27
Tableau 8 : Estimation d'activité agglutinante de différentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait brut des corpuscules d' <i>Eucalyptus globulus</i>	29
Tableau 9 : Limite agglutinante des lectines d'extraits bruts des corpuscules de la fraction 50 - 70% chauffés à différentes températures pendant 60 min	31
Tableau 10 : Effet de la température sur l'activité agglutinante de la fraction 70% dialysée des corpuscules d' <i>Eucalyptus globulus</i>	32
Tableau 11 : Effet du pH sur la limite d'agglutination des fractions 50-70% dialysé d' <i>Eucalyptus globulus</i> des corpuscules	33
Tableau 12 : Effet du pH sur l'activité agglutinante la fraction 50-70% dialysé des corpuscules d' <i>E. globulus</i>	34
Tableau 13 : Test d'inhibition de la fraction 50- 70% d' <i>E. globulus</i> par différents glucides et glycoprotéines.....	35
Tableau 14 : Limite inhibitrice d'agglutination par la fêtuine sur l'extrait des corpuscules <i>E. globulus</i>	36
Tableau 15 : Test d'agglutination avec les érythrocytes humains ABO	37
Tableau 16 : Teneur en protéines des corpuscules d' <i>E. globulus</i> à différentes fractions	40
Tableau 17 : Profil de purification de l'extrait brut des corpuscules d' <i>E. globulus</i> par chromatographie sur gel d'exclusion séphacryl S-200 HR	40
Tableau 18 : Valeurs des IC50 trouvées pour des antioxydants de références et l'extrait brut des corpuscules d' <i>E.globulus</i>	41
Tableau 19 : Comparaison des IC50 de diverses lectines	42

Liste des Figures

Figure 1 : Structure tridimensionnelle de lectine montrant les trois sites potentiels de liaison avec un sucre en α , β et γ (Grahn E.M. et al.,2009).....	4
Figure 2 : Exemple d'interaction lectines-glucides de rôles de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire (Mathieu S., 2011)	5
Figure 3: Test d'agglutination pour la détection de lectine Santos A. F. S. et al.,2014.....	7
Figure 4 : Schéma représentatif montrant les sites de liaison des lectines végétales . (Vandenborre G. et al., 2010,2011)	9
Figure 5: Composition en glucides des groupes sanguins du système ABO.....	17
Figure 6: Représentation schématique de l'expression des antigènes A, B et H (Reid M.E. Lomas-Francis C. et Olsson M.L., 2012)	17
Figure 7: Schéma d'extraction de lectine à partir de différents échantillons	20
Figure 8: Courbe d'étalonnage des protéines	25
Figure 9: Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Congo M., 2012).	25
Figure 10: Comparaison des Tests d'agglutination des extraits bruts	27
Figure 11: Activité agglutinante des fruits d' <i>E. Globulus</i>	28
Figure 12: Limite d'agglutination de l'extrait brut les corpuscules et des graines d' <i>E. globulus</i>	28
Figure 13 : Test d'agglutination des fractions précipitées par le sulfate d'ammomium.....	29
Figure 14 : Limites d'agglutination des fractions 50-70% (A), 70- 90%(B)	30
Figure 15 : Détermination de la température optimale de la lectine	32
Figure 16 : Effet du pH sur l'activité agglutinante de fraction 50-70% dialysé des corpuscules d' <i>E. globulus</i>	34
Figure 17: Test d'inhibition d' agglutination par divers glucides	35
Figure 18: Limite inhibitrice d'agglutination par la fétuine sur l'extrait des corpuscules <i>E. globulus</i>	36
Figure 19 : Profil de chromatographie sur gel d'exclusion séphacryl S -200 HR de l'extrait des corpuscules d' <i>E. globulus</i>	38
Figure 20 : Test d'agglutination des fractions purifiées 22, 23, 24,25	39
Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH avec différentes concentrations de standards et différentes concentration d'extrait brut de corpuscules d' <i>E. globulus</i>	41

Résumés

Résumé

Le but de cette étude est la détection d'une lectine en quantité appréciable, une glycoprotéine à activité biologique. Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires (végétaux, animaux et microorganismes). Un screening a été réalisé sur les racines de 06 plantes médicinales (*Drimia maritima*, *Asphodelus cerasiferus*, *Rosmarinus officinalis* L., *Carlina gummifera*, *Quercus rotundifolia* Lamk, *Lupinus albus*) les graines de 03 plantes médicinales (*Trigonella foenum-graecum*, *Triticum durum*, *Lavandula angustifolia*) et les gousses de caroubier *Ceratonia siliqua* L., un champignon « *Amanita ovoidea* » et les fruits d'*Eucalyptus globulus* pour mettre en évidence la lectine recherchée.

Après séchage et extraction dans un tampon PBS (0,01M, pH7,4) et macération durant 24 heures, la détection et la quantification de lectine est réalisée par agglutination sur du sang de lapin (fixé dans le glutaraldéhyde à 1 %) et en double dilution dans des microplaques.

L'activité agglutinante de l'extrait des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* (contenant 5,4 mg / 5 g /30 ml) est la plus importante 1: 9 (soit 512 U). Le sulfate d'ammonium a précipité la lectine avec une saturation maximale à 70% néanmoins une partie de la lectine est précipitée à 90 %.

Les lectines de l'extrait des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* montrent une agglutination avec tous les groupes sanguins mais une forte sélectivité pour les hématies du groupe B.

Le test d'inhibition pour différents glucides a donné une inhibition par la fêtuine. Ce résultat prouve que la lectine d'*Eucalyptus globulus* est O-glycosylée.

La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* est stable dans une gamme pH 7,4 -10 pendant une heure cependant l'activité agglutinante est optimale à pH 10. La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* O-glycoprotéine alcaline. La température optimale de la lectine est de 70 °C (après une incubation de 60 min).

La purification partielle par chromatographie d'exclusion moléculaire (Sephacryl-S-200 HR) donne un pic d'activité séparé après le pic correspondant à d'autres protéines et le pic des protéines exclues dans le volume mort. La pureté de la lectine reste à vérifier par SDS –PAGE.

Le test anti-oydant par le DPPH donne les valeurs des IC₅₀ et montre que l'extrait brut a une IC₅₀ de 5,6 ± 1,31 µg/ml proche de celle de l'acide ascorbique 6,56 ±1,15 µg/ml et du BHT 6,67± 0,59 µg/ml. Cependant, la molécule de BHA avec une IC₅₀ de 29,3 ± 3,05µg/ml, semble avoir une capacité anti-oydante faible par rapport à notre extrait et aux 02 standards. Ce résultat indique que l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* a un pouvoir antioxydant équivalent à celui de l'acide ascorbique et celui du BHT.

L'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* a montré une grande capacité anti-oydante qui peut être expliquée par la présence d'autres substances antioxydantes (polyphénols, vitamine E.....)

Mots clés : Corpuscules d'*Eucalyptus globulus*, extraction, agglutination, O-glycoprotéine, chromatographie Séphacryl S-200 HR, activité antioxydante.

Abstract

The aim of this study is the detection of an appreciable amount of lectin, a biologically active glycoprotein. Lectins are ubiquitous glycoprotein (plants, animals and microorganisms).

The seeds of 03 medicinal plants (*Trigonella foenum-graecum*, *Triticum durum*, *Lavandula angustifolia*) were screened on the roots of 06 medicinal plants (*Drimia maritima*, *Asphodelus cerasiferus*, *Rosmarinus officinalis* L., *Carlina gummifera*, *Quercus rotundifolia* Lamk, *Lupinus albus*) and the carob beans *Ceratonia siliqua* L., a fungus "*Amanita ovoidea*" and the fruits of *Eucalyptus globulus* to demonstrate the desired lectin.

After drying and extraction in PBS buffer(0,01M, pH 7,4) and maceration for 24 hours, the detection and quantization of lectin is carried out by agglutination on rabbit blood (fixed in 1% glutaraldehyde) and in double dilution in micro plates. The agglutinating activity of the extract of *Eucalyptus globulus* corpuscles (containing 5.4 mg / 5 g / 30 ml) is the most important 1: 9 (i.e. 512 U). Ammonium sulfate precipitated the lectin with a maximum saturation of 70%; nevertheless part of the lectin was precipitated to 90%.

The lectins of the extract of the *Eucalyptus globulus* corpuscles show agglutination with all the blood groups but a high selectivity for the red blood cells of the group B.

The inhibition test for different carbohydrates gave inhibition by fetuin. This result proves that *Eucalyptus globulus* lectin is O-glycosylated. The lectin of the *Eucalyptus globulus* corpuscles is stable in a pH 7.4-10 range for one hour, but the agglutinating activity is optimal at pH 10. The lectin of *Eucalyptus globulus* O-glycoprotein alkaline corpuscles. The lectin is 70 ° C (After incubation for 60 min). Partial purification by molecular exclusion chromatography (Sephacryl-S-200 HR) gives a peak of activity separated after the peak corresponding to other proteins and the peak of the proteins excluded in the dead volume. The purity of the lectin remains to be verified by SDS-PAGE.

The DPPH anti-odor test gives the IC₅₀ values and shows that the crude extract has an IC₅₀ of 5.6 ± 1.31 µg / ml close to that of ascorbic acid 6.56 ± 1.15 µg / ml and BHT 6.67 ± 0.59 µg / ml. However, the BHA molecule with an IC₅₀ of 29.3 ± 3.05µg / ml, seems to have a low antioxidant capacity compared to our extract and to the 02 standards. This result indicates that the crude extract of the corpuscles of E. Globulus has an antioxidant power equivalent to that of ascorbic acid and that of BHT. The crude extract of the corpuscles of E.globulus showed a great antioxidant capacity which can be explained by the presence of other antioxidant substances (polyphenols, vitamin E ...)

Keywords: *Eucalyptus globulus* corpuscles, extraction, agglutination, O-glycoprotein chromatography Sephacryl S-200 HR, antioxidant activity.

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو الكشف عن الكيتين بكميات ملموسة، وهي عبارة عن بروتين سكري يتميز بعدة نشاطات بيولوجية. تتواجد في جميع الكائنات الحية (النباتات والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة). تم إجراء الفحص على 06 جذور نباتات طبية *Drimia maritima*, *Asphodelus cerasiferus*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Carlina gummifera*, *Quercus rotundifolia* و *Lamk*, *Lupinus albus* و بذور 03 نباتات طبية (الحلبة، الحنطة القاسي، صرم ضيق الأوراق) والقرون من شجرة الخروب. و فطر الأمانت الافويد وثمره من شجرة الكاليتوس بغرض تسليط الضوء عل الكيتين المطلوب.

بعد التجفيف لمدة 24 ساعة، ويتم الكشف النوعي والكمي من قبل كيتين بتراص مع دم الأرنب (الثابت في 1% غلوتارالدهيد) والتخفيف المزدوج .

نشاط التخثر لاستخراج كريات الكافور (التي تحتوي على 5.4 ملغ / 5 غ / 30 مل) هو الأهم 1:9 (أي 512 وحدة)

عجلت كبريتات الألمونيوم الكيتين مع أقصى قدر من التشيع في 70%، ولكن بعض من كيتين هرعت إلى 90% .

مستخلص الكيتين من كريات الكاليتوس تظهر تراص مع جميع أنواع الدم ولكن الانتقائية العالية لفريق كريات الدم الحمراء صنف B

اختبار تثبيط عن الكربوهيدرات المختلفة أعطى تثبيط من فتوين.

مستخلص كيتين جسيمات الأوكالبتوس مستقرة في مجموعة ودرجة الحموضة 7.4-10 لمدة ساعة واحدة، ومع ذلك، فإن النشاط التراص هو الأمثل في درجة الحموضة 10 اذن تتميز بوسط حموضة قاعدي. درجة الحرارة المثلى للكيتين هي 70 درجة مئوية (بعد مرور فترة الحضانة لمدة دقيقة 60).

تنقية جزئية من قبل الجزئي الاستبعاد اللوني Sephacryl S-200 HR يوفر ذروة منفصلة من النشاط الذروة متعلق بغيرها من البروتينات وذروة البروتين استبعادها في حجم الفراغ. يبقى التحقق من نقاء الكيتين من قبل SDS-PAGE

لمكافحة الأكسدة بواسطة إختبار DPPH يعطيه قيم IC50 على أن مستخلص الخام للكاليتوس الكروي لديه $IC_{50} = 1.31 \pm 5.6$ ميكروغرام / مل مماثلة لتلك من حمض الأسكوربيك $IC_{50} = 1.15 \pm 6.56$ ميكروغرام / مل و $IC_{50} = 0.59 \pm 6.67$. ومع ذلك، فإن جزيء BHA له القدرة ضد الأكسدة جد ضعيفة $IC_{50} = 29.3 \pm 3.05$ ميكروغرام / مل مقارنة بالكاليتوس الكروي .

إن قدرة ضد الأكسدة الكبيرة المستخلص الخام لجسيمات الكاليتوس الكروي يمكن تفسيرها بوجود مضادات أكسدة أخرى (بوليفينولات ، فيتامين E.....)

كلمات مفتاحية : جسيمات الكاليتوس الكروي ، استخراج ، phytolectin ، O-glycoprotein ، النشاط ضد الأكسدة ،

Sephacryl S-200 HR اللوني ، التراص.

Introduction

La recherche de molécules bioactives est toujours d'actualité pour éradiquer les pathologies persistantes comme le diabète, les infections, les cancers,

Parmi ces biomolécules, nous sommes intéressés à la recherche de phytolectine bioactive. Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires qui se lient spécifiquement à différents motifs de sucre en raison de leur hydrate de carbone du domaine de reconnaissance (**Sharon N., 2008**), qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Cette liaison de la protéine aux glucides se fait de manière non covalente et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis à vis de leur ligand et n'appartiennent pas à la classe des immunoglobulines (**Lis H. et Sharon N., 1998**). En fonction de la chronologie des recherches sur ces glycoprotéines particulières, elles ont été baptisées agglutinines, hémagglutinines, phytohémagglutinines et finalement lectines (du verbe latin *legere* = choisir) car elles possèdent, la capacité de distinguer les divers groupes sanguins humains. Pour un certain nombre d'auteurs, la notion de lectine n'est plus basée sur le pouvoir agglutinant, mais seulement sur la reconnaissance spécifique par la protéine d'un motif glucidique porté par la membrane d'une cellule (sanguine ou non). La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène (**Mathieu S., 2011**).

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 de lectines, propriété classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation. 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 (**Sabóia Aragão K., 2008**).

Les lectines ont diverses applications notamment la reconnaissance antigénique du groupe sanguin, le type d'infection des (infections virales, bactériennes, mycoplasmiques et parasitaires), la détermination de type de cancers ou de métastases cancéreuses associés à des altérations complexes lors des processus de glycosylation, la croissance et la différenciation cellulaire (**Gabius H.J. et Gabius S., 2002**).

Les lectines sont glycoprotéines non immunitaires et jouent un rôle important dans les interactions entre les cellules, cellule-matrice et sont connues pour exercer des fonctions essentielles dans le système immunitaire (**Boyd W.C. et Sharpleigh E., 1954**).

Les plantes, les champignons sont les groupes les plus étudiés pour leurs lectines et ont pris une attention considérable en raison de leurs activités biologiques prometteuses (**Singh R.S. et al., 2010**). Les lectines végétales ont attiré une attention particulière en raison de leur abondance dans les graines car elles jouent le rôle d'anti-insecticide (**Peumans, W.J. et al., 1995**).

Certaines lectines se lient spécifiquement aux membranes ou aux récepteurs des cellules cancéreuses et provoquent une inhibition de la croissance tumorale (Liu B. *et al.*, 2009, Pervin M. *et al.*, 2015). D'autres possèdent des propriétés biologiques comme les activités antimicrobiennes (antibactériennes, antifongiques et antivirales (Swanson M.D., 2010) et antioxydantes (Ozsoy N. *et al.*, 2012, ; e Lacerda R. R. *et al.*, 2016).

Le contenu de lectine varie dans selon l'organisme d'origine. La recherche d'une lectine avec un bon rendement protéique facilite la production des masses de lectines (Lam, S.K. *et* Ng T.B., 2011).

Dans notre étude, nous avons procédé à un screening de diverses plantes médicinales et de champignon pour trouver une espèce à fort rendement en lectine. Pour cela, 12 espèces d'organismes sont testés : 06 racines et 03 graines de plantes médicinales, les gousses du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) et un champignon « *Amanita ovoidea* » et les fruits « *Eucalyptus globulus* ». Toutes les extractions des lectines sont réalisées en milieu aqueux (Tampon PBS) après une macération de 24 heures.

Notre travail est en trois parties:

- ✓ Une première partie consacrée à une étude bibliographique sur les lectines des plantes médicinales et leur pouvoir agglutinant du système sanguin humain ABO.
- ✓ La seconde partie décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental
- ✓ La troisième partie comporte les résultats et leur discussion : étude des propriétés physico-chimiques de la lectine d'intérêt *Eucalyptus globulus*, purification partielle sur Sephacryl S-200 HR, activité anti-oxydante de la lectine.

***Revue
Bibliographique***

1. Généralités sur les lectines et leurs propriétés biologiques

1.1. Généralités sur les lectines

Les lectines sont des glycoprotéines 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 H. et Sharon N., 1998). Elles possèdent une caractéristique qui leur est spécifique, la capacité à agglutiner les érythrocytes en reconnaissant des fractions glucidiques des glycoprotéines de la surface cellulaire (Kiran Kumar K. et al., 2012).

Les lectines sont ubiquitaires et se répartissent entre les plantes, les microorganismes, les algues et les animaux (Goldstein I.J et al., 1978 ; Hassan M.A.A. et al., 2015) .

Vers les années 1888 et 1889, Stillmark, décrit, pour la première fois les propriétés d'agglutination d'une lectine d'extraits de graines de ricin (*Ricinus communis* L.) appelée ricine (ou abrine).

En 1898, Elfstrand utilise le terme d'"hémagglutinine" pour désigner ces molécules. La toxicité de l'abrine et de la ricine attirent l'attention. En 1890, Paul Ehrlich, le père de l'immunologie, démontre que la ricine a la propriété d'être **antigénique**.

En 1902, Landsteiner démontre la **réversibilité** de l'interaction entre la ricine et les érythrocytes (sauvion N., 2004).

Chez l'homme, les lectines ont été signalés comme responsables d'intoxication alimentaire, d'anémie hémolytique, d'ictère, des troubles digestifs, de la malabsorption des glucides et les allergies de type I (Kiran Kumar K. et al., 2012). Elles constituent un groupe hétérogène de protéines, souvent résistantes à la protéolyse dans le tractus gastro-intestinal.

Les lectines animales jouent un rôle régulateur dans la différenciation et la formation des organes (Sharon N., 1983) et participent à la métastase des cellules cancéreuses (Raz, A et al., 1987), ainsi que la migration des lymphocytes de la circulation sanguine dans les organes lymphoïdes (Junqueira L.C et al., 1995). Dans certains virus, les lectines sont responsables de leur attachement aux cellules hôtes (Hassan M.A.A et al., 2015).

Bien qu'ils soient des protéines omniprésentes, les lectines les plus étudiées à ce jour, sont celles appartenant à la famille légumineuses, comme *Phaseolus* sp., *Vigna* spp. et *Canavalia* spp. (Sumner J.B. et al., 1936).

Certains espèces de haricots sont particulièrement riches en phytohémagglutinines (Pha) comme les haricots « *red kidney* », qui contiennent 2 types de lectines : *Pha-E* (Érythroagglutinine) et *Pha-L* (leuagglutinine) (Sharon N. et Lis H., 1989). D'autres phytolectines sont également connues, comme la concanavaleine A, l'agglutinine de soja, la lectine de pois, (avec une concentration protéique 10% à 8%) et les lectines de graines (Harvey D.J., 2008).

Dans les plantes, la plupart des lectines agissent comme un système défensif contre les champignons et les insectes (Peumans, W.J et Van Damme E.J., 1995) et certaines lectines jouent le rôle de médiateurs de la relation symbiotique des légumineuses et des bactéries fixatrices d'azote (Brock, T. et al., 1994).

1.2. Structure des lectines

Les lectines ont des structures variées, certaines sont des monomères, d'autres sont des oligomères où les sous-unités associées par des forces non covalentes en une molécule polymère (Miège J., 2016).

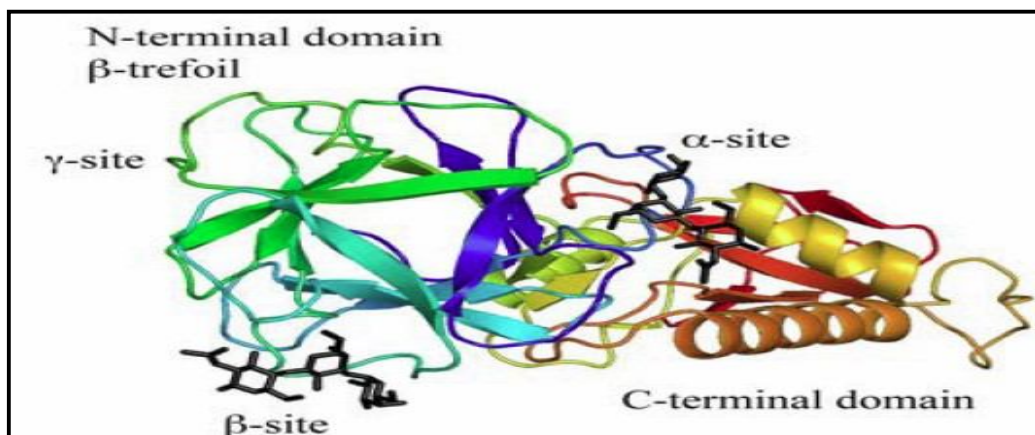


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de lectine montrant les trois sites potentiels de liaison avec un sucre en α , β et γ (Grahn E.M. et al., 2009).

La concanavaline A, est un tétramère où des ions métalliques interviennent dans l'assemblage des sous-unités et dans la configuration du site de liaison (Min W. et al., 1992).

La phytohémagglutinine de l'haricots blancs *Phaseolus vulgaris* (PHA) est un homodimère où chaque sous unité a une masse moléculaire (Chan Y. S. et al., 2015). Il existe cinq isolectines telles: L4, L3E1, L2E2, L1E3 et E4 (Yufang H. et al., 2010).

1.3. Spécificité et classification des lectines

La plupart des lectines sont spécifiques pour un groupe de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. D'après Sharon N. et Lis H., 2003 ; Sharon N., 2007, deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Gianluca, C., 2006).

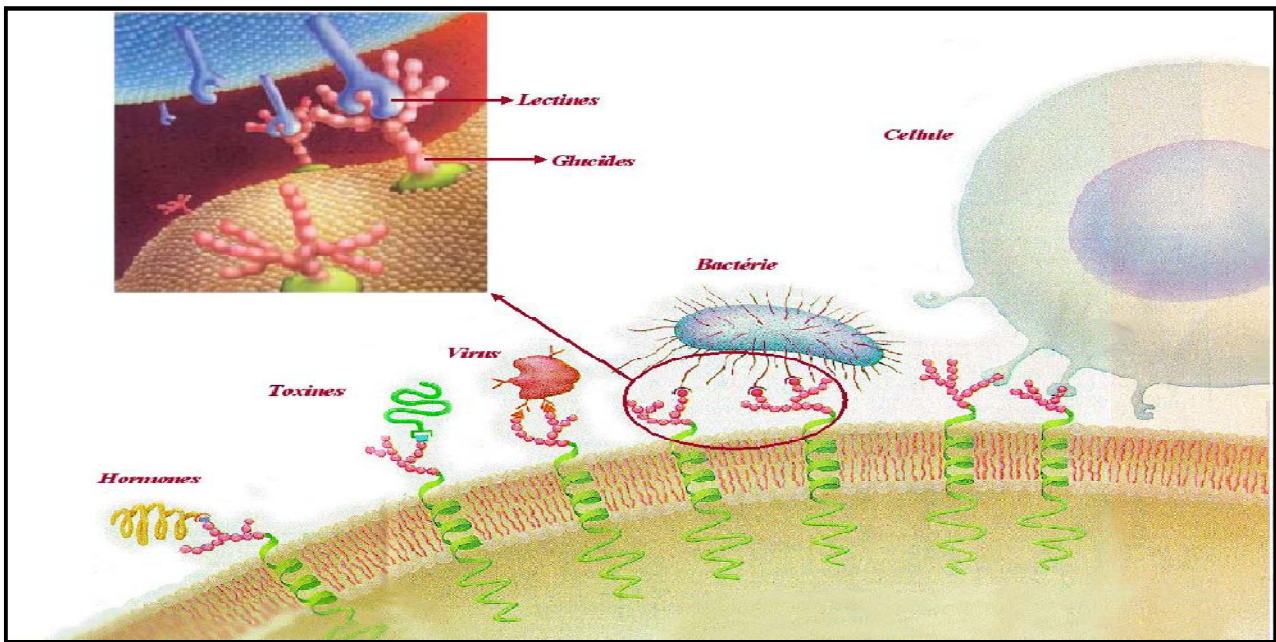


Figure 2 : Exemple d'interaction lectines-glucides de rôles de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire (Mathieu S., 2011)

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines où la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc, (Sabóia Aragão K., 2008).

Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 de monosaccharides tels que l' α -methyl-galactoside et l' β -methyl-galactoside.

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 (Sabóia Aragão K., 2008). Il existe 05 groupes spécifiques pour les monosaccharides récapitulés dans le tableau 1

Ces monosaccharides et leurs dérivés sont les principaux constituants des épitopes des surfaces des cellules eucaryotes. Très peu de lectines reconnaissent l'acide sialique sous la forme de monosaccharide. (Sharon N., 2007).

Tableau 1 : Spécificité des lectines vis-à-vis des monosaccharides (Sharon N., 2007)

Sucre	Lectine
Man	<i>Allium sativum</i> ; <i>Canavaliaensiformis</i> ; <i>Crocus sativus</i> ; <i>Diocleandiflora</i> <i>E.Coli type 1 fimbriae</i> ; <i>ERGIC-53</i> ; <i>Galanthusnivalis</i> ; <i>MBLs of animals</i> ; <i>Pisumsativum</i> ; <i>Viciafaba</i>
Fuc	<i>Aleuriaaurantia</i> ; <i>Anguilla Anguilla</i> ; <i>Lotus tetragonolobus</i> ; <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosalectin II</i> ; <i>Ulexeuropaeuslectin I</i> ; <i>Ulvalactuca</i> ; <i>Chromobacteriumviolaceumlectin</i>
Gal/ GalNac	<i>Arachishypogaea</i> ; <i>Coprinuscinereus</i> ; <i>Entamoebahistolytica</i> ; <i>Erythina</i> <i>coraliodendron</i> ; <i>Dolichosbiflorus</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Griffoniasimplicifolia</i> <i>lectin I</i> ; <i>helixpomatia</i> ; <i>HygrophorushypotheJus</i> ; <i>Phaseolus limensis</i> ; <i>Moluccellalaevis</i> ; <i>Polyandracarpamisakiensis</i> ; <i>Ptilotafilicina</i> ; <i>Ricinuscommunis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosalectin I</i>
GlcNac	<i>Conglutinin</i> ; <i>Griffoniasimplicifoglialectin II</i> ; <i>Tachylectin-2</i> ; <i>Triticum</i> <i>aestivum</i> ; <i>Ulexeuropaeuslectin II</i> ; <i>Psathyrellavelutina</i>
NeuNac	<i>Achatinafulica</i> ; <i>Cancer antennarius</i> ; <i>Hericiumarinaceum</i> , <i>Homarusamericanusletin I</i> ; <i>Limaxflavus</i> ; <i>Triticumaestivum</i> ; <i>Scylla serrata</i> ; <i>Psathyrellavelutina</i>

Les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes. Les liaisons hydrogène entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et très directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité. Une importante contribution à la force de l'interaction vient parfois des interactions hydrophobes. Les sucres sont des molécules très polaires mais la disposition des groupements OH peut créer des zones hydrophobes qui peuvent donner lieu à des interactions avec les résidus aromatiques, comme la tyrosine ou le tryptophane. Ce type d'interaction est appelé *stacking interaction* (Sabóia Aragão K., 2008). La présence d'une lectine - protéine reconnaissant des glucides est détectée à l'aide d'un dosage de l'héماغlutination. Ces molécules ont la capacité d'induire le phénomène l'agglutination cellulaire (Kennedy J. F et al., 1995).

1.5. Activités biologiques des lectines

Les lectines, par la diversité de leur séquence en glucides, possèdent plusieurs activités biologiques

1.5.1. Agents coagulants ou agglutinants

Le dosage de l'héماغlutination est effectué par série dilution d'un échantillon contenant une lectine et incubation avec des globules rouges humains ou animaux; dans ce processus, les sites de liaison aux glucides interagissent avec les hydrates de carbone ou les glycoprotéines présentes à la surface érythrocytaire formant un réseau d'agglutination parmi les cellules (Correia M.T.S. et al., 2008). Ce processus est illustré à la (Fig. 3).

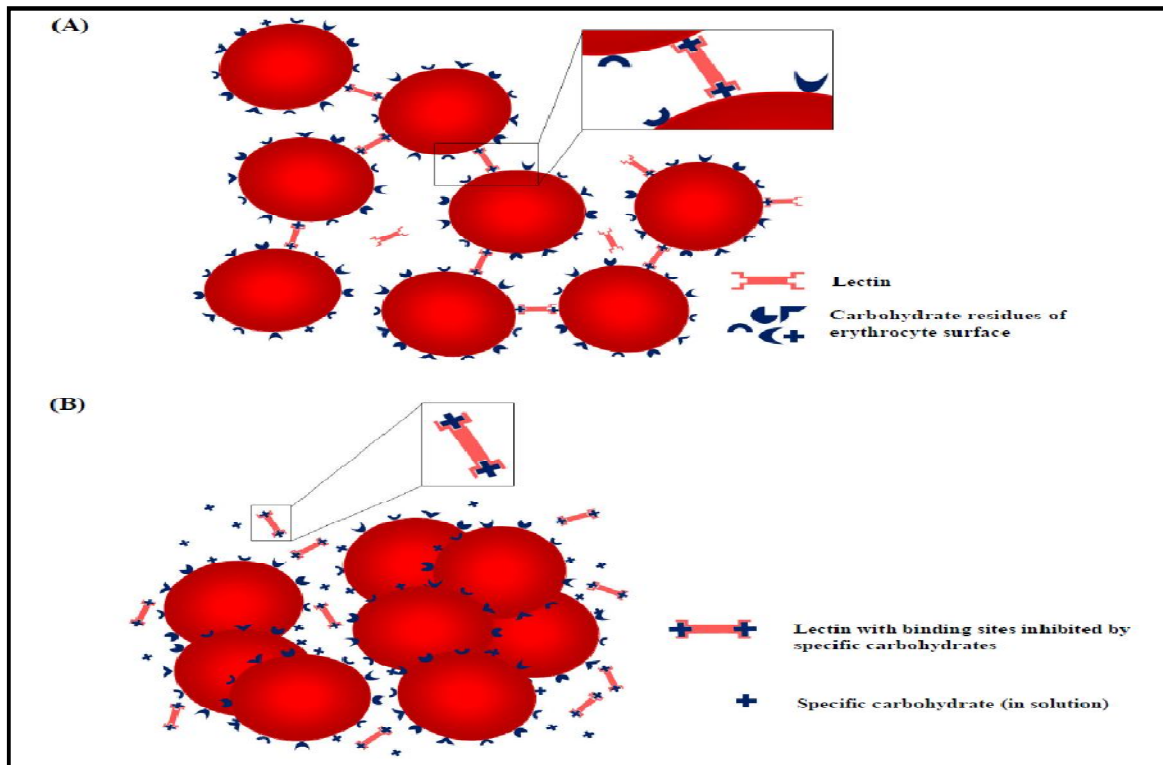


Figure 3: Test d'agglutination pour la détection de lectine (A) et inhibition d'agglutination prouvée par la présence de lectine et leur spécificité avec les glucides(B) (Santos A. F. S. et al., 2014).

1.5.2. Activité anti-oxydante et immunitaire

Le stress oxydant est reconnu comme une altération de l'homéostasie redox cellulaire (Favier A., 2003). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables du dysfonctionnement et de la mort cellulaire, il est actuellement prouvé que les ROS sont de véritables seconds messagers impliqués dans l'expression de gènes et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire (Dhalla N.S. et al., 2000). Les antioxydants naturels peuvent avoir des pièges à radicaux libres, des agents réducteurs, les extincteurs de l'oxygène singulet, etc... De nombreuses recherches récentes se développent pour trouver des antioxydants naturels destinés à être utilisés dans des aliments ou des médicaments pour remplacer les antioxydants synthétiques dont l'action est limitée en raison des effets secondaires engendrés (Kumaran A., Karunakaran R.J., 2007). Des études antioxydantes *in vitro* ont montré clairement que la lectine des champignons, endophytes, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Trichotheciump sp.* possèdent des activités antioxydantes plus importantes *in vitro* que la lectine de l'extrait du champignon *Album viscum* (Sadananda T.S. et al., 2014).

Les lectines ont des effets pro et anti inflammatoires (Assreury A.M.S., 1997) et provoquent l'activation de la voie alterne du complément et l'aggrégation des immunoglobulines (Nachbarm S. et Oppenheim J.D., 1980).

Les lectines forment des signaux de production des cytokines (Souza *et al.*, 2013) comme est le cas des lectines de *Viscum album L.* qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages et elles modulent la réponse immunitaire par réduction des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- α) (Lee *et al.*, 2007).

1.5.3. Activité anti-tumorale

Il est bien documenté que les lectines ont un effet antitumoral. La lectine du champignon *Flammulina velutipes* inhibe la prolifération des cellules de leucémie L1210 (Ng T.B. *et al.*, 2006).

L'hémagglutinine de haricots rouges foncés a exercé une activité antiproliférative envers la leucémie, cellules L1210 (Xia L. *et* Ng T.B., 2006). La lectine de soja (*Glycine max*) inhibe prolifération de cellules cancéreuses du sein MCF7 et du foie Hep G2 (Lin P. *et al.*, 2008). La lectine de *Beanna pourpre* « Extralong » a arrêté la prolifération des cellules cancéreuses HepG2 en induisant la production de corps apoptotiques (Fang E.F. *et al.*, 2010).

1.5.4. Activité antimicrobienne

➤ Activité anti-virale

La lectine D-mannose spécifique de *Gerardia savaglia* était d'abord signalé pour prévenir l'infection des cellules H9 par des humains virus de l'immunodéficience (VIH) -1. En outre, la lectine inhibé la formation de syncytium dans le HTLV-IIIIB / H9-Jurkat Système cellulaire et VIH-1 / système de lymphocytes humains en réagissant avec les chaînes latérales d'oligosaccharides de la gp120 de HIV-1 molécule d'enveloppe (oligosaccharides à forte teneur en mannose (Müller W.E. *et al.* 1988).

Les lectines végétales affichées contre les Coronavirus, en particulier, les lectines liant le mannose, provoquent, dans les cas graves, un syndrome respiratoire (Keyaerts E. *et al.*, 2007). Les lectines des bananes sont liés directement à la protéine d'enveloppe du VIH-1 (gp120) et permettent le blocage de l'entrée du virus dans la cellule et la diminution des niveaux du produit fort-stop de la transcription inverse précoce (Swanson M.D. *et al.*, 2010).

➤ Activité anti-bactérienne

L'activité antibactérienne des lectines se produit à travers l'interaction avec N-acétylglucosamine, l'acide N-acétylmuramique (NAc-Mur) et les tétrapeptides liés Mur-NAc présent dans la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives ou au lipopolysaccharide présent dans les parois cellulaires des bactéries de Gram négatif (Dziarski R. *et al.*, 2000).

Des études antérieures ont révélé que l'isolectine I de la plante *Lathyrus ochrus* se lie l'acide muramique et au muramyl dipeptide - deux composants communément trouvés dans les parois cellulaires bactériennes à travers les liaisons hydrogène. L'interaction sucre et le site de liaison du glucide de la lectine se fait par des interactions hydrophobes des résidus Tyr¹⁰⁰ et Trp¹²⁸ (Bourne Y. *et al.*, 1994).

Un autre mécanisme dans activité anti bactérienne de type phagocytaire, est démontrée dans plusieurs études : phagocytose de E.coli par des lectines mannose spécifique (Athamna, A. et Ofek I. 1988 ; Ohman L. et al., 1985)

➤ *Activité anti-fongique*

L'activité antifongique de lectine se produit à travers une interaction avec la paroi des cellules fongiques, composée de chitine, de glycanes et d'autres polymères (Adams D.J., 2004). L'interaction chitine-lectine contraignante peut nuire à la synthèse et / ou au dépôt de la chitine au niveau de la paroi cellulaire, empêche ainsi le développement des hyphes et la germination des spores (Selitrennikoff C.P., 2001; Trindade M.B. et al., 2006). Il a également suggéré que les petites lectines antifongiques, l'hévéine (47 kDa) et lapoutéine (14 kDa) des graines de *Pouteria torta* (famille *Sapotaceae*), peuvent traverser la paroi cellulaire fongique pour atteindre la membrane plasmique et bloquer les sites actifs des enzymes impliquées dans le développement cellulaire (Boleti A.P.A. et al., 2007). Les lectines anti-fongiques, par le phénomène de phagocytose, tue les champignons pathogènes (Ghoneum M. et Gollapudi S., 2004).

1.5.5. *Activité anti- insecticide*

La plupart des lectines végétales se caractérisent par des activités anti-insecticides (Vandenborre G. et al., 2011). Au cours des dernières années, le développement de plantes résistant aux attaques d'insectes a ouvert un champ prometteur pour l'utilisation de lectines végétales dans les stratégies de lutte anti-parasitaire (Carlini C.R. et Grossi-de-Sá M.F., 2002 ; Mohan Babu R. et al., 2003). Les mécanismes, les plus probables, qui sous-tendent l'activité entomotoxique des lectines impliquent des interactions avec différentes glycoprotéines type glycanes des insectes (Vandenborre G. et al., 2010,2011).

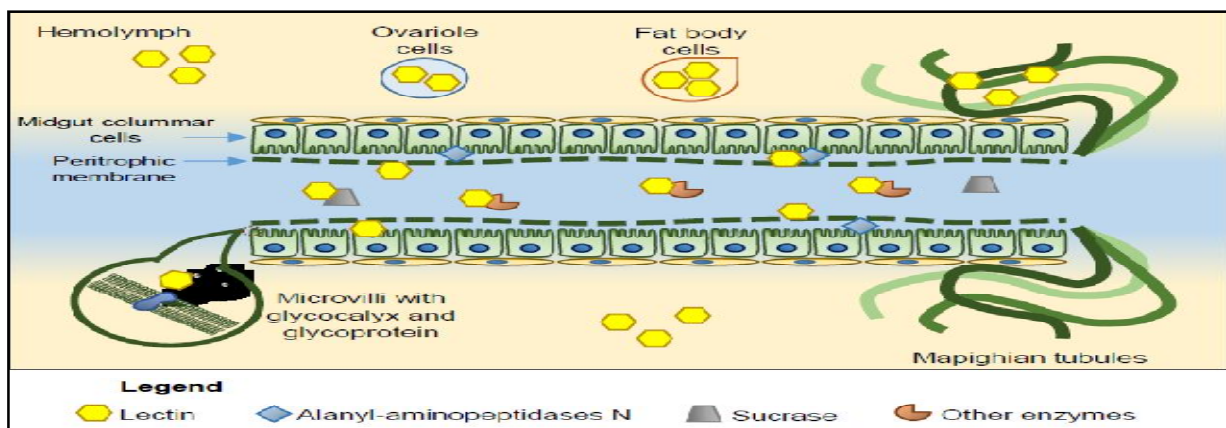


Figure 4 : Schéma représentatif montrant les sites de liaison des lectines végétales. (Vandenborre G. et al., 2010,2011)

La caractéristique principale d'une protéine insecticide est sa résistance à la dégradation protéolytique dans l'intestin des insectes. Par exemple, la lectine *Moringa oleifera* (cMoL) est résistante à la digestion par les protéases d'*Anagasta kuehniellat* jusqu'à 12 h (Oliveira C.F.R. et al., 2011) et la lectine de *Olneya tesota* résiste aux enzymes digestives de *Zabrotes subfasciatus* pendant 24 h (Lagarda-Diaz I. et al., 2008).

La compréhension du mécanisme antiparasitaire des lectines permet la lutte contre les hémiptères et d'autres insectes nuisibles d'où l'intérêt économique de cette opération qui permet d'augmenter les rendements en agriculture.

1.5.6. Autres propriétés

La purification des protéines utilise la chromatographie à base de lectine immobilisée sur des billes de gel : chromatographie d'affinité à la Concanavalline A, est appliquée dans l'isolement des protéines dont la plupart sont glycosylées exprimant les structures bi-élémentaires et hybrides N-liées et « Highmannose Glycans », abondantes même à l'état embryonnaire (Alvarez-Manilla G. et al., 2010).

1.6. Distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines se rencontrent communément dans les graines surtout des légumineuses, dans des tubercules, les bulbes (tissus de réserves) les tiges, les feuilles de *Schinus terebinthifolius* (Gomes F.S. et al., 2012) et les racines de *Curcuma longa L.* (Petnual P. et al., 2010). Dans les organes jeunes, les lectines existent en faibles quantités. Leur présence est généralement limitée aux premiers stades du développement de la plantule (Miège J., 2016).

En dehors des plantes supérieures, des lectines existent chez les champignons comme *Viscum album* (Sadananda T. S. et al., 2014), les lichens, les bactéries comme *Pseudomonas Aeruginosa*, (Grishin A. V. et al., 2015), les animaux inférieurs (escargot, *Helix promatia*) et même chez des vertébrés (anguille, poulet, rat). Cette large répartition ne peut être fortuite mais laisse présager qu'elles ont des rôles importants dans la physiologie des organismes.

Tableau 2 : Origine et distribution de quelques lectines et leurs propriétés biologiques

Origine	Distribution	Structure	Inhibition par les sucres	Références
Végétale				
Concanavaline A (Con A) de <i>Canavalia ensiformis</i>	Fève d'haricot	Homotétramère (ss unité 23.5 KDa)	D-mannose et au D-glucose.	MinW. et al., 1992
<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	Graines	homodimère (ssunité 30KDa)	Glucosamine	Chan Y. S. et al., 2015
<i>Psophocarpus palustris</i>	Graines	Hétérodimère (ss unités 4,5KDa et 2,7 KDa)	D-mannose, D-galactose	Kuku A. et al., 2005
<i>Phaseolus acutifolius</i>	Graines	Monomère (28 ou 31 KDa)	N-glycane	Valadez-Vega C. et al., 2011
Animale				
Escargot <i>Helix pomatia</i> « Agglutinin » (HPA)	le système reproducteur	Trimère (ss-unité 13 KDa)	O-GalNAc	Hammarstrom S. et al., 1977
<i>Cinachyrella apion</i>	l'éponge marine	Octamère de 124 kDa, (ss-unité 15,5 KDa)	lactose	Rabelo L. et al., 2011
Amibe <i>Dictyostelium discoideum</i>	Surface cellulaire	28.258 (DiscI) 28.575 (DiscII)	Gal/GalNAc	Sabóia Aragão K. 2008. Thèse, Univ.J.F., Genoble, 125p.
Microbienne				
<i>Saccharomyces uvarum</i>	associée à la paroi cellulaire.	40 kDa	D-Mannose-6-phosphate, p- α -Nitrophenylmannopyranoside, D-Mannosamine	Javadekar V.S. et al., 2000
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	associée à la paroi cellulaire.	70 kDa	GlcNAc, D-glucose et D-mannose,	Coltri K. et al., 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		(PA-IL 12,8Kda) (PA-IIL 11,9 kDa)	PA-IL (D-GAL, N-acétyl-D-GAL amine) PA-IIL (L-fucose)	Gilboa-Garber N. et al., 2000 ; Mitchell E., et al., 2002 ; Cioci G. et al., 2003

Comme nous le constatons sur le tableau 2, les lectines ont des structures différentes et des sites de reconnaissance très diversifiés.

1.7. Applications biotechnologiques des lectines

Les lectines peuvent être utilisées pour dans divers domaines. A titre d'exemples, certaines applications sont répertoriées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Domaines d'applications des lectines

Domaine	Application	Références
Domaine medical		
Hématologie	Identification des groupes sanguins, séparation des leucocytes, isolement des macromolécules contenant des résidus saccharidiques (Antigènes des groupes sanguins)	Miège J., 2016
Immunologie	Plusieurs lectines végétales exercent des activités immunomodulatrices par leur interaction avec les glycanes .tel que la transduction du signal, produire certaines cytokines et induisent une immunité efficace, réponses contre les tumeurs ou les infections microbiennes.	Teixeira C.R. et al., 2006 ; Coltri K.C. et al., 2008 ; Stojanovic M.M. et al., 2009
Biologie cellulaire	Etudier la nature et les structures des membranes possédant des résidus saccharidiques.	
Biochimie Clinique	Marqueurs tumoraux Enquêtes épidémiologiques	Pillai K.R. et al., 1996 ; Schaller W.D. et al., 2012
Agronomie		
Insecticide	Des plants de riz transgéniques démontrant une expression spécifique de tissu de GNA (<i>G. nivalis</i>) ont été construits et évalués Pour le contrôle de la trémie de plante brune. GNA a également présenté des effets insecticides pour le puceron de la pomme de terre (<i>Aulacothumsolani</i>) par la transformation des plants de pommes de terre.	Rao K.V. et al., 1998 Down R.E. et al., 1996

1.8. Les fonctions biologiques des lectines

Les lectines sont des biomolécules qui interviennent au cours de différents processus biologiques des organismes vivants selon leurs spécificités et leurs modes d'action. Le tableau suivant résume les fonctions de quelques lectines au monde vivant.

Tableau 4 : Rôles de quelques lectines dans les organismes vivants (Drickamer K., 1993).

Lectines	Rôles
Lectines fimbriales	Adhésion, infection
Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines	Adhésion, infection
Influenza haemagglutinine	Adhésion, infection
Lectines de surface	Adhésion
<i>Plantes</i>	
Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
Autres	Défense
Calnexine	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
M-type	Dégradation des protéines dans le RE
L-type	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
P-type	Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose; régulation du cycle cellulaire; modulation des interactions cellule-cellule et cellule-substrat
C-type	Adhésion cellulaire (selectines), Clearance des glycoprotéines, réponse immunitaire (collectines)
Galectines	Reconnaissance des glycannes dans la matrice extracellulaire
I-type	Adhésion cellulaire dans le CNS (siglecs)
R-type	Ciblage des enzymes, régulation du turnover des hormones

2. La plante *Eucalyptus globulus*

2.1. Généralités

L'arbre *Eucalyptus* est originaire de Tasmanie, région du SUD de l'Australie. Son appellation provient du grec : **eu** « bien » et **kaluptos** « couvert ». Il fut décrit et baptisé par le botaniste français L'HERITIER en 1788. En 1800, 19 espèces d'*Eucalyptus* furent démontrées et nommées. Vingt ans plus tard, 71 espèces d'*Eucalyptus* avaient reçu des noms et 148 en 1890 (Bigendako M.J., 2004).

Plus de 150 espèces d'eucalyptus sont exploitées dans le monde de façon significative en plantation, en particulier 04 espèces : *E.camaldulensis*, *E.globulus*, *E.tereticornus*, *E.grandis*. La majorité des espèces d'*Eucalyptus* présentent un nombre de chromosome de $2n = 22$. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs et de couleur brune et mesurent de 1,5 à 2,5 cm de diamètre ont une capsule très dure. De nombreuses petites graines s'échappent par des valves qui s'ouvrent sur le dessus du fruit (NCBI, 2017). Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol (Bigendako M.J., 2004).

Les plantations d'arbres d'*Eucalyptus* ont été introduites en Europe, où elles se sont très bien acclimatées sur les rivages méditerranéens peut croître jusqu'à 30-55 m de haut. En 1860, cette espèce a été introduite en Algérie par les français. Au cours des années 40 et 50, les eucalyptus ont été introduits dans 18 arboretums, où pas moins de 130 espèces ont été plantés sur le territoire national (Irénee Modeste Bidima, 2016). Nous sommes intéressés dans ce modeste à la lectine des fruits de l'espèce *E.globulus*.

2.2. Classification systématique d'*Eucaluptus globulus*

Selon Kesbi A., 2011, l'*Eucaluptus globulus* se classe ainsi :

- Règne : *Plantae*
- Sous règne : *Tracheobionta*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliospsida*
- Sous-Classe : *Rosidae*
- Ordre : *Myrtales*
- Famille : *Myrtaceae*
- Genre : *Eucaluptus*
- Espèce : *Globulus*

2.3. Utilisations d'Eucalyptus

➤ *Huile médicinale*

Son principe actif qui est le **1.8 cinéol** L'HE d'eucalyptus possèdent des propriétés biologiques considérables grâce à son action antiseptique cicatrisante avec une teneur supérieure à 70%. Elle est aussi utilisée comme antibiotique pour traiter certaines maladies broncho-pulmonaires comme la grippe, la toux, la sinusite, ...ect. Les propriétés anti-infectieuses et anti-bactériennes de l'HE d'eucalyptus peuvent être soulagées des maladies gastro-intestinales (**Candy G., 1977**).

➤ *Huile industrielle*

Le composant cinéol d'HE d'eucalyptus est utilisé comme additif au carburant pour moteur de voiture pour assurer une meilleure miscibilité du mélange éthanol /carburant. Autres applications d'HE d'eucalyptus au domaine médical tels que les aldéhydes volatiles, notamment l'aldéhyde isovalérique, utilisable comme désinfectant.

D'autres composants comme phellandrène, est plus abondant dans l'HE d'eucalyptus, sert à parfumer les désinfectants les bon marchés et les savons liquides industriels.

L'HE d'eucalyptus est riche également en cuminal, phellandral et crypton, molécules utilisées dans la fabrication des germicides. La substance pipéronone de l'HE d'*Eucalyptus* est employée dans la fabrication d'agents odoriférants (**Boland D.J et Brophy J.J., 1991**).

➤ *Huile de la parfumerie et de la saveurs*

Dans le domaine de parfumerie, l'HE d'eucalyptus entre comme composant dans la fabrication d'eau de Cologne et donne un parfum agréable aux sachets d'odeur. La citronnelle est utilisée dans la production du parfum (**Lassak E.V., 1988**). Le composant le E-méthyl-cinnamate provient de l'espèce *E. olida* est exploité comme additif aromatique (**Curtis A., Soutwell I.A. et Stiff I.A., 1990**).

➤ *Confiserie*

L'eucalyptus est utilisé en confiserie principalement dans la fabrication de gommes au goût de menthe, ainsi que dans la fabrication de pastilles ou de pâtes destinées au traitement des maux de gorge (**Irénée Modeste Bidima., 2016**).

3. Les groupes sanguins

3.1. Généralités

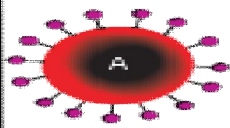
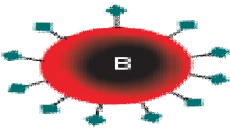

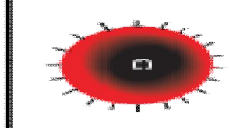



La membrane érythrocytaire a servi pendant de nombreuses années comme un modèle simplifié de plus membranes plasmiques complexes de mammifères. Les groupes sanguins, ou phénotypes érythrocytaires, correspondent à des antigènes membranaires de l'érythrocyte, dont l'expression est déterminée par une série de systèmes génétiques polymorphes, où le premier système de groupe sanguin est découvert en 1900-1901 par **Karl Landsteine** et qu'il a nommé le système ABO, Hh ou Lewis.

3.2. Groupes ABO, Lewis

Les groupes sanguins ABO sont des groupes d'antigènes, situés sur la membrane cellulaire, codés par des allèles à différents loci sur les molécules chromosomiques et classés dans des groupes sanguins, A, B, AB et O, qui dépend de deux antigènes (A et B Antigènes) (**Pramanik T. et Pramanik S., 2000**). Les individus du groupe O expriment l'antigène H, l'ABO, par conséquent, est le type de sang, alors que A, B et H se réfèrent aux antigènes. (**Reid M.E. Lomas-Francis C. et Olsson M.L., 2012**).

Le rhésus Rh est un antigène des globules rouges situé au niveau de leur paroi. Ils entrent dans la détermination du groupe sanguin d'un individu. Celui-ci permet de déterminer deux systèmes de groupes sanguins différents : le Rhésus positif chez les personnes possédant cet antigène ce qui concerne la majeure partie de la population et le Rhésus négatif chez les personnes qui en sont dépourvues. Ce « facteur Rhésus » est notamment utile pour savoir si une transfusion sanguine est possible entre deux personnes (**Hordé P., 2015**).

Tableau 5: Différentes groupes sanguine du system A, B, O (**Bailly P. et al., 2015**)

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Bas d'antigène

Il a alors fait l'hypothèse que les globules rouges qui étaient agglutinés possédaient à leur surface une substance qu'il a appelée agglutinogène et que les sérums qui avaient la capacité d'agglutiner les globules possédaient une substance appelée agglutinine (Danic B. et Lefrère J.J., 2011).

3.3. Structure des antigènes de groupes sanguins du système ABO

La première indication que le système de groupe sanguin ABO pourrait être basé sur des glucides provenant de l'observation par Watkins et Morgan, qui ont étudié des animaux Watkins W.M. et Morgan W.T.J., 1952) et lectines de plantes (Morgan W.T.J. et Watkins W.M. 1953). Ils ont suggéré que le fucose était un composant de spécificité H, galactose de spécificité B et N-acétyl-Galactosamine de spécificité A.

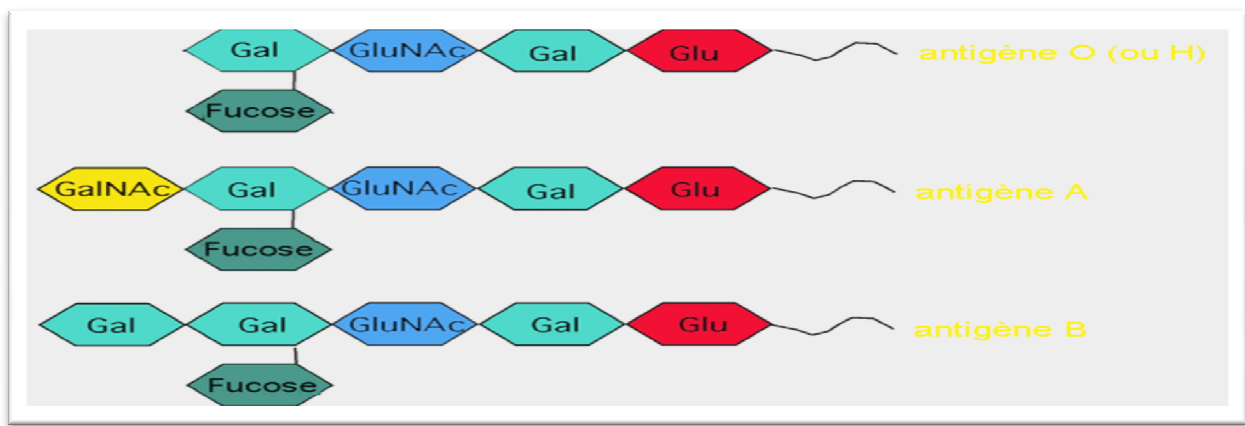


Figure 5: Composition en glucides des groupes sanguins du système ABO (<http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3c.html>, BCM -514)

En général, l'individu devrait posséder des anticorps contre les antigènes A / B manquants. par exemple, une personne de groupe O possède à la fois anti-A et anti-B, alors que le groupe AB, qui exprime les deux antigènes, est négatif pour anticorps AB. (Reid M.E. Lomas-Francis C. et Olsson M.L., 2012)

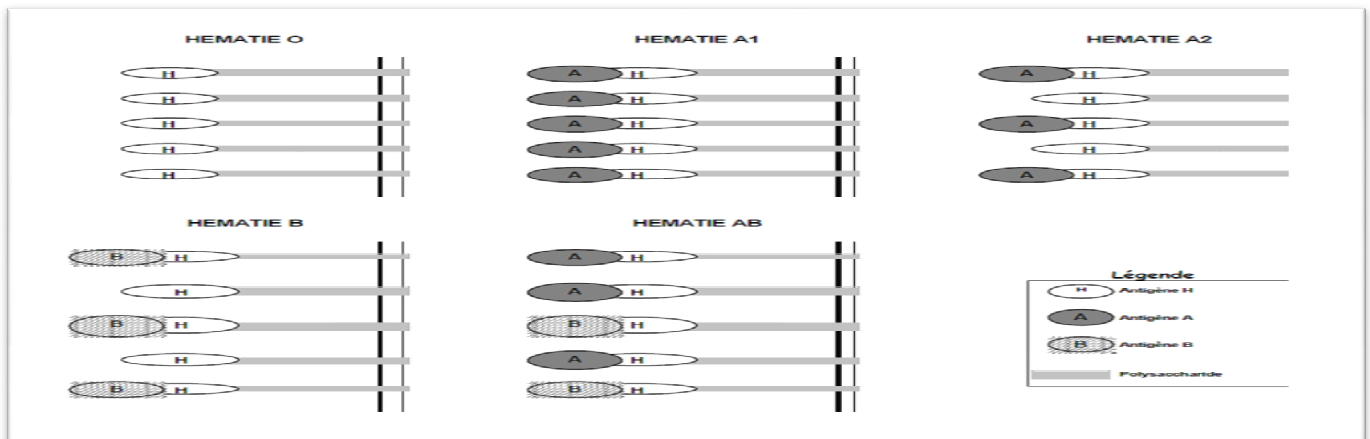


Figure 6 : Représentation schématique de l'expression des antigènes A, B et H.

(Reid M.E. Lomas-Francis C. et Olsson M.L., 2012)

3.4. Lectines spécifiques des groupes sanguins

Plusieurs lectines agglutinent les hématies avec une spécificité de groupe sanguin (Bird G.W.G. et Wingham J., 1974). La spécificité des lectines aux groupes sanguins est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Les groupes sanguins et leur lectine spécifique.

Spécificités	Source de lectines	Références
A	<i>Phaseolus limensis</i> <i>Otola lactea</i> <i>Crotolaria striata</i> <i>Codium fragile</i> <i>Helix hortensis</i> <i>Vicia villosa</i>	Boyd W.C. et Regura E., 1949 Boyd W.C. et Brown R., 1965 Khang N.Q., et al., 1990 Rogers H.T. et al., 1977 Prokop O. et al., 1905 Richard H.T., 1998
B	<i>Griffonia simplicifolia</i> (BSI) <i>Ptilota plumosa</i> <i>Salmo salar</i> <i>Abranis brama</i> <i>Bandereiraea simplicifolia-I</i> <i>Nelumbo nucifera</i>	Murphy L.A. et Goldstein I.J., 1977 Rogers H.T. et al., 1977 Uhlenbruk G. et Dahr W., 1971 KraJhanzal et al., 1978 Richard H.T., 1998 Goker H. et al., 2008
H (O)	<i>Ulex europaeus</i> <i>Anguilla anguilla</i> <i>Systisus ratisbonensis</i> <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Matsumoto I. et Osawa T., 1974 Horesji V. et Kocourek J., 1978 Renkonen O.K., 1948 Cazal P. et al., 1952
AB	<i>Sophora Japonica</i>	Goker H. et al., 2008
A, B, O, AB	<i>Anacardium occidentale</i> <i>Citrullus vulgaris</i> <i>Fragaria vesca</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Solanum melongena</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Mytilus californianus</i>	Zubcevic N. et al., 2016 García-Maldonado E. et al., 2017



Matériels
et
Méthodes

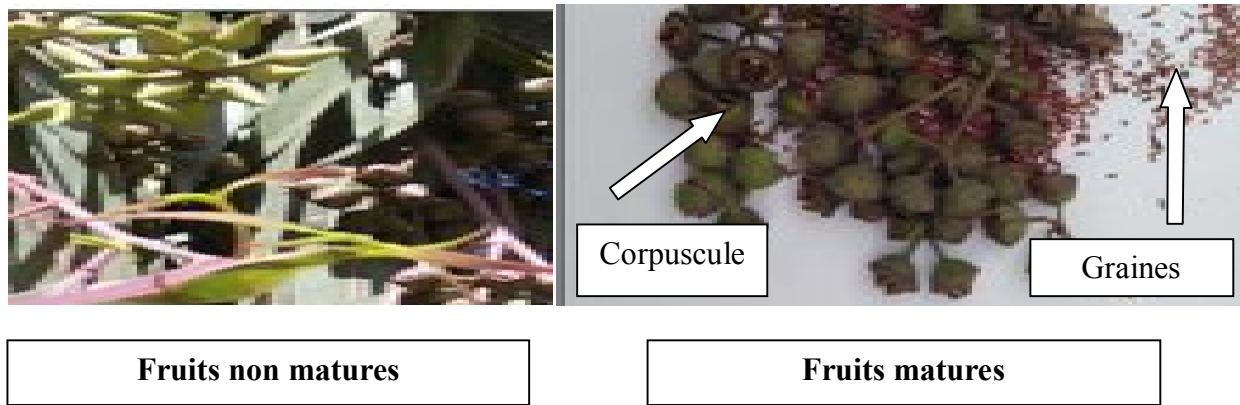
1. Etude phytochimique

1.1. Préparation des échantillons de variétés locales

➤ *La récolte des échantillons et séchage*

La collecte des espèces végétales est effectuée pendant la première quinzaine de Mars 2017.

Graines		
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (Oum El Bouaghi)	<i>Triticum durum</i> (Guelma)	<i>Lavandula angustifolia</i> (Constantine)
		
Racines (Batna)		
<i>Drimys maritima</i>	<i>Asphodelus cerasiferus</i>	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>
		
<i>Carlina gummifera</i>	<i>Quercus rotundifolia Lamk</i>	<i>Lupinus albus</i>
		
Guosses	Champignons	Fruits
<i>Ceratonia siliqua L.</i> (Mila)	<i>Amanita ovoidea</i> (Mila)	<i>Eucalyptus globulus</i> (Constantine)
		



➤ *Broyage*

Les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique et tamiser par un tamis de porosité $0,5\mu\text{m}$ jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et conservée dans un emballage bien clos.

➤ *Extraction*

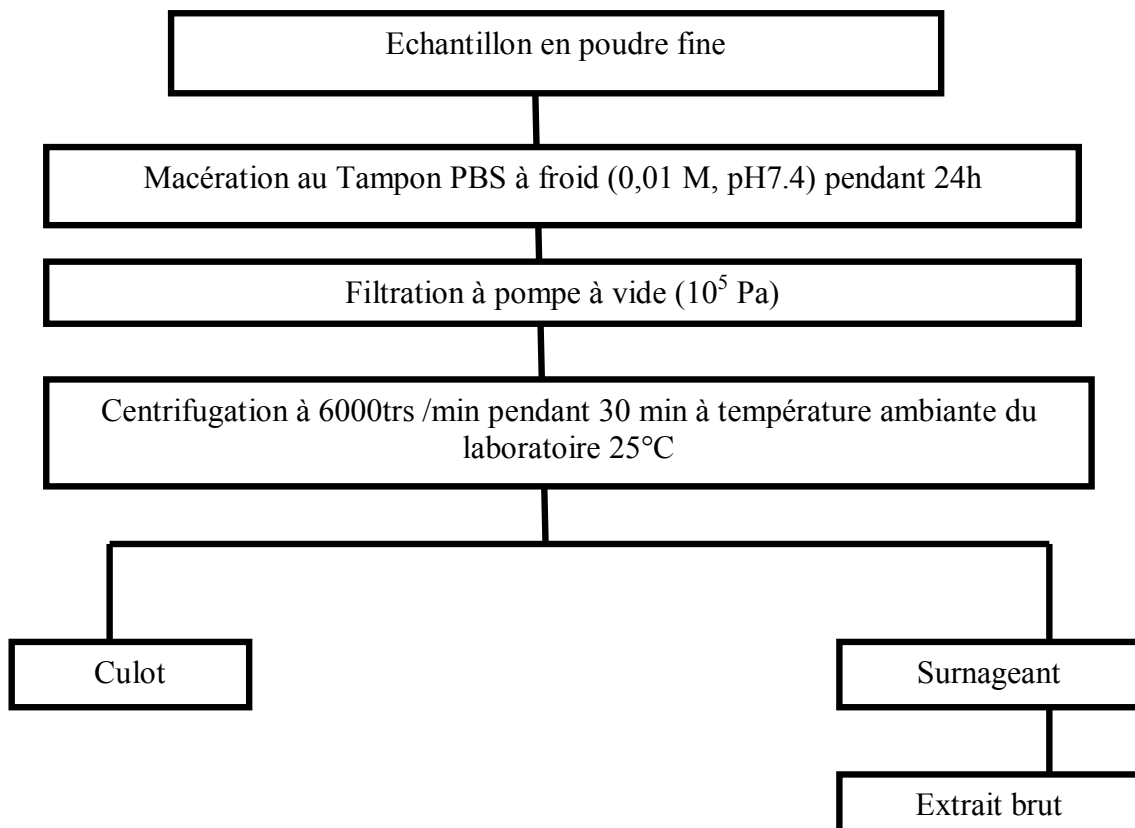


Figure 7: Schéma d'extraction de lectine à partir de différents échantillons

1. 2. Préparation d'une suspension d'hématies de lapin à 4%

La préparation de suspension d'hématies est réalisée selon la méthode de Higuichi et *al.*, 1988 et comportent les étapes suivantes :

➤ *La collecte du sang et sa fixation*

Le sang de lapin est obtenu de l'animalerie Chaab Ersas de l'Université des frères Mentouri de Constantine. Il est recueilli dans un tube hépariné de 4ml. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm/min pendant, 10 min. Le culot obtenu est lavé avec une solution de NaCl 0.9% trois fois suivi d'une centrifugation après chaque lavage. Ensuite il est dissous dans une solution d'un fixateur, le glutaraldéhyde à 1%, sous agitation et à nouveau centrifugé et lavé deux fois.

➤ *Lavage des hématies*

La suspension d'hématie est diluée par une solution de PBS (0,001M) pour éliminer le glutaraldéhyde concentré. Cette opération s'effectue trois fois, ensuite lavé par une solution de PBS (0,01M), à 4ml des hématies on ajoute 96ml de NaCl 0.9%.

Bien identifier le contenant et le conserver à 4°C pour l'utiliser au test d'agglutination (pour une durée de ne dépassant pas 21 jours).

1.3 Test d'agglutination

L'activité agglutinante d'un extrait brut, avec les érythrocytes de lapin sont fixés à 4% avec du glutaraldéhyde à 1%.

A chaque puits 25µl d'un extrait brut et 50µl d'hématies de lapin fixé sont ajoutés. Après 30 min d'exposition, l'activité agglutinante est observée à l'œil nu.

1.4. Préparation de l'échantillon des fruits d'*Eucalyptus globulus*

Après un screening de plusieurs espèces végétales ou fongiques, les fruits de la plante médicanale *Eucalyptus globulus*, s'avèrent être riches en activité agglutinante. Les fruits mûres de *Eucalyptus globulus* sont séparés en deux parties : la graine située dans la partie interne de fruit et la partie externe, les corpuscules. Ils sont ensuite broyés et soumis à une macération dans une solution tampon PBS (0,01M) pendant 24 h.

- ✓ Graines : 25g dans 125 ml
- ✓ Corpuscules : 25 g dans 250 ml

1.5. Limite agglutinante des fruits d'*Eucalyptus globulus*

La limite agglutinante démontrée par la méthode de double dilution sérielle décrit par Kuku A. et Eretan O., 2004. Le volume réactionnel pour chaque puits est de 0,1ml pour chaque dilution de l'extrait de lectine. A chaque puits on ajoute 25µl tampon PBS (0,001M), 25µl d'un extrait de lectine est déposé au premier puits suivi de double dilutions et enfin 50µl d'hématies de lapin sont ajoutés à chaque puits. Après 30 min d'exposition, la limite agglutination est observée à l'œil nu.

1.6. Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines spécifique à chaque protéine en fonction de sa composition en acides aminés. A son pHi (lorsque les charges électriques sont neutralisées), la protéine précipite. Ce phénomène s'appelle « *salting-out* ».

A chaque palier de précipitation par le sulfate d'ammonium (0-30% ; 30-50% ; 50-70% et 70-90%), la quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à ajouter est calculée en se basant sur la table monogramme de Cooper (1977, en annexe 02). Cette opération est réalisée à froid et soumis à une agitation mécanique modérée à froid pendant une durée de 20 min. Après précipitation, le mélange est centrifugé à 4000 trs/min pendant 10 min (Rama Devi P. et al., 2014). Pour chaque culot, le test d'agglutination est réalisé puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

1.7. Limite d'agglutination après précipitation par le sulfate d'ammonium.

Dans chaque puits on ajoute 25µl d'une solution tampon PBS (0,01M pH 7,4), ensuite 25µl d'extrait brut dialysé (50-70%) est ajouté au premier puits en le passant d'un puits à l'autre pour subir les doubles dilutions, ensuite dans chaque puits 50 µl d'hématies sont ajoutés.

Après 30 min d'exposition, l'activité agglutinante des lectines (teneur en lectine) est observée par l'œil nu.

1.8. Dialyse

Cette étape est réalisée pour éliminer les traces de sulfate d'ammonium et améliorer la pureté de la lectine. La fraction 50-70% (la plus active) est placée dans un sac de dialyse et mis dans un bécher de 1 L contenant 800ml de tampon PBS (0,01M, pH 7,4) pendant 24 h sous agitation à 4°C pendant une nuit.

2. Etude des caractéristiques de l'extrait de lectine

2.1. Effet de la température sur l'activité agglutinante

Le traitement thermique est réalisé sur la fraction 50-70% des corpuscules d'*E. globulus*. A chaque tubes à essai, 1 ml de l'extrait brut après dialyse, est incubé dans un bain Marie pendant une durée de 60 min (Singh A.P. et al., 2013), dans un intervalle de température variant de 30°C à 100°C. Passé ce délai, l'activité agglutinante (méthode de double dilution par un volume de 25 µl de tampon PBS (0,01M) et 25 µl de l'extrait brut et 50 µl de suspension d'hématies du lapin fixé à 4%) est testée pour chaque température.

2.2. Effet du pH sur l'activité agglutinante

L'effet du pH sur l'activité agglutinante, de la fraction 50-70 % dialysée, est réalisé sur une gamme pH 2- 11 (He S. et al., 2015). Tampon Glycine HCl (pH 2,2 -3,6), un tampon phosphate de sodium (pH 5,8 - 8), et un tampon carbonate-bicarbonate (pH 9,2-10,6), est incubé à température ambiante pendant 30 min. Le test d'agglutination est identique à celui de la température.

3. Inhibition d'agglutination par les glucides

3.1. Test d' d'agglutination

Ce test sert à démontrer la capacité de la lectine d'extrait brut d'*Eucalyptus globulus* à se lier à différents sucres.

8 glucides sont testés : 4 sucres simples D (+) glucose, D (+) fructose, D (+) galactose), 2 dissacharides (le maltose et le saccharose) ,1 dérivé de sucre, la N-acétyl-D-glucosamine et une glycoprotéine, la fétuine de 1mg à 1ml d'eau distillée. Tous ces glucides ont été testés à la concentration de 400 mM dissous dans 2 ml de tampon PBS. La durée d'exposition est de 60 min.

Après l'exposition, l'activité agglutinante est testée. A chaque puits ,25µl d'une solution du sucre, ensuite un volume de 25µl d'un extrait de lectine exposé et 50 µl d'hématies de lapin fixé sont ajoutés. Après 60 min d'exposition, l'activité agglutinante est observée à l'œil nu.

3.2. Limite d'inhibition d'agglutination par des glucides

Le test est effectué en double dilution pour montrer la concentration minimale inhibitrices (CMI) des sucres spécifiques sur la lectine de notre échantillon. Le test d'agglutination est identique à celui décrite plus haut.

4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO

4.1. Préparation de la suspension d'hématies à 4% et

Dans chaque tube hépariné 4ml de sang ABO sont collectés pour chaque adulte sain de sexe féminin dont l'âge varie de 24 à 26 ans.

Le sang collecté est centrifugé à 3000×g pendant 10 min à température ambiante. Après trois lavages avec le NaCl 0.9%, à 2ml des hématies on ajoute 48ml de NaCl 0.9% selon le protocole décrit par Pacha-Gupta R. et *al.*, 2016.

4.2. Test d'activité agglutinante

A chaque contenant 50µl d'extrait brut des lectines on ajoute 50µl suspension des hématies, après 60 min d'exposition on observe l'agglutination.

5. Purification partielle de l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus*

La purification est faite sur gel de *Séphacryl-S-200HR* (Longueur 30 cm, diamètre 1 cm, hauteur du lit de gel 23.5 cm³) (5000-250000Da). Le tassage du gel dure 48 h. Le volume d'extrait déposé est de 1.5 ml. Le tampon d'élution est le tampon PBS (0.001M, pH 7.4). Le débit d'élution est fixé à 2 ml/min pour chaque fraction de 2 ml.

6. Dosage des protéines

2 buts pour ce dosage :

- Estimer la teneur protéique de la lectine (glycoprotéine) de l'extrait brut
- Suivre l'évolution des protéines et de la lectine lors des étapes de purification

La méthode de dosage des protéines est la méthode de Bradford(1976) dont la sensibilité est de l'ordre de 1 µg. La courbe étalon est établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard avec une solution mère de 1 mg/ml.

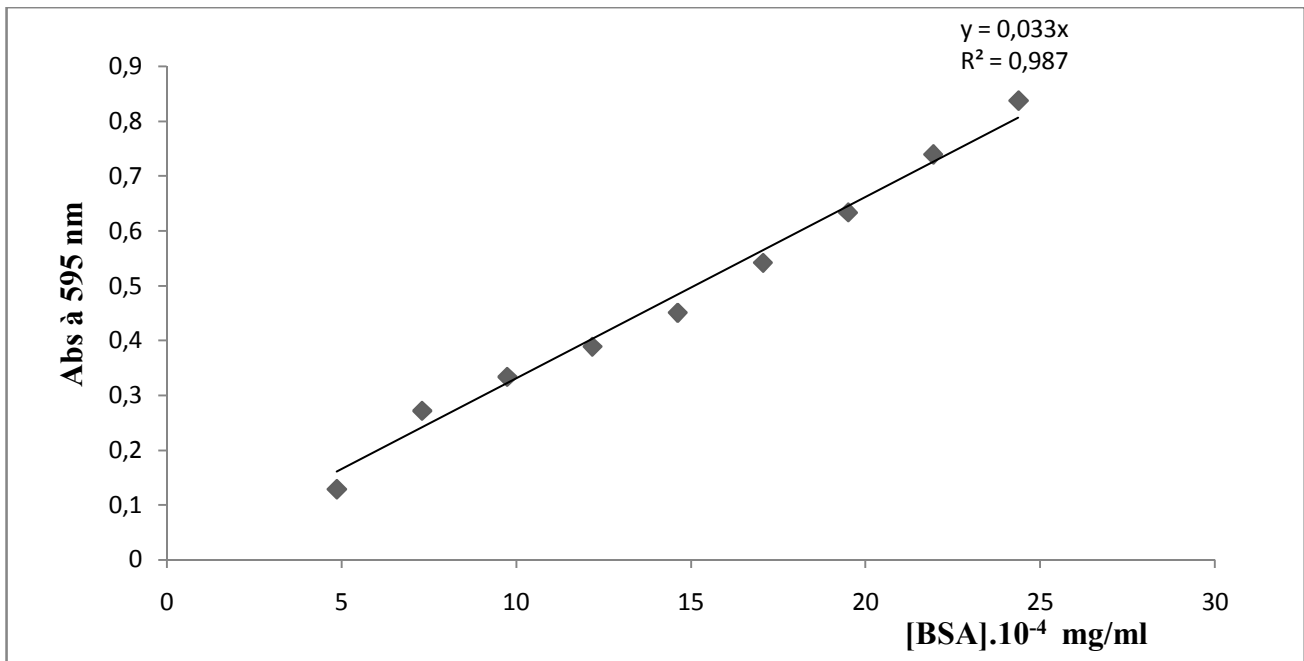


Figure 8: Courbe d'étalonnage des protéines

7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

Principe :

L'activité de piéger des radicaux libres par le DPPH est une méthode reproductible basique utilisée pour dépister la capacité antioxydante de nombreuses substances. La molécule de DPPH accepte un radical électronique ou hydrogène pour devenir une molécule stable et diamagnétique. Il ne peut être oxydé qu'avec difficulté et irréversiblement.

En raison de son étrange électron, le 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl montre une forte bande d'absorption à 517nm, sa solution apparaît comme une couleur violette profonde (Molyneux P., 2004 ; Popovici C. et al., 2010).

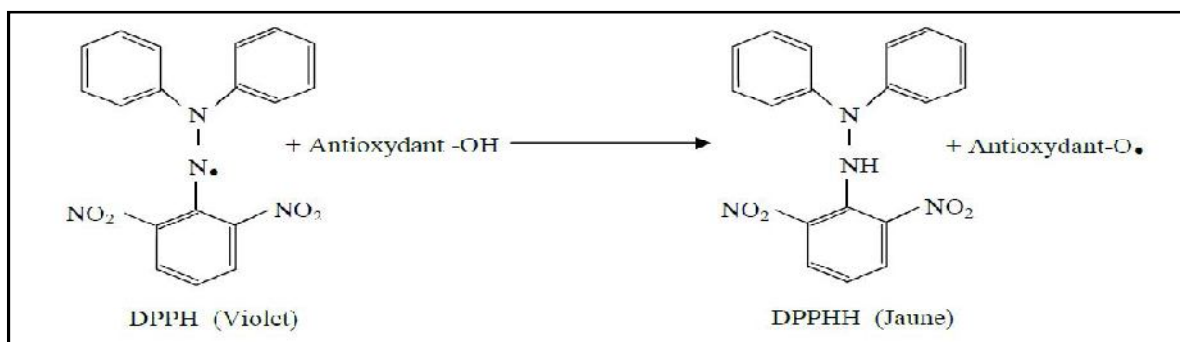


Figure 9: Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Congo M., 2012).

Méthode de dosage

Le dosage est normalisé en utilisant des solutions de standard d'acide ascorbique, de BHA ou de BHT. Le mélange réactionnel de 4 ml est composé de :

- 1 ml de concentration (variant de 5, 10, 15, 20, 25, 50 µg / ml) des différentes substances de la gamme (Acide ascorbique, BHA ou BHT) solubilisées dans du tampon phosphate 0,1 M pH 6,6.
- 1 ml de solution DPPH préparé dans du méthanol : 0.0079 g de DPPH dans 100 ml de méthanol pur.
- Incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes
- Mesure de l'absorbance à 517nm.
- Un blanc 1 ml de solution de méthanol et 1 ml l'eau distillée

L'extrait brut a subi une série de dilution dans de l'eau distillée de sorte à avoir les mêmes concentrations (variant de 5, 10, 15, 20, 25, 50 µg / ml) que les standards de référence cités ci-dessus

L'activité de piégeage du radical libre DPPH est exprimé en % d'inhibition sera calculé en fonction de l'équation suivante

$$\% \text{ d'inhibition} = (A-B) \times 100 / A$$

A = Absorbance du contrôle.

B = Absorbance de l'échantillon d'essai.

Le calcul des pourcentages d'inhibition permet de tracer les courbes d'inhibition des standards et la lectine de l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus*.

Ces tracés permettent la comparaison la capacité antioxydante de la lectine de notre extrait à celles des standards. De ces tracés, nous pouvons déduire la valeur IC50 de l'extrait de lectine

Résultats

et

Discussions

1. Etude phytochimique

1.1. Test d'agglutination

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec les érythrocytes (des animaux ou des humains) via des interactions entre les glucides membranaires. La sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'addition de l'extrait brut permet la formation d'un réseau entre les érythrocytes et les lectines. Ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène ; ceci correspond au phénomène d'agglutination.

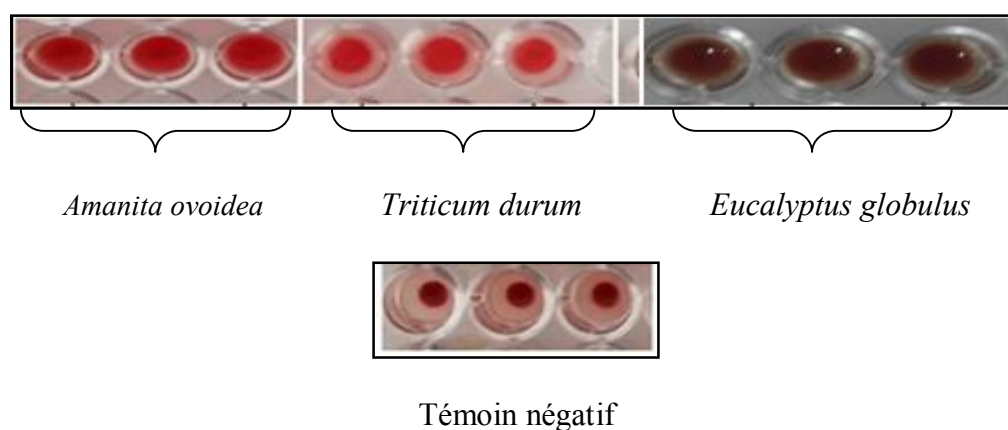


Figure 10: Comparaison des tests d'agglutination des extraits bruts

Les extraits ont réagi différemment avec le sang fixé du lapin à 4% (Fig.11 et tableau 7)

Tableau 7 : Comparaison des activités agglutinantes des lectines présentes dans différents extraits bruts

Echantillon	Activité agglutinante
<i>Triticum durum</i>	++
<i>Amanita ovoidea</i>	+++
<i>Eucalyptus globulus</i>	++++

++++ : Très forte agglutination +++ : Forte agglutination ++ : Moyenne agglutination.

Nous avons testé au total 12 extraits bruts, seuls 3 extraits à savoir les graines du blé dur *Triticum durum*, le champignon *Amanita ovoidea* et les fruits d'*Eucalyptus globulus* possèdent une activité hémagglutinante mais à des degrés variables. Les 9 autres n'ayant pas montré d'activité hémagglutinante sont : *Trigonella foenum-graecum*, *Lavandula angustifolia*, *Drimia maritima*, *Asphodelus cerasiferus*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Carlina gummifera*, *Quercus rotundifolia Lamk*, *Lupinus albus*, *Ceratonia siliqua L.*

Le résultat positif, dans ces extraits bruts, suggère la présence de lectine ayant reconnu la partie glycosylée des membranes des érythrocytes de lapin

L'extrait brut des fruits matures d'*Eucalyptus globulus* a manifesté une très forte activité agglutinante par rapport aux graines *Triticum durum* et au champignon *Amanita ovoidea* (Fig.10). Cette forte agglutination des fruits matures d'*Eucalyptus globulus* témoignent de la présence d'une lectine glycosylée dans les fruits matures d'*Eucalyptus globulus* ayant probablement une activité anti insecticide.

Pour la suite de notre travail, nous avons donc retenu l'extrait des fruits d'*Eucalyptus globulus*.

Comme nous avons testé les composants totaux des fruits d'*E. globulus*, nous sommes tenté de séparer les composants du fruit : les graines et les corpuscules afin de détecter les activités hémagglutinantes pour chaque composant.

1.2. Activité agglutination de l'extrait brut des graines et des corpuscule d'*E. globulus*

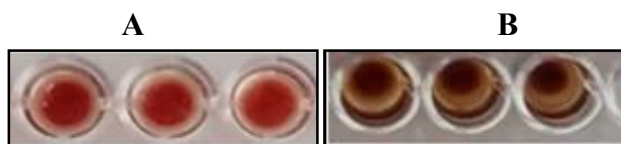


Figure 11: Activité agglutinante des fruits d'*E.Globulus* (A: graines, B: corpuscules)

L'observation des microplaques montrent que l'activité hémagglutinante est présente dans les 02 extraits bruts des graines (Fig. 11A) et des corpuscules (Fig.11B).

Au vu de la présence de lectine dans les deux parties du fruit, nous allons tester la limite agglutinante séparément pour choisir le matériel biologique pour la suite du travail.

1.3. Limite agglutinante de l'extrait brut des graines et des corpuscules d'*E.globulus*

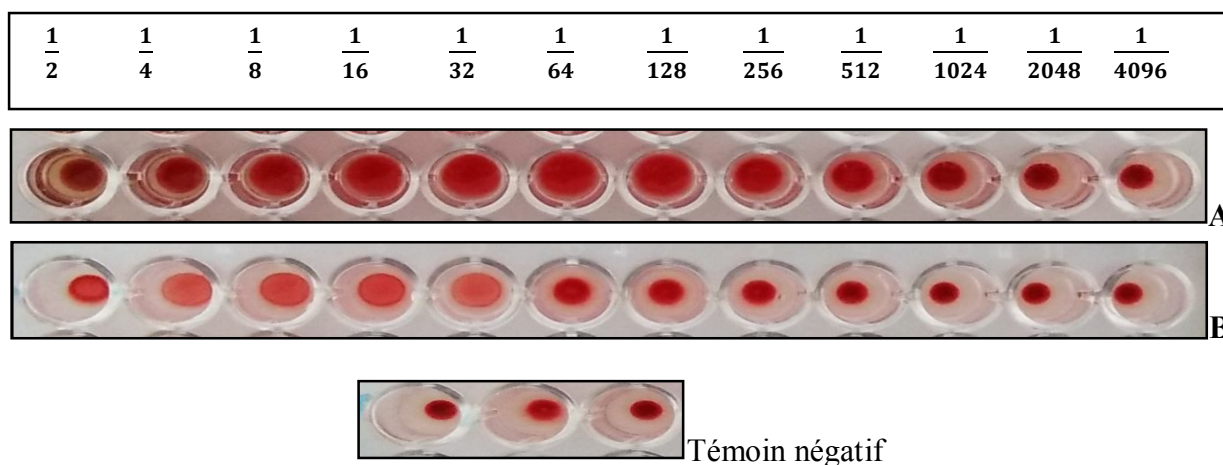


Figure 12: Limite d'agglutination de l'extrait brut des corpuscules (A) et des graines (B) d'*E.globulus*

Le test d'agglutinante de ces deux extraits a prouvé que l'extrait brut des corpuscules des fruits d'*Eucalyptus globulus* (Fig.12 A) est plus performant en activité agglutinante que celle les graines (Fig.12B) car le premier extrait a une limite d'agglutination à la dilution 1/512 alors le deuxième extrait est s'arrêté à une dilution 1/32 soit un rapport de 16 fois (512/32).

Conclusion : les **corpuscules** contiennent 16 fois plus d'activité agglutinante que les graines d'*E. globulus*. D'après la bliographie que nous avons consulté, il n'a pas de lectine dans *Eucalyptus globulus*. Ce matériel végétal sera utilisé par la suite de l'étude.

1.4. Précipitation de lectine des corpuscules au sulfate d'ammonium

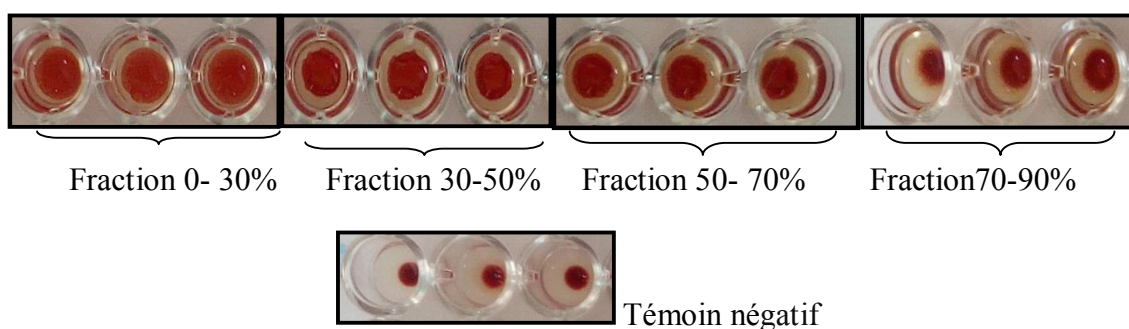


Figure 13 : Test d'agglutination des fractions précipitées par le sulfate d'ammomium

Différents niveaux de saturation $(NH_4)_2SO_4$ ont été utilisés pour purifier partiellement l'extrait brut des corpuscules d'*Eucalyptus globulus*. Le test prouve la présence de lectine dans les 04 fractions testées selon l'ordre d'importance suivant : 50- 70% > 70-90% >30 -50% >0-30% (**Tableau 9**).

Tableau 8: Estimation d'activité agglutinante de différentes fractions précipitées au sulfate d'ammonium de l'extrait brut des corpuscules d'*Eucalyptus globulus*

Fractions	0-30%	30 - 50%	50 - 70%	70-90%
Activité agglutinante	+	+	+++	++

+++ : Forte agglutination ++ : Moyenne agglutination ++ : Faible agglutination.

La présence de lectines dans les différentes fractions nous renseignent sur la présence d'isolectines que le sulfate d'ammonium a précipité différemment dans les corpuscules d'*Eucalyptus globulus*

Pour départager entre les fractions 50-70 % et les fractions 70 - 90 %, nous avons réalisé un test pour chercher les limites agglutinantes. Le test montre que la fraction 50 - 70 % est la plus active de l'extrait brut.

La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* est a un taux de saturation par le sulfate d'ammonium, similaire à la lectine des graines de *Phaseolus vulgaris* de la famille des *Fabaceae* précipitée également à 70% (Basheer A. et al., 2013). Une autre étude a montré que la lectine des graines d'*Artocarpus sp.* (espèce de la famille de *Moraceae*) est précipitée à 90% par le sulfate d'ammonium (Vijaya Bhaskara Reddy M., 2016), alors la lectine des lectines des feuilles d'*Aloevera* est précipitée à 50 % (Ozsoy N. et al., 2012). On peut conclure que la fraction précipitée à 50- 70% par le sulfate d'ammonium, contient plus de lectine que la fraction 70 – 90 %.

1.4. Limites d'agglutination des fractions F 50-70% et F 70-90%

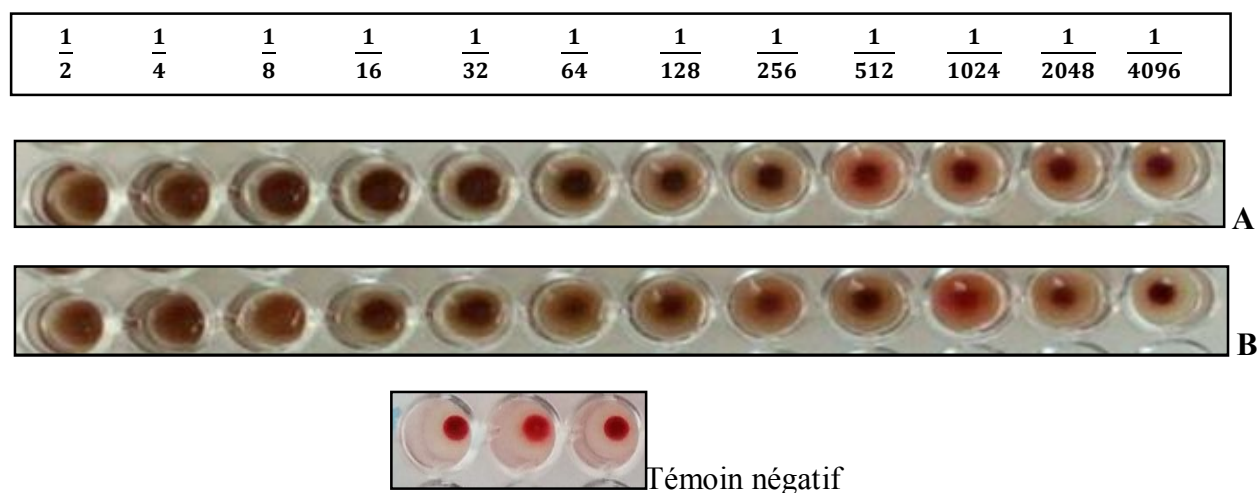


Figure 14 : Limites d'hémagglutination des fractions 50-70% (A), 70- 90% (B)

L'activité agglutinante de la fraction 50 - 70% des corpuscules *E. globulus* maintient son activité jusqu'à la dilution 1/64 contre la dilution 1/32 pour la fraction 70 - 90%.

Pour la suite du travail, nous avons choisi de travailler avec la fraction la plus active à savoir la fraction précipitée à 50- 70%.

2. Caractéristiques de la lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus*

2.1. Effet de température sur l'activité l'agglutinante

La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus Globulus* a subi un traitement thermique de 30°C -100°C pendant 30 min

Tableau9 : Limite agglutinante des lectines d'extraits bruts des corpuscules de la fraction 50 - 70% chauffés à différentes températures pendant 60 min

	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
30 C°												
40 C°												
50 C°												
60 C°												
70 C°												
80 C°												
90 C°												
100 C°												
Témoin négatif												

La lectine de la fraction 50 - 70% dialysée des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* est stimulée par la température à partir de 40 °C jusqu'à 70°C où elle atteint son activité maximale durant une incubation de 30 min et se maintient jusqu'au huitième puits soit à une dilution de 1/512. Au delà de 70°C, l'activité d'agglutination diminue jusqu' 100°C activité résiduelle avec une dilution de 1 /64 (Tableaux 9, 10).

Tableau10 : Effet de la température sur l'activité hémagglutinante de la fraction 50 -70% dialysée des corpuscules d'*E. globulus*

Température C°	30	40	50	60	70	80	90	100
Fraction 50 - 70%								
Activité agglutinante (HU) <i>E. globulus</i> (corpuscules)	+	++	++	++	+++	++	++	+

+++ : Très forte agglutination, ++ : Forte agglutination + : Faible agglutination

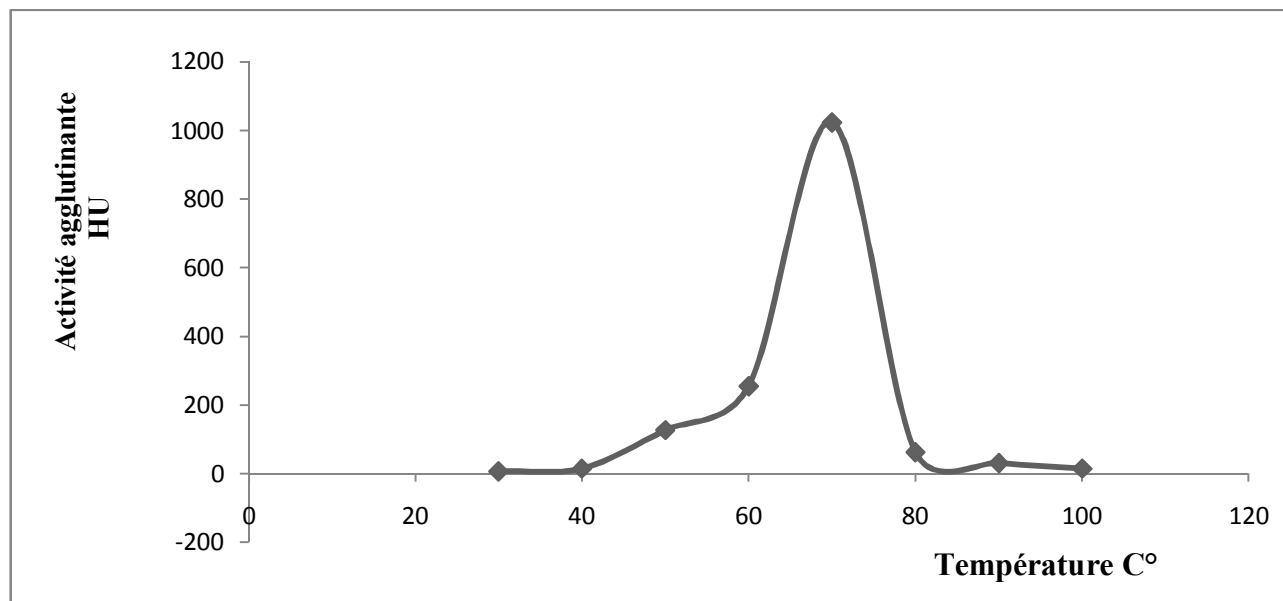


Figure 15 : Détermination de la température optimale de la lectine

La lectine est une température optimale de 70°C. Au-delà de cette température, elle perd son activité. A 100°C, la limite de dilution est de 1/64. Elle est donc relativement stable et résiste à un traitement thermique de 100°C pendant 30 min. Cette température optimale est identique à la lectine des feuilles d'*Ocimum sanctum*, 65 °C pendant 30 min (Vemuri et al., 2015).

L'optimum de température de notre lectine est également proche de la lectine des graines de *Chenopodium quinoa*, qui présente une température comprise entre 30-60°C durant un traitement thermique de 30 min (Pompeu D. G. et al., 2015).

Par contre, la lectine animale des muscles du mollusque marin *Turbo sp.* a une température optimale stable entre 20 - 40 ° C., est largement en dessous de la lectine d'*E.globulus*. Cette lectine perd complètement son activité à 70°C (Anantha Rajan R. et al., 2006).

Ces différences dans les température optimales des glycoprotéines peuvent être expliquées par plusieurs paramètres qui stabilisent leur structure conformationnelle sous l'effet des traitements thermiques : structure métalloprotéique renforcée par les ions métalliques (Nomura K. et al., 1998), teneur élevée en acide sialique (Pompeu D. G. et al., 2015), propriété commune à toutes les lectines et un pH basique (Sharma A., 2009).

2.2. Effet de pH sur l'agglutination

Tableau11 : Effet du pH sur la limite d'agglutination de la fraction 50- 70% dialysé des corpuscules d'*E. globulus*

	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
pH 2												
pH 3												
pH 4												
pH 5												
pH 6												
pH 7												
pH 8												
pH 9												
pH 10												
pH 11												
Témoin négatif												

Tableau12 : Effet du pH sur l'activité agglutinante la fraction 50-70% dialysée des corpuscules d'*E. globulus*

pH	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Activité hémagglutinante F 50-70%	-	-	-	-	+	++	++	+++	-

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

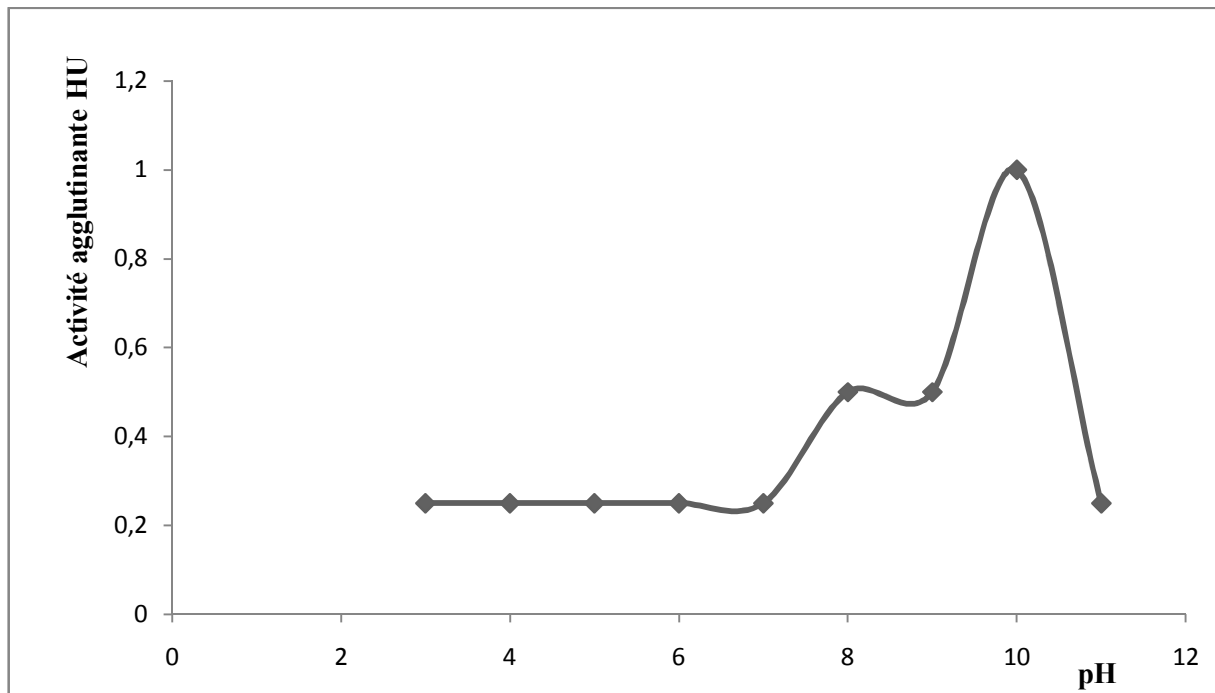


Figure 16 : Effet du pH sur l'activité agglutinante de fraction 50-70% dialysé d'*E. globulus* corpuscules

Les résultats d'effet du pH sur la lectine de la fraction 50-70% dialysé des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* montrent que la lectine n'a pas d'activité à des pH inférieur à 8. Au-delà du pH 8, la lectine montre un 1^{er} pic de pH optimal de 8, un second pic avec un pH optimum de 10. Au-dessus du pH 10, une activité agglutinante de notre lectine diminue. Ce tracé nous renseigne sur la présence de 02 isolectines avec 02 pH optimum différents mais tous les deux dans la zone alcaline.

La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* précipitée dans la fraction 50 -70 % de sulfate d'ammonium contient 02 isolectines basiques : pH 8 et pH 10. Leur composition en acides est donc différente : la première contient moins d'acides aminés basiques que la seconde.

Les 02 isolectines de la fraction 50-70 % de la lectine d'*E. globulus* ont des pH différents que celui la lectine de l'espèce végétale *Ocimum sanctum* dont le pH optimum se stabilise à pH 6 - pH 10. Les feuilles de la plante *Ocimum sanctum* contiennent un seul isoforme de lectine.

La lectine purifiée des graines de la plante *Chenopodium quinoa* contient 5 isolectines dont les pH optimum sont de 2, 4, 6, 8 et 10 : les lectines dont les pH optimum 2, 6, 10 possèdent des activités équivalentes entre elles mais supérieures à celles des lectines à pH 4,8 dont les activités sont également équivalentes (Pompeu D. G. *et al.*, 2015). La lectine purifiée de l'extrait musculaire du mollusque marin *Turbo sp.* a 2 isolectines : pH acide de 3 dont l'activité agglutinante est inférieure à celle de pH optimal proche de la neutralité 6 (Anantha Rajan R. *et al.*, 2006).

Conclusion : Les caractéristiques physico-chimiques de la lectine des corpuscules d'*E. globulus* se résument ainsi :

- La température optimale est de 70 °C
- La lectine a 02 isoformes avec 02 pH optimum alcalin : pH 8 et pH 10.

3. Tests d'inhibition de l'activité agglutinante

3.1. Test d'inhibition par les glucides

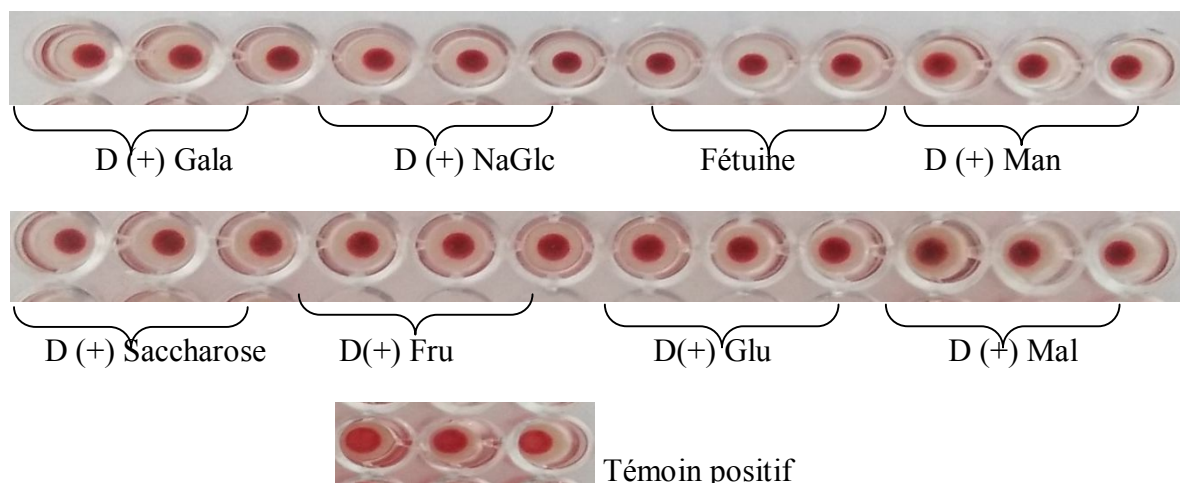


Figure 17: Test d'inhibition d'agglutination par divers glucides

Tableau 13: Test d'inhibition de la fraction 50- 70% d'*E. globulus* par différents glucides et glycoprotéines

Sucres	Gal	NaGlc	Fétuine	Man	Glu	Saccharose	Fru	Mal
Activité inhibitrice d'agglutination	-	-	+	-	-	-	-	-

+ : Inhibition d'agglutination

- : Absence d'inhibition d'agglutination

La lectine des feuilles d'*E. globulus* est inhibée par la fétuine, une glycoprotéine de type O-glycosylé. Notre lectine est donc une O-glycoprotéine et elle semble être monovalente par rapport aux glucides testés. Pour confirmer cette qualification, d'autres inhibitions avec une autre série de glucides avec plusieurs configurations ou par d'autres glycoprotéines est donc nécessaire.

La lectine O-glycosylée d'*E. globulus* est de même nature que la lectine du macro-champignon *Pholiota aurivella*, car elle est également inhibée par la fétuine en plus de l'inhibition par la l'asialofétuine, une fétuine sérique du veau fœtal (Singh R.S. et al., 2010).

L'inhibition de l'activité agglutinante d'une lectine par des glucides, leurs dérivés ou des glycoprotéines spécifiques, est due à la reconnaissance entre la lectine et ces sucres, interaction par liaison covalente.

3.2. Test de la limite inhibitrice d'agglutination par la fétuine

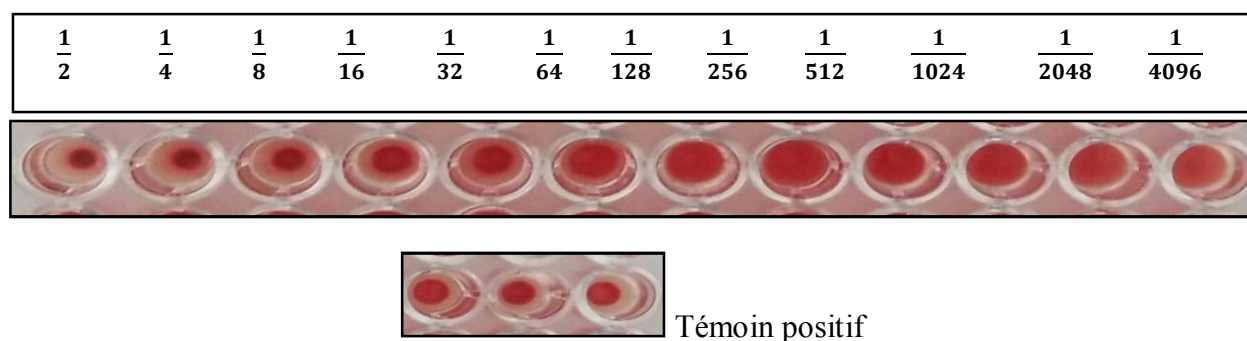


Figure 18: Limite inhibitrice d'agglutination par la fétuine sur l'extrait des corpuscules *E. globulus*

Tableau 14: Limite inhibitrice d'agglutination par la fétuine sur l'extrait des corpuscules *E. globulus*





Dilution	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
Limite inhibitrice d'agglutination	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Très forte inhibition ++ : Forte inhibition + : Faible inhibition - : Absence d'inhibition

Les résultats de limite inhibitrice d'agglutination par la fétuine (Fig. 18 et tableau 14) montrent que l'activité agglutinante s'arrête à la dilution de 1/32. La concentration en fétuine provoquant l'inhibition d'agglutination de la lectine de l'extrait des corpuscules d'*E. globulus* est de 7,81µg/ml (voir annexe pour le calcul).

3.3. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO

Tableau 15 : Test d'agglutination avec les érythrocytes humains ABO

Groupe sanguin	A	B	O	AB
Activités agglutinante				

Le test d'agglutination avec les hématies humaines ABO montre une agglutination avec tous les groupes sanguins mais une forte agglutination est observée avec les hématies du groupe B. La lectine des corpuscules d'*E. globulus* est donc polyvalente d'un point des interactions avec les 4 groupes glycosidiques qui caractérisent les groupes sanguins humains (**Tableau 15, Fig.5**).

Cette propriété est identique de la lectine des feuilles de la plante *Chrysophyllum cainitol* (**Maday D. et al., 2016**) et la lectine des graines de *Pisum sativum* (**Zubcevic N. et al., 2016**) et qui se lie aux 04 sanguins A, B, AB et O

La lectine du muscle du mollusque *Turbo sp.* a montré une activité agglutinante maximale avec uniquement les 4 groupes sanguins A, B et O pas d'agglutination avec le groupe AB (**Anantha Rajan R. et al., 2006**). La lectine de l'espèce végétale : *Cucumis sativus* est divalente car elle s'agglutine avec les groupes sanguins AB, O. D'autres lectines d'espèces végétales sont monovalentes : *Beta vulgaris* (O), *Malus domestica* (AB). Mais, il existe des espèces végétales qui ne possèdent aucune activité agglutinante vis-à-vis des 4 groupe sanguins. Il s'agit de : *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Cucurbita pepo*, *Daucus carota*, *Juglans regia*, *Musa paradisiaca*, *Solanum lycopersium*, *Vitis vinifera* (**Zubcevic N. et al., 2016**)

4. Purification partielle de l'extrait brut d'*Eucalyptus globulus*

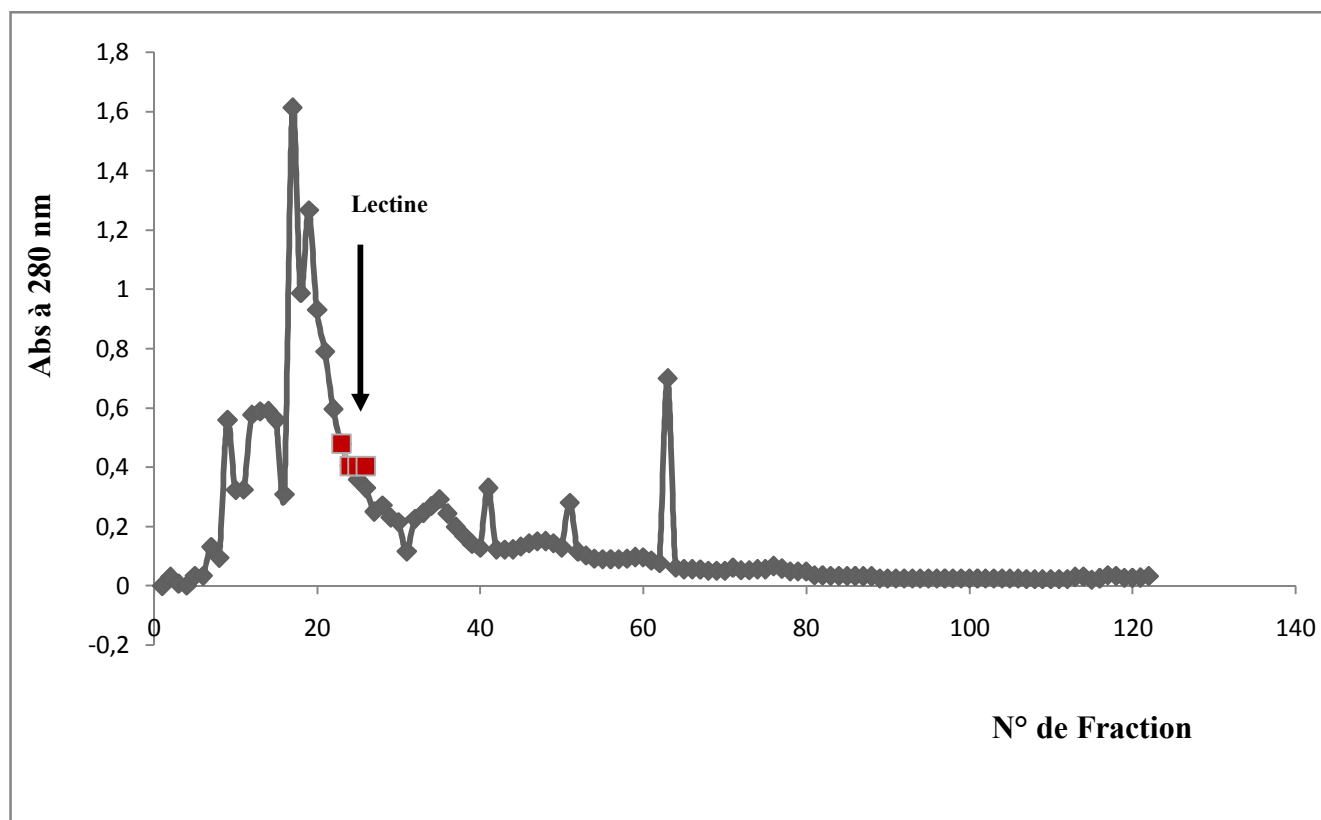


Figure 19 : Profil de chromatographie sur gel d'exclusion séphacryl S -200 HR de l'extrait brut des corpuscules d'*Eucalyptus globulus*

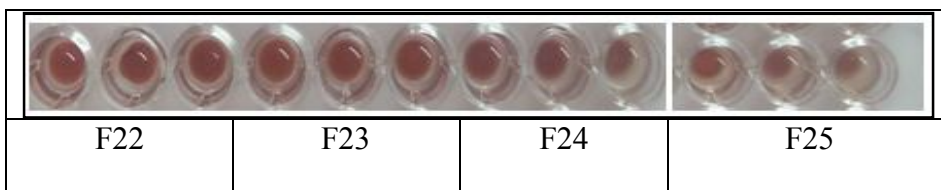
Le profil d'éluion de la figure 20, montre 6 pics protéiques mesurés à 280 nm :

- ✓ Un premier pic correspondant au volume mort élué aux fractions 8-16,
- ✓ Un 2^{ème} pic majeur élué aux fractions 18-21,
- ✓ Un 3^{ème} pic de concentration protéique moyenne élué aux fractions 26 – 36,
- ✓ Un 4^{ème} pic de faible concentration protéique élué aux fractions 39-42,
- ✓ Un 5^{ème} pic de faible concentration protéique élué aux fractions 58- 60
- ✓ Enfin un 6^{ème} pic de relativement élevé en concentration protéique élué aux fractions 62- 64

La lectine est éluée dans les fractions 22, 23, 24 et 25 après le volume mort et le pic majeur des protéines éluées dans les fractions 18 –21 (Fig.20).

Ce tracé montre quela lectine d'*E. globulus* a une masse moléculaire inférieure à 250 kDa car elle n'est exclue dans le volume mort.

5. Test d'agglutination des fractions partiellement purifiées



Les fractions 22, 23,24 et 25 ont montrés une activité agglutinante

	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
22												
23												
24												
25												
Témoin négatif												

Figure 20: Test d'agglutination des fractions purifiées 22, 23, 24,25.

Après la limite d'agglutination de 4 fractions purifiées, les 2 fractions 24 et 25 sont celles qui renferment le plus de lectine (Fig.20). Elles sont alors rassemblées (volume 4 ml) pour déterminer la teneur en protéines.

Les fractions partiellement purifiées 24, 25 ont une montré une forte activité agglutinante évaluée à 1/4096. Du point de vue moléculaire, la lectine de l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* contient une seule forme (Fig. 20) et une activité agglutinante de 4096 U.

Une étude de purification d'un extrait des feuilles d'une espèce végétale purifiée par chromatographie sur colonne de chitine, *Schinus terebinthifolius*, a révélé une similitude moléculaire semblable à celle de notre espèce mais avec une activité agglutinante d'entique à 4096 U (Gomes F.S. et al., 2012).

A partir de la courbe d'étalonnage des protéines (Fig.8, Chapitre Matériel et Méthodes), on peut quantifier la teneur en protéines d'*E. globulus* en trois états : Extrait brut (1/8), la fraction 50-70% précipité au sulfate d'ammonium et l'ensemble des 2 fractions purifiées par chromatographie d'exclusion S-200 HR.

Tableau16 : Teneur en protéines des corpuscules d'*E. globulus* à différentes fractions

Fraction	E.B (1/8)	F50-70%	F 24/25
Abs à 595nm	0,743	0,854	0,615
Concentrations µg/ml	18	20,70	14,90

Notre lectine est purifiée en une seule étape, à partir de 5 g d'une poudre de corpuscules des fruits d'*E. globulus* dans un volume de 30 ml de PBS (0,001 M) contenant 18 µg/ml de protéines.

Tableau17: Profil de purification de l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* par chromatographie sur gel d'exclusion séphacryl S-200 HR

	Quantité de protéines totales (mg)	Concentration de protéines (mg/ml)	Titre	Activité spécifique (AS)	Rendement de protéines (%)	Taux de purification
Extrait brut (1/8)	5,4 mg	$18 \cdot 10^{-3}$	512	$3,6 \cdot 10^{-3}$	100	1
Chromatographie d'exclusion Fraction 24/25	4,47 mg	$14,90 \cdot 10^{-3}$	4096	$3,3 \cdot 10^{-3}$	82,77	91,66

La lectine d'*E. globulus* est purifiée par chromatographie sur gel d'exclusion Séphacryl S-200 HR avec un rendement de 91,66 % et un taux de purification de 82,77. Le rendement paraît élevé car nous avons réalisé la purification en une seule étape. La pureté de la lectine reste à vérifier par SDS PAGE.

Une étude réalisée sur la lectine des feuilles de *Chrysophyllum cainitol* (Madayi D. et al., 2016), qui après une précipitation par le sulfate d'ammonium 20- 40% (avec 3,04%) donne un seul pic, après élution sur Sephadex G-75, avec un rendement de 0,547 %.

Une autre lectine a été isolée à partir des graines de *Chenopodium quinoa* (Pompeu D.G. et al., 2015) par un rendement 31,2 % avec Sephadex G50, 9,3 % par MonoQ (GE).

Pour notre lectine, d'autres étapes avant le gel filtration sont nécessaires (précipitation par le sulfate d'ammonium et une séparation par DEAE) pour confirmer sa pureté.

6. Activités biologiques

6.1. Dosage de l'activité antioxydante par le test DPPH

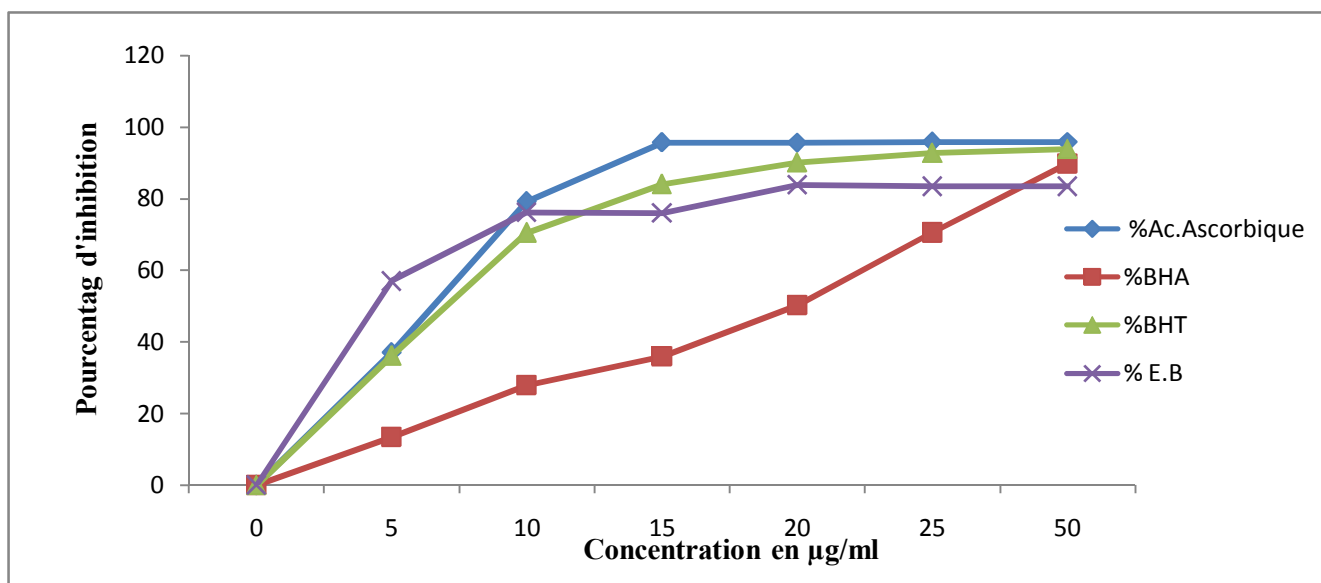


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH avec différentes concentrations des standards et de différentes concentration d'extrait brut de corpuscules d'*E. globulus*

Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50) par les standards et l'extrait brut de notre lectine. La détermination de l'IC50 permet de comparer la capacité antioxydante de notre lectine aux standards : acide ascorbique (vitamine C), BHA, BHT. Les pourcentages d'inhibition du radical libre (voir annexe 7 pour les calculs) par les différents standards et l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* des échantillons (à 5 µg/ml) sont évalués dans le tableau qui suit.

Tableau 18 : Valeurs des IC50 trouvées pour des antioxydants de références et l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus*

Echantillon	IC50 ± Ecart type (µg/ml)
Ac. Ascorbique	6,56 ± 1,15
BHA	29,3 ± 3,05
BHT	6,67 ± 0,59
E.B <i>E. globulus</i>	5,6 ± 1,31

Pour plus de détails sur les calculs, voir le tableau (Annexe 7).

Le test anti-oxydant par le DPPH donne les valeurs des IC₅₀ et montre que l'extrait brut a une IC₅₀ de 5,6± 1,31 µg/ml proche de celle de l'acide ascorbique 6,56 ±1,15 µg/ml et du BHT 6,67± 0,59 µg/ml. Cependant, la molécule de BHA avec une IC₅₀ de 29,3 ± 3,05µg/ml et semble avoir une capacité anti-oxydante faible par rapport à notre extrait et aux 02 standards.

Ce résultat indique que l'extrait brut des corpuscules d'*E. globulus* a un pouvoir antioxydant équivalent à celui de l'acide ascorbique et celui du BHT, résultat expliqué par la présence d'autres substances antioxydantes dans l'extrait brut d'*E.globulus* (polyphénols, vitamine E.....)

La comparaison de l'IC₅₀ de la lectine de l'extrait brut d'*E.globulus* par rapport à d'autres lectine est présenté dans le tableau 19.

Tableau 19 : Comparaison des IC₅₀ de diverses lectines

Espèce	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Extrait brut Eucalyptus globulus (notre étude)</i>	5,6
<i>Viscum album (Sadananda T. S. et al., 2014)</i>	92.4
<i>Phaseolus lunatus L. var. cascavel</i> (graines) (e Lacerdaa R. R. et al., 2016)	439

La lecture du tableau, montre clairement que la lectine, contenue dans l'extrait brut d'*E.globulus*, a un effet antioxydant largement supérieur aux autres lectines. Néanmoins, ce résultat reste à confirmer après un test antioxydant lorsque sur la lectine est purifiée.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

La recherche de molécules bioactives est toujours d'actualité pour éradiquer les pathologies persistantes comme le diabète, les infections, les cancers,

Parmi ces biomolécules, nous sommes intéressés à la recherche de phytolectine bioactive. Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires qui se lient spécifiquement à différents motifs de sucre en raison de leur hydrate de carbone du domaine de reconnaissance.

Le but de cette étude est la détection d'une lectine en quantité appréciable, une glycoprotéine à activité biologique.

Un screening a été réalisé sur les racines de 06 plantes médicinales (*Drimia maritima*, *Asphodelus cerasiferus*, *Rosmarinus officinalis* L., *Carlina gummifera*, *Quercus rotundifolia* Lamk, *Lupinus albus*), les graines de 03 plantes médicinales (*Trigonella foenum-graecum*, *Triticum durum*, *Lavandula angustifolia*) et les gousses de caroubier *Ceratonia siliqua* L., les fruits de la plante *Eucalyptus globulus* et un champignon *Amanita ovoidea* pour mettre en évidence la lectine recherchée.

Après séchage et extraction dans un tampon PBS (0.01M, pH 7.4, NaCl 0.9%) et une macération à froid pendant 24 heures, la détection et la quantification de lectine est réalisée par le test d'agglutination sur du sang de lapin (fixé dans le glutaraldéhyde à 1 %) et en double dilution dans des microplaques. Cette double dilution permet de déterminer la concentration limite pour l'activité de la lectine et qui sert à quantifier l'activité de la lectine.

La meilleure activité agglutinante est détectée dans les fruits de la plante *Eucalyptus globulus* évaluée à 512 HU soit une dilution de 1:9. Un test est réalisé sur les corpuscules et les graines du fruit d'*Eucalyptus globulus* montre les corpuscules renferment plus de lectine que les graines : 1: 9 vs 1: 5 respectivement.

L'extrait brut des corpuscules de la plante *Eucalyptus globulus* a subi une précipitation graduelle par le sulfate d'ammonium à froid, de sorte à purifier et à concentrer la lectine. L'analyse de l'activité agglutinante des fractions précipitées montre que la lectine est précipitée à une saturation maximale de 50-70% et 70-90 %. Cependant, la fraction 50-70 % contient plus de lectine que la fraction 70-90 %.

La lectine de l'extrait des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* montre une agglutination avec tous les groupes sanguins mais avec une forte sélectivité pour les érythrocytes du groupe **B**. Le test d'inhibition pour différents glucides de la série D+ (maltose, glucose, N-acétyl glucosamine, fructose, mannose, galactose, saccharose) et une glycoprotéine la fêtuine, montre une forte agglutination avec la fêtuine dont la concentration minimales inhibitrice est de 7,81 µg/ml. Ce résultat prouve que **la lectine d'*Eucalyptus globulus* est O- glycosylée.**

La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* est stable dans une gamme pH 7,4-10 pendant une heure.

Cependant l'activité agglutinante est optimale à **pH 8 et à pH 10, avec donc 02 isolectines à pH alcalin**. La lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* **O-glycoprotéine alcaline**. La température optimale de la lectine est de **70 °C** (après une incubation de 60 min).

La purification partielle par chromatographie d'exclusion moléculaire (**Sephacryl-S-200 HR**) de l'extrait brut donne un pic d'activité séparé après les 03 pics correspondant à d'autres protéines. Ce pic unique nous renseigne sur l'existence d'une seule forme moléculaire. La pureté de la lectine est à vérifier par SDS-PAGE.

Le test d'activité antioxydante par le DPPH, montre que la lectine des corpuscules d'*Eucalyptus globulus* a une concentration minimale à 50 % ou **IC₅₀ de 5,6 µg/ml**. La capacité de piégeage des radicaux de notre lectine est proche au standard, l'acide ascorbique (vitamine C)

Perspectives

Pour mener à bien la recherche sur cette lectine, plusieurs axes doivent être menés

1. Purifier la lectine par chromatographie d'affinité, HPLC et vérifier sa pureté par SDS- PAGE
2. Faire une spectrométrie de masse pour déterminer la masse moléculaire et la structure de la lectine, la séquence glucidique pour expliquer les propriétés biologiques de la lectine.
3. Etude des propriétés biologiques de la lectine *in vivo* et *in vitro*
 - Activité antioxydante
 - Activité anti-inflammatoire (anti-IIE, anti-I10, anti-I11β.....)
 - Activité immunologique (anti-interleukines TNF,.....)
 - Activité anticancéreuses sur des lignées cellulaires de plusieurs cancers.
 - Activité antidiabétique sur des rats
 - Activité anti-plaquétaire
 - Activité anti-microbienne (bactéries, champignons, virus)

***Références
bibliographiques***

- Adams D.J. (2004).** *Fungal cell wall chitinases and glucanases*. Microbiology. 150: 2029 -2035.
- Anantha Rajan R.,** Suganthi S., Sabitha A., Prakash Vincent G.(2006). Isolation and Partial Characterization of Lectin from *Turbo sp.* The Internet Journal of Genomics and Proteomics. Vol 3 (1).
- Alvarez-Manilla G.,** Warren N.L., Atwood J. , Orlando R., Dalton S., Pierce M. (2010). Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glyco-biomarkers using lectin affinity Chromatography of glycopeptides. J Proteome Res. 9:2062–2075
- Assreury A.M.S. (1997).** Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. Mediators of inflammation, 6: 201-210.
- Athamna A. et Ofek I. (1988).** Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of attachment and ingestion stages of bacterial phagocytosis. J. Clin. Microbiol. 26:476481.
- Bailly P.,** Chiaroni J. Roubinet F. (2015). Les groupes sanguins érythrocytaires, coordonné par. Edit. : John Libbey Eurotext, Paris.
- Bigendako M.J. (2004).** Identification et Zonage des Eucalyptus globulus au Rauanda, page 01, Chemonic International.Inc. projet ADAR, août 2004.
- Bird G.W.G. et** Wingham J. (1974). Haemagglutinins from salvia. Vox Sang, 25: 163-166
- Boyd W.C et** Regura R.M. (1949). Regura. Haemagglutinating substances in various plants. J. Immunol 62: 333-339.
- Boyd W.C. et** Sharpleigh E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). Science.119- 419.
- Boyd W.C et** Brown R, (1965). A specific agglutinin in the snail *Otala (Helix lacteal)*. Nature (London). 208: 593-594.
- Boland D.J.,** Brophy J.J., et A.P.N. House. (1991). *Eucalyptus* leaf Oeil, ISBN 0-9096-05-69-6
- Boleti, A.P.A.,** Freire, M.G.M., Coelho, M.B., Silva, W., Baldasso, P.A., Gomes, V.M., Marangoni, S., Novello, J.C. et al., (2007) .Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. J. Agric Food Chem 55:2653-2658.
- Bourne Y.,** Ayoub A., Rouge P.et Cambillau C. (1994). Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. J. Biol Chem 269, 9429–9435.
- Brock T.,** Madigan M., Martinko J. et Parker, J. (1994). Biology of Microorganisms, 7th ed.; Prentice-Hall International. Inc.; Englewood Cliffs. NJ.USA.
- Candy G. (1977).** Investigation into Chemical Composition and potentiel of selected number of Rhodesian eucalyptus Unpublished thesis. Univ of Rhodesia, Dept of pharmacy.
- Carlini C.R.,** Grossi-de-Sá M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon. 40:1515–1539

- Cazal P.**, Monis M., Caubel J, Brives J. (1968). Polyagglutinabilité-hereditaire dominante: antigène privé (Cad) correspondant à un anticorps public et à une lectine *Dolichos biflorus*. Rev. Fr. Transfus Immunohaemato. 11: 209-212.
- Chan Y. S., Xia L. et Ng T. B. (2015)**. A Glucosamine-Specific Lectin from Green Dragon No. 8 Beans (*Phaseolus vulgaris*). Induced Apoptosis on Nasopharyngeal Carcinoma Cells. Vol 2015: 1-7
- Cioci G.**, Mitchell E.P., Gautier C., Wimmerova M., Sudakevitz D., Perez S., Gilboa-Garber N., Imberty A. (2003). // FEBS Lett. V. 555 (2): 297-301.
- Coltri K.**, Casabona-Fortunato A.S., Gennari-Cardoso M.L., Pinzan C.F., Ruas L.P., Mariano V.S., et al.(2006). Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. Microbes Infect 8 (3):704-13.
- Coltri K.C.**, Oliveira L.L., Pinzan C.F., Vendruscolo P.E., Martinez R., Goldman M.H., Panunto-Castelo A., Roque- Barreira M.C. (2008). Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. Am. J. Pathol. 173 (2): 423- 432
- Congo M. (2012)**. Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- Correia M.T.S.** Oliveira M.D.L., Andrade C.A.S., Santos-Magalhães N.S., Coelho L.C.B.B., Teixeira J.A., Carneiro-da-Cunha M.G. (2008). Purification of a lectin from *Eugenia uniflora L.* seeds and its potential antibacterial activity. Journal compilation. The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology 46: 371-376
- Curtis A.**, Soutwell I.A. et Stiff I.A. (1990). Eucalyptus a new source of J. Essentials Oil, Res.2:105-110
- Danic B.**, Lefrère J.J.(2011). *La transfusion sanguine et le don de sang traité par le cinéma*. Hématologie 17(16):402-409
- Dhalla N.S.**, Temsah R.M. et Netticadan T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J.Hypertens.18 : 655-73.
- Danic B.**, Lefrère J.J. (2011). La transfusion sanguine et le don de sang traité par le cinéma. Hématologie 17(16):402- 409
- Down R.E.**, Gatehouse A.M.R., Hamilton W.D.O., Gatehouse J.A.(1996). Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials J. Insect Physiol. 42: 1035–1045
- Drickamer K. (1993)**. Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins.Curr. Opin. Struct. Biol. 3:393-400
- Dziarski, R.**, Rasenick, M.M. et Gupta, D. (2000). Bacterial peptidoglycan binds to tubulin. Biochim Biophys Acta. 1524 :17-26.
- e Lacerda R. R.**, E. S. do Nascimento, de Lacerda J. T. J. G., et al.(2016). Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus L.var. cascavel*) presents antioxidant, antitumor and gastroprotective activities. International Journal of Biological Macromolecules. 95 :1072–1081.
- Fang E.F.**, Lin P., Wong J.H., Tsao S.W., Ng T.B. (2010). A lectin with antiHIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. J Agric Food Chem. 58:2221- 2229.

Favier A. (2009). Les systèmes antioxydants .Ed. M.Guéna, pp 8-27.

Gabius H.J. et Gabius S. (2002). eds. *Glycosciences: Status & Perspectives*. Weinheim: Wiley VCH

García-Maldonado E., Cano-Sánchez P., Hernández-Santoyo A.(2017). Fish Shellfish Immunol.66:564-574.

Ghoneum M. et Gollapudi S. (2004). Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines in vitro. *Cancer Detection and Prevention* 28:17–26

Gianluca C. (2006). Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques .18.

Gilboa-Garber N., Katkoff D.J., Garber N.C. (2000). // FEMS Immunol. Med. Microbiol. V. 29: 53-57.

Gomes F.S., Procopio T.F., Napoleão T.H., Coelho L.C.B.B. et Paiva P.M.G. (2012). Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology* 114, 672-679

Goldstein I.J et Hayes C.E. (1978). The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biol.*, 35, 127–340

Goker H., Haznedaroglu I.C., Ercetin S. (2008). Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract *Ankaferr* blood steeper. *J.Int. Med. Res* 36 : 163-170.

Grahn E.M., Winter H.C., Tateno H., Goldstein I.J. et Krenzel U. (2009). Structural Characterization of a Lectin from the Mushroom *Marasmius oreades* in Complex with the Blood Group B Trisaccharide and Calcium ; *390(3): 457–466*.

Grishin A. V., Krivozubov M. S., Karyagina A. S., Gintsburg A. L. (2015). *Pseudomonas Aeruginosa Lectins As Targets for Novel Antibacterials*. ACTA NATURAE VOL. 7 № 2 (25) 2015.

Hammarstrom S., Murphy L.A., Goldstein I.J., and Etzler M.E. (1977). Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: Helix pomatia hemagglutinin, soy bean agglutinin, Lima bean lectin and *Dolichos biflorus* lectin. *Biochemistry*.16 (12): 2750-2755.

Hassan, M.A.A., Rouf R., Tiralongo, E., May, T.W. et Tiralongo, J.(2015). Mushroom lectins: Specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *Int. J. Mol. Sci*.16: 7802–7838.

Harvey D.J. (2008). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. An update for 2003–2004. *Mass Spectrom. Rev.* Published ahead of print.

He S., Simpson B.K., Ngadi M.O., Xue S.J., Shi J., Ma Y.(2015). pH stability study of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by guanidinium-HCl and thermal treatment. *Protein Pept Lett*. 22(1):45-51.

Hordé P. (2015). Rhésus – Définition, issu de Sante-Medecine.

Horejsi V., Kocourek J.(1978). Studies on lectins XXXVI properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels. *Biochim Biophys Acta*. 538: 299-315.

<http://biochimiedesproteines.spaceweb.usherbrooke.ca/3c.html> , BCM -514

- Irénée Modeste Bidima. (2016).** Cameroun: l'eucalyptus, trésor controversé des grassfields, Info Congo.org.
- Javadekar V.S.,** Sivaraman H., Sainkar S.R., Khan M.I. (2000). *A mannose-binding protein from the cell surface of flocculent Saccharomyces cerevisiae (NCIM 3528): its role in flocculation.* Yeast;16(2):99–110
- Julio G. Palharini 1, Aline C. Richter 1, Mariana F. Silva 1, Flavia B. Ferreira 1, et al.(2017).** Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties. Vol 7. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology
- Junqueira L.C.,** Carneiro, J. et Kelley R.O. (1995). *Basic Histology*, 8th ed.; Appleton and Lange: Connecticut, Norwalk, CT, USA,.
- Kennedy J. F.,** Paiva P. M. G., Correia M. T. S., Cavalcanti M. S. M., Coelho L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. Carbohydr. Polym., 26, 219-230.
- Kesbi A., 2011.** Thèse. Étude des propriétés physicochimique et évaluation l'activite biologique des huiles essentielles d'eucalyptus globulus dans la région de ouargla.p 18-19.
- Keyaerts E.,** Vijgen L., Pannecouque C., Van Dammed E., Peumans W., Egberink H., Balzarini J., Van Ranst M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. Antivir. Res. 75:179–187
- Khang N.Q.,** Jean Luc G., Hoebeke J. (1990). Blood group A specific Lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. Biochem Biophys Acta. 26: 1033(2): 210.
- Kiran Kumar K.,** Lalith Prakash Chandra K., Sumanthi J.1, Sridhar Reddy G. et Chandra Shekar P.(2012). Reddy BVR Biological role of lectins. A review Journal of Orofacial Sciences Vol. 4.
- KraJhanzal A.,** HoreJsi V., Kocourek J. (1978). Studies on lectins XLII isolation, partial characterization and comparison of lectins from the Roe of five fish species. Biochim Biophys Acta.532: 215-224.
- Kuku A.,** Eretan O. (2004). Purification and Partial Characterization of a Lectin from the Fresh Leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. J. Biochem. Mol. Biol. 37:229-233.
- Kuku A.,** Kayode A. F. et Akintola A. (2005). Purification and characterization of lectin from the seeds of *Psophocarpus palustris* .Pakistan Journal of Biological Sciences. 8(12):1667-1671.
- Kumaran A., Karunakaran R .J. (2007).** Antioxidant activity of Cassia auriculata flowers. 557 Fitoterapia.:78: 46 – 47.
- Lagarda-Diaz I.,** Guzman-Partida A.M., Urbano-Hernandez G., Ortega-Nieblas M.M., Robles-Burgueño M.R., Winzerling J., Vazquez-Moreno L. (2008). Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. J. Agric. Food Chem. 57: 689–694.
- Lam, S.K. et Ng T.B. (2011).** Lectins: Production and practical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 45-55.
- Lassak E.V. (1988).** The Australian Oil Industry? Past and Present, Chemistry in Australia. 55:396-406
- Lee J. Y., Kim J. Y., lee Y. G., Byeon S. E., Kim. B. H., Rhee M. H., Cho J. Y. (2007).** In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. Biological Pharmaceutical Bulletin.30(11): 2043-2051
- Lin P., Ye X., Ng T. (2008).** Purification of melibiose-binding lectins from two cultivars of Chinese black Soy beans. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 40:1029–1038

- Lis H.** and Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98 : 637-674.
- Liu B.**, Li C., Bian H., Min M., Chen L. et Bao J. (2009). Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of *Concanavalin A* on human melanoma A375 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 482.1-6
- Madayi D.**, Sreekala S, Mohan M., Deepthi V.C, Anusha T.S, Elyas K. K. (2016). Partial Purification and Characterization of a Galactose Specific Lectin from *Chrysophyllum cainito*, a Plant that Shows Hypoglycemic Activity. No. 48, 263-268
- Mathieu S.** Thèse (2011). Ingénierie de lectines d'invertébrés pour le développement de nouveaux outils de diagnostic en cancérologie, Université Grenoble Alpes. France.
- Matsumoto I.**, Osawa T. (1974). Specific purification of eel serum and *Cystisus sessilifolius* Anti H haemagglutinins by affinity chromatography and their binding to human erythrocytes. *Biochemistry.*13: 582-588
- Miège, J.** (2016). Lectines. *Encyclopædia Universalis France.* 390(3): 457-466
- Min W.**, Dunn A.J. et Jones D.H. (1992). Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *The EMBO Journal* vol. 11 (4): 1303 – 1307
- Mitchell E.**, Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M.,Gautier C., Perez S., Wu A.M., Gilboa-Garber N., Imberty A. (2002). *Nat. Struct. Biol.* Vol 9(12) : 918–921
- Mohan Babu R. R.**, Sajeena A., Seetharaman K., Reddy M.S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management-An over view. *Crop Prot.* 22: 1071-1086.
- Molyneux P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219
- Morgan W.T.J.** et Watkins W.M. (1953). The inhibition of haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Br J Exp Path.* 34: 94-103
- Müller W.E.**, Renneisen K., Kreuter M.H., Schröder H.C., Winkler I. (1988). The D-mannose-specific lectin from *Gerardia savaglia* blocks binding of human immunodeficiency virus type I to H9 cells and human lymphocytes in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1:453–458
- Murphy L.A.**, Goldstein I.J. (1977). Five alpha-D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol. Chem.* 252: 4739-4742.
- Nachbarm S.** et Oppenheim J.D. (1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33: 2238-2345.
- Ng T.B.**, Ngai P.H., Xia L. (2006). An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Mycologia.* 98:167–171.
- Nomura K.**, Ashida H., Uemura N., Kushibe S., Ozaki, T., et Yoshida M. (1998). Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry.*49:(3) 667-673

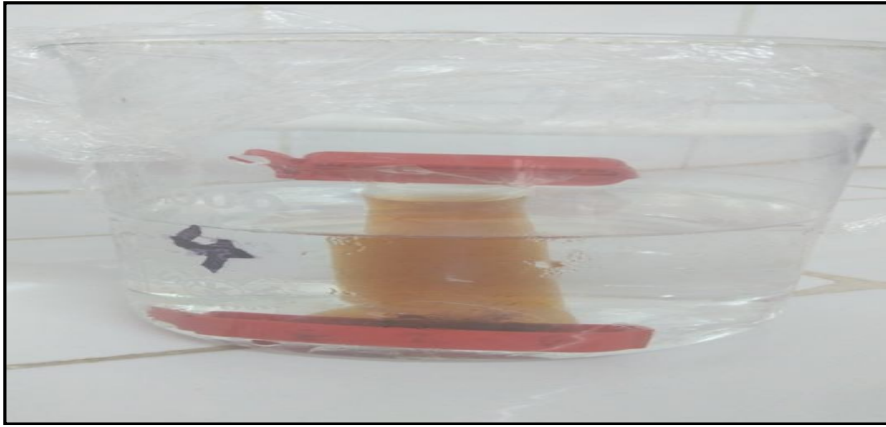
- Ohman L.**, Magnusson K. E., et Stendahl O. (1985). Mannose specific and hydrophobic interactions between *Escherichia coli* and polymorphonuclear leukocytes: influence of bacterial culture period. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 93:125-131.
- Oliveira C.F.R.**, Luz L.A., Paiva P.M.G., Coelho L.C.B.B., Marangoni S., Macedo M.L.R. (2011). Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochem.* 46: 498-504.
- Ozsoy N.**, Candoken E., Akev N. (2012). Purification and antioxidant activity of *aloe vera* leaf lectin. *J. Fac. Pharm. Istanbul.* 42(1): 1-11
- Pacha-Gupta R.**, Sundarrajan P., DeSouza F., Nagrath K., Tauro L., Krishnakumar P., Srivastava R., Sinha T. (2016). Isolation and partial characterization of lectins from Indian varieties of leguminous plants. *International Journal of Advanced Research.* Vo 4, Issue 5, 1827-1834
- Petnual P.**, Sangvanich P., et Karnchanat A. (2010). A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa L.*) and its antifungal, antibacterial, and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Sci Biotechnol.* 19: 907- 916.
- Pramanik T.** et Pramanik S. (2000). Distribution of ABO and Rh blood groups in Nepalese medical students: a report. *East Mediterr Health J.* 6(1):156-8
- Pervin M.**, Koyama Y., Isemura M. et Nakamura Y. (2015). Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. *Int. J. Plant Biol. Res.* 3:1030-1035.
- Peumans W.J.** et Van Damme E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109 (2):347- 352
- Pompeu D. G.**, Mattioli M. A., R. I. M. I de A. R. I. M. I de A. Ribeiro, D. B. Gonçalves, Teixeira Magalhães J., Marangoni S., da Silva J. A. Granjeiro, P. A. (2015). Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium Quinoa* seeds. *Food Sci. Technol, Campinas,* 35(4): 696-703.
- Popovici C.**, Saykova I., Tyllkowski B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.N°4 (2009)
- Prokop O.**, Rackwitz A., Schlerssinger D. (1905). a 'new' human blood group receptor Ahet tested with saline extracts from *Helix hortensis* (garden snail). *J Forens Med.* 12: 108-110.
- Rabelo L.**, Monteiro N., Serquiz R., Santos P., Oliveira R., Oliveira A., et al. (2011). A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinnacanthina* (Cin n (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. *Marine Drugs.* 10: 727-743
- Rama Devi P.**, Kombiah P., Sudhakar G.R. Lernal., et Babu C. (2014). Purification and characterization of a novel lectin from *geotrupes stercorarius*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research.* Vol5, Issue 2 p157-162
- Rao K.V.**, Rathore K.S., Hodges, T.K. Fu X., Stoger E., Sudhakar D., Williams S., Christou P., Bharathi M., Bown D.P., et al. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* 15: 469 - 477
- Raz A.** et Lotan R. (1987). Endogenous galactoside-binding lectins: A new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 433-452.

- Reid M.E.**, Lomas-Francis C. et Olsson M.L. (2012). Blood group antigen Facts Book, 3rd ed. Academic Press, Waltham, MA.
- Renkonen K.O.** (1948). Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 26 : 66-72
- Richard H. T.** (1998). Application of lectin histochemistry and cytochemistry in diagnostic and prognosis. *Methods molecular medicine* .9 : 73-94.
- Rice-Evans C.A.**, Miller N.J., Bolwell P.G., et al. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res* 22: 375–83
- Rogers D.J.**, Blunden G., Evans P.R.(1977). Anti-B lectin from *Ptilota plumose*. *Med Lab Sci.*34: 193-200
- Sabóia Aragão K.**, Thèse. (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum* Univ.J.F., Genoble, 125p.
- Sadananda T. S.**, GovindappaM. et Ramachandra Y. L. (2014). In vitro Antioxidant Activity of Lectin from Different Endophytic Fungi of *Viscum album L.* *British Journal of Pharmaceutical Research.* Vol (5): 626-643.
- Santos A. F. S.**, da Silva M. D. C., Napoleão T. H., Paiva P. M. G., Correia M. T. S. et Coelho L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. Vol.15: 42 - 62
- Sharma A.**, Ng T. B., Wong J. H. & Lin P. (2009). Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). *Journal of Biomedicine & Biotechnology.* 9
- Sauvion N.** Thèse. (2004). Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). Potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons.
- Schaller W.D.**, Rice R.J., Biddle J.W., Jean Louis Y. et Larsen S.A. (2012). Whitting How to cite this article: Kumar KK, Lalith Prakash CK, Sumanthi J, Reddy GS, Shekar PC, Reddy B. Biological role of lectins. A review. *J. Orofac .Sci.* 4:20-25.
- Selitrennikoff C.P.** (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2883-2894.
- Sharon N.** (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* 34: 213-298.
- Sharon N.** et Lis H. (1989). Lectins. Cambridge, U.K.: University Press
- Sharon N. et Lis H.** (2003). Lectins. Kluwer Academic Pub
- Sharon N.** (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry.* 282 (5): 2753-2764.
- Sharon N.** (2008). Lectins: Past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 36:1457-1460.
- Singh R.S.**, Bhari R., Kaur H.P. (2010). Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 99–126.
- Singh A. P.** et Saxsena K D.(2013). Biological Activity of Purified *Momardica Charantia* Lectin. *Chem. Sci. Tran.* 2(1):258-262.
- Souza M. A.**, Carvalho F. C., Ruas I. P., Azevedo R. R., Roquebarreira M. C. (2013). The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties . *Glycoconj. J.* 30 : 641-657.

- Stojanovic M.M.,** Zivkovic I.P., Petrusic V.Z., Kosec, D.J., Dimitrijevic R.D., Jankov R.M., Dimitrijevic L.A., Gavrovic- Jankulovic M.D. (2009). In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* 10(1): 120–129
- Sumner J.B.** et Howell S.F. (1936). The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32: 227-37
- Swanson M.D.,** Winter H.C., Goldstein I.J. et Markovitz D.M. (2010). A lectin isolated from bananas is a inhibitor of HIV replication. *J. Biol. Chem.* 285: 8645-8655
- Teixeira C.R.,** Cavassani K.A., Gomes R.B., Teixeira M.J., Roque-Barreira M.C., Cavada B.S., da Silva J.S., Barral A., Barral-Netto M. (2006). Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine.* 24(15): 3001-3008
- Trindade M.B.,** Lopes, J.L., Soares-Costa, A., Monteiro- Moreira, A.C., Moreira, R.A., Oliva, M.L. et Beltramini, L.M. (2006). Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764: 146-152
- Uhlenbruck G.** et Dahr W. (1971). Studies on seeds with a broad agglutination spectrum XII N acetylgalactosamine specific lectins from the seeds of *Soja hispida*, *Bauhinia purpurae*, *iberus amara*, *Molucella laevis* and *Vicia graminae*. *Vox. Sang.* 21: 338-351
- Valadez-Vega C.,** Guzmán-Partida A. M., Javier Soto-Cordova F., Álvarez-Manilla G. et al. (2011). Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules.* 16: 2561-2582
- Vandenborre G.,** van Damme E.J.M., Ghesquière B., Menschaert G., Hamshou, M. Rao R.N., Gevaert K., Smagghe G. (2010). *Glycosylation signatures in Drosophila: Fishing with lectins.* *J. Proteome Res.* 9: 3235-3242.
- Vandenborre, G.** Smagghe G., Ghesquière B., Menschaert G., Rao R.N., Gevaert K., van Damme E.J.M. (2011). Diversity in protein glycosylation among insect species. *Glycosylation Differences in Insect Species* Vol.6 (2): e16682
- Vemuri P. K.,** Talluri B., Sharma A., Akkala G., Bodiga V. L. (2015). Isolation and Characterization of a Lactose-Binding Lectin from *Ocimum sanctum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* Vol. 5 (10): 113-117
- Watkins W.M.,** Morgan W.T.J. (1952). Neutrilization of anti-H agglutinin in eel's serum by simple sugars. *Nature.* 169: 825-826.
- Xia L.,** Ng T.B. (2006). A hemagglutinin with mitogenic activity from dark red kidney beans. *J. Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 844: 213-216.
- Zubcevic N.,** Damir S., Focakl M., Rukavina D. (2016). Effects of plant lectins on human erythrocyte Agglutination. *Ser J Exp Clin Res.* 17 (3): 207-213

Annexes

Annexe 03 : Dialyse de la lectine après précipitation



Annexe 04 : Tampons pour effet de pH sur les lectines

1. Tampon Glycine NaOH; zone tampon pH **2,2 à 3,6** convient à pH 2 et pH 3
 - (a) 0.1 M Glycine: 7.5 g/l (M.W.: 75.0)
 - (b) 0.1 M acide Hydrochloride
2. Tampon Phosphate du soduim ; zone tampon pH **5,8 à 8** convient à pH 6 et 8
 - (a) 0.1 M Sodium du phosphate monobasique ; 13.8 g/l (monohydrate, M.W.: 138.0)
 - (b) 0.1 M Sodium phosphate dibasique; 26.8 g/l (héptahydrate, M.M.: 268.0)
3. Tampon Carbonate-bicarbonate; zone tampon pH **9,2 à pH 10,6** convient à pH 9 et 11
 - (a) 0.1 M Carbonate du Sodium (anhydrous), 10.6 g/l (M.M.: 106.0)
 - (b) 0.1 M Bicarbonate du Sodium, 8.4 g/l (M.M.: 84.0)

Annexe 05 : Collecteur des fractions des corpuscules d'*E. globulus* après élution sur Sephacryl S-200 HR



Annexe 06 : Concentrations de BSA, le standard, pour le dosage des protéines

1. Gamme d'étalonnage des protéines

[BSA].10 ⁻⁴ mg/ml	4,87	7,31	9,75	12,19	14,63	17,07	19,51	21,95	24,39
Abs à 595nm	0,129	0,272	0,334	0,389	0,451	0,542	0,634	0,74	0,838

2. Préparation du réactif de Bradford :

100 mg de bleu de coomassie G250 solubilisé à 50 ml d'éthanol 95% avec 100 ml d'acide phosphorique 85% puis complété par l'eau distillée à 1 litre. Filtrer la solution par papier filtre 2 fois.

3. Calcule du rendement de protéines et de taux de purification

$$\text{Rendement de protéines} = \frac{\text{Teneur totale en protéines de la fraction purifiée} \times 100}{\text{Teneur totale en protéines de l'extrait brut}}$$

$$\text{Taux de purification} = \frac{\text{Activité spécifique de la fraction purifiée} \times 100}{\text{Activité spécifique de l'extrait brut}}$$

Annexe 07 : Dosage de l'activité antioxydante par le test DPPH

Tableau : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations pour chaque échantillon

Echantillon Conc. µg/ml	Ac.Ascorbique	BHA	BHT	E.B
5	37,06 ± 3,60	13,39 ± 2,17	36,18 ± 0,81	56,92 ± 3,39
10	79,21 ± 7,65	27,81 ± 2,29	70,53 ± 0,37	76,19 ± 1,42
15	95,67 ± 0,18	35,99 ± 8,72	84,11 ± 1,74	75,91 ± 2,22
20	95,55 ± 0,28	50,20 ± 9,57	90,11 ± 0,54	83,81 ± 0,63
25	95,79 ± 0,33	70,51 ± 21,17	92,78 ± 0,35	83,38 ± 1,86
50	95,77 ± 0,54	89,71 ± 8,58	93,87 ± 1,46	83,37 ± 1,87