

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

Université A. MIRA de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biochimie Appliquée

Effets de différents traitements sur l'activité hémagglutinante des lectines de légumineuses(lentille,fève,feverole)

Présenté

M^{elle} Achiou Sarah

Membre de jury

Président : M^r OUCHEMOUKH S.

Promoteur : M^r Zaidi F.

Co-promotrice: M^{elle} Boudjou S .

Examineur 1: M^{me} Hassissène N.

Examinatrice 2: M^{me} Amrouche

Année : 2012/2013.

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

Université A. MIRA de Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du diplôme Master II

Option : Biochimie Appliqué

Effets de différents traitements sur l'activité hémagglutinante des lectines de légumineuses(lentille,fève,feverole)

Présenté

M^{elle} Achiou Sarah

Membre de jury

Président : M^r OUCHEMOUKH S.

Promoteur : M^r Zaidi F.

Co-promotrice: M^{elle} Boudjou S .

Examineur 1: M^{me} Hassissène N.

Examinatrice 2: M^{me} Amrouche

Année : 2012/2013.

Remerciements

En premier lieu , nous remercions Dieu le tout puissant pour son aide et de nous avoir donné la volonté, courage et patience.

Mes remerciements s'adressent directement à mon promoteur Mr Zaidi d'avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour son aide, sa disponibilité et son suivi, ainsi ma co-promotrice Mlle Boudjou S qui à été présente durant tout ce parcours pour réaliser ce modeste travail et d'avoir partagé avec moi son expérience.

Je tiens à remercier Mr Ouchemoukh d'avoir accepté de présider et d'honorer ma soutenance par sa présence.

Mes remerciement s'adresse Mme Hassissène d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.

Mes remerciement se dirigent aussi à Mme Amrouche qui à accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.

Mes remerciement s'adressent également à Mr zaidi le chef de service de centre de transfusion sanguin de m'avoir aider à réaliser ce modeste travaille, sans oublié Dr Agsous qui m'a soutenu moralement et partagé avec moi son expérience.

Mes remerciements s'adressent a tous les gens qui m'ont aidé de pris ou de loin pour la réalisation de ce travail parmi eux je citerai doctorante du laboratoire de nutrition



Dédicace

Ce modeste travail

Est dédié à toutes les personnes que j'aime :

À mes très chers parents, qui se sont sacrifiés pour

M'offrir un climat idéal de travail et qui n'ont jamais cessé de

Me témoigner leur affection et de m'apporter leur soutien

Depuis toujours, je leur serai toujours reconnaissante pour leurs encouragements et leurs investissements, consentis dans un seul but : ma réussite.

Ma très chère grande mère qui est digne

De ma gratitude et de mon estime.

À mes frères : Lotfi , yanis

À mes très chères sœurs : Rima, maya .

À ma meilleure amie :karima

Et sans oublier ma belle famille .

Un grand merci pour mon amour Brahim de m'avoir soutenue durant tout mon cursus universitaire et pour réalisé ce modeste travail.

Ainsi que toute la promotion de Biochimie Appliquée.

Liste des abréviations

A : Nombre de dilution de tube ayant une absorbance proche à E50

Ea : Absorbance de tube A

Eb : Absorbance de tube B (ayant une absorbance plus que E50)

E50 : Moitié de l'absorbance du control

ABS : Absorbance

BSA : Buffer solution albumine

CON A : Concanavaline A

GALNAC : Gluconeuramique acid

KDA : Kilo dalton

Nm : Nanomètre

TP : Tampon phosphate

Ug : microgram

FAO : Food et Agriculture .Org.

WL : whole lens culinaris

CL: Cotyledon lens culinaris

HL: Hool lens culinaris

WF: Whole faba been major

HF: Hool faba been major

WFR: Whole faba bean minor

CFR: Cotylédon faba bean minor

HFR: Hool faba bean minor

Elisa: Enzyme linked imunoabsorbent assay

Liste des figures

Figure 1 : la structure de quelque lectines de plante.....	2
Figure 2 : les classes de lectines selon le nombre de chaine polypeptidique.....	4
Figure 3 : Représentation graphique de quelque structure de lectine.....	6
Figure 4 : Quelque structure chimique de sucre simple de la membrane cellulaire et de lectine végétales.....	8
Figure 5 : Mécanisme d'action des lectines.....	9
Figure 6 : Représentation schématique d'interaction lectines –glucides.....	10
Figure 7 : protocole d'extraction des lectines.....	14
Figure 8 : Méthode de purification avec sulfate d'ammonium.....	14
Figure 9 : protocole de dosage des protéines.....	15
Figure 10 : protocole de dosage des sucres.....	16
Figure 11 : méthode de préparation des hématies.....	16
Figure 12 : Test d'héماغglutination sur microplaque.....	17
Figure 13 : préparation des suspensions sanguines.....	20
Figure 14 : grilles des tests visuelles.....	22
Figure 15 : Teneurs en protéine des extraits bruts et purifié.....	26
Figure 16 : teneur en glucide des extraits bruts et purifié.....	27
Figure 17 : Effet du traitement des hématies par la trypsine et papaine.....	27
Figure 18 : effet du traitement des extraits bruts et purifiés T°	29
Figure 19 : effet du traitement des extraits bruts et purifié avec pH.....	30
Figure 20 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhiber l'AH de lentille.....	31
Figure 21 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhiber AH de fève.....	33
Figure 22 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhibé l'AH féverole.....	34
Figure 23 : Activité héماغglutinante des extraits bruts et purifié par la methose spectrale.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : classification des lectines selon le nombre de domaine de liaison aux glucides.....	5
Tableau II : Exemples de propriétés biologiques de lectines et des applications qui en résultent.....	9
Tableau III : les lectines spécifiques aux groupes sanguins les plus connus.....	10
Tableau IV : Représentation schématique d'interaction lectines-glucides.....	11
Tableau V : Lectines utilisé pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie.....	12
Tableau VI : Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectines.....	13
Tableau VII : les resultats d'agglutination des neufs extraits bruts et purifiés.....	23
Tableau VIII : les titres de différents extraits bruts et purifié.....	25

Sommaire

Sommaire

Chapitre I :généralité sur les lectines

I-les lectines.....	1
I-1- Historique.....	1
I-2- Origine terminologique.....	1
I-2-1- Définition.....	1
I-2-1-1- la structure des lectines.....	1
I-3-Comparaison des anticorps anti-sucres et des lectines.....	2
I-4- Description de quelque lectines connues.....	3
I-4-1-viscine et conviscine.....	3

Chapitre II :Classification des lectines

II-1- la classification de lectine de plante.....	4
II-1-1-Le nombre de chaine polypeptidique.....	4
II-1-1-1- Mérolectine.....	4
II-1-1-2-Hololectine.....	4
II-1-1-3-Chimérolectines.....	4
II-2-la topologie.....	5
II-2-1-les lectines simples.....	5
II-2-2- les lectine en mosaïque.....	6
II-2-3-Les assemblages macromoléculaires.....	6

Chapitre III : Spécificité et affinité des lectines

III-1-la spécificité et affinité via à vis les glucides.....	7
III-1-1-les lectines qui reconnaissent les monosaccharides.....	7
III-1-2- les lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifique.....	7
III-2- Les propriétés des lectines.....	8
III-3- Les groupes sanguins et les lectines.....	10
III-4-Interaction lectine-glucide.....	10

Chapitre IV :proprété et intérêt des lectines

IV-Intérêt des lectines pour l'homme.....	10
IV-Propriétés et application des lectines.....	10

Chapitre V : Matériel et Méthodes

V-1-Matériel.....	13
V-1-1-Matériel végétal.....	13
V-1-2-Matériel sanguin.....	13
V-2-Méthode.....	13
V-2-1- Extraction des lectines.....	13
V-2-2-Purification des lectines par le sulfate d'ammonium.....	14
V-3- les dosages.....	15
V-3-1- Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés.....	15
V-3-2-Dosage des sucres des extraits bruts et purifiés.....	15
V-4- Test d'agglutination.....	15
V-4-1-Préparation des hématies.....	16
V-4-2- Test d'agglutination visuel.....	16
V-4-3- Détermination des titres des différents extraits bruts et purifiés.....	17
V-5- Traitement des hématies avec la papaïne et la trypsine.....	17
V-6- Effet de différent traitement sur l'activité hémagglutinante.....	18
V-6-1- Effet de la température.....	18
V-6-2-Effet de Ph.....	18
V-7- Test d'inhibition par les sucres.....	18
V-7-1- Principe.....	18
V-7-2- Technique.....	18
V-8- Méthode spectrale.....	19
V-8-1- Préparation de la suspension des hématies.....	19
V-8-2-Détermination de l'activité hémagglutinante.....	20
V-8-3-Calcul de l'activité hémagglutinante.....	20

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI-Résultats et discussion.....	21
VI-1-Résultats.....	21
VI-1-1- Activité hémagglutinante des lectines.....	21
VI-1-2-Détermination des titres.....	24
VI-1-3-Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés.....	26
VI-1-4-Teneur en glucide des extraits bruts et purifiés.....	27
VI-1-5- Effet du traitement des hématies avec la trypsine et papaine.....	28
VI-1-6- Effet de la température sur l'activité hémagglutinante.....	29
VI-1-7-Effet du pH sur l'activité hémagglutinante.....	30
VI-1-8- test d'inhibition par les sucres.....	32
VI-1-9-Mesure de l'activité hemagglutinante par la méthode spectrale.....	36
VI-2-Discussion générale.....	37
Conclusion et perspectives.....	41
Annexes	
Références bibliographiques	

Introduction

Introduction

Les lectines sont des protéines d'origine animale ou végétale, capables de se fixer de façon spécifique et réversible aux résidus osidiques des membranes cellulaires sans pour autant exercer une activité enzymatique (**Bruneton, 1993**).

Notons que la toute première description des lectines fut faite en 1888 par Stillmark dans un rapport soumis à l'université de Dorpat en Estonie. En effet, il mit en évidence l'activité agglutinante de la lectine du *Ricinus communis* sur des hématies humaines (**Sharon, 1972**). A partir de ce moment, de nombreux travaux furent consacrés aux lectines. Ainsi, en 1919, James mit au point la purification des lectines à partir de la concavaline A ; facilitent ainsi leur usage dans le domaine de la recherche. Ce n'est qu'en 1945 que Boyd et Reguera parvinrent à déterminer la spécificité des lectines à pouvoir agglutiner les globules rouges sanguins. (**Sharon, 1972**).

Les lectines des plantes sont des protéines possédant au moins un domaine non catalytique de liaison réversible à des mono-ou oligosaccharides spécifiques. Elles peuvent se classer en trois groupes selon le nombre de domaines liaison aux sucres et la présence ou non d'une activité catalytique spécifique (**Abovie .com2004**)

La plupart des lectines des végétaux supérieurs sont localisés dans la graine : elles se forment au cours de la maturation et disparaissent au cours de la germination. Elles sont surtout fréquentes chez les FABACEAE (arachide, soja, lentille, canavalia, haricot etc.). (**Bruneton ,1993**). La famille des Légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales (**Makela .1954**) . cette étude traite les différents traitement sur l'activité hémagglutinante des lectines de trois légumineuse locale(*lens culinaris ,vicia faba minor et major*).

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'évaluation de l'activité hémagglutinante des différents extraits(bruts et purifiés) avec identification des score d'agglutination, puis aux différents traitements (température,pH,trypsine et papaïne) et les différent test d'inhibition utilisé avec les différents sucres.

Chapitres I :Généralité sur les lectines

I-Les lectines

I-1- Historique

A l'origine, le terme lectine dérivé du mot latin *legere* (qui veut dire « sélectionner »), faisait référence à la propriété de certaines protéines d'agglutiner sélectivement les hématies humaines (**Boyd et Shapleigh 1954**).

Les lectines ont été découvertes pour la première fois par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui rapporte que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon and Lis 2004**) depuis lors, beaucoup de travaux furent consacrés aux lectines (**Roken, 1948**).

En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines à agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and Shapleigh 1954**). Les lectines deviennent alors des outils scientifiques pour l'investigation des sites de fixations spécifiques et un modèle pour l'étude des réactions d'agglutinations (**Gold et Balding, 1975**). Elles permettent les études structurales des polymères de carbohydrates et mucopolysaccharides et des réactifs spécifiques pour l'isolement de ces substances.

I-2-Définition

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon 1998**). Ce sont des molécules ubiquitaires, qui se retrouvent dans toutes les classes d'organismes : chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués.

I-3- Structure des lectines

Il existe une grande variété de lectines avec une très grande diversité structurale. La première structure cristalline d'une lectine à être déterminée par diffraction des rayons X fut la concanaviline A (**Edelman 1972; Hardman 1972**).

Les lectines de plante qui appartiennent à une même famille taxonomique (légumineuses, céréales, etc.) montrent une homologie de séquence/structure remarquable (**Van Damme 1998**). Les lectines de légumineuses adoptent toutes une structure typique appelée « β jelly roll » ou « lectin fold » formée par deux feuillets β superposés. Les lectines de céréales sont très différentes et sont caractérisées par la présence de domaines structuraux très riches en cystéine qui sont appelés domaine hévéine (du nom d'une petite protéine de 43 acides aminés extraite de l'hévéa). La première structure cristallographique déterminée dans cette famille est la lectine de germe de grain de blé WG (Fig 3-a), spécifique pour les oligosaccharides à NeuAc ou à GlcNAc (**Wright 1980**). La ricine, ainsi qu'un grand nombre de toxines végétales, est constituée d'une lectine en trèfle (ricine B) associée à une toxine (ricine A), (Fig 3-b) (**Rutenber 1991**). La famille de la lectine de perce neige (**Hester, Kaku et al. 1995**) ainsi que la famille de la jacaline (Fig 3-c) (**Sankaranarayanan 1996**) adoptent toutes

deux des repliements protéiques de **type prisme β** qui peuvent former une grande variété d'oligomères (Gallego del Sol et al., 2005).

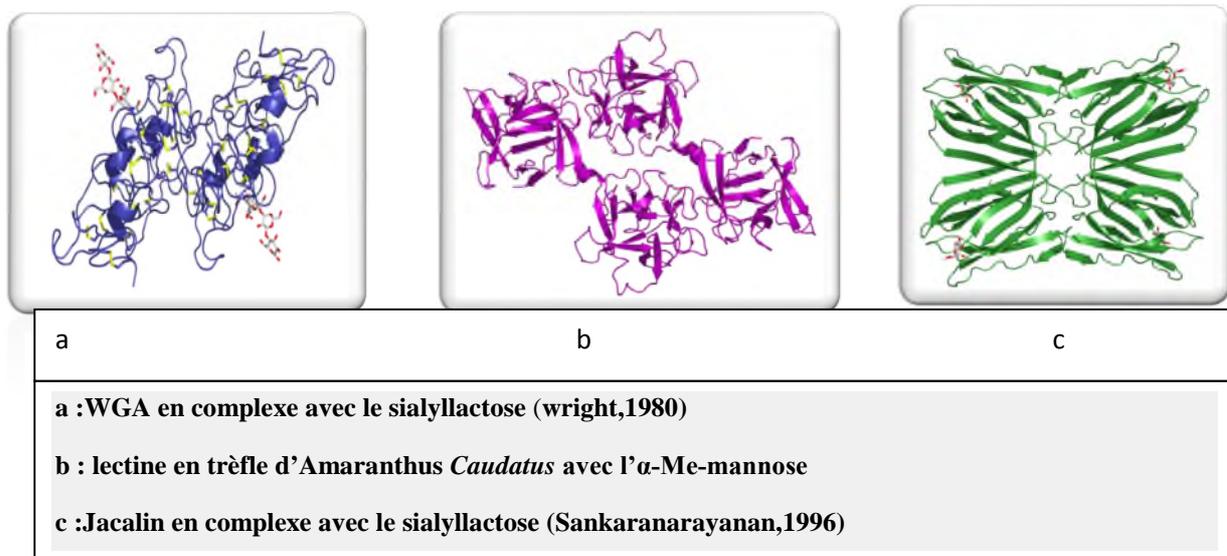


Figure 1 : La structure de quelques lectines de plante

I -4-Comparaison des anticorps anti-sucre et des lectines

Les lectines et anticorps sont des protéines (ou glycoprotéines) possédant plusieurs sites d'association réversible sur leur molécule, qui en font des réactifs de réticulation réversible. Donc avec les deux familles de molécule, on observe l'association avec des mono- et oligosaccharides, la précipitation des macromolécules polysaccharidiques et glycoprotéines avec dissolution des précipités en présence d'un excès de polysaccharides, et enfin l'agglutination de cellules. Précipitation et agglutination sont une conséquence de la multivalence des deux réactifs opposés et sont inhibées en présence du ligand mono- ou oligosaccharidique spécifique. Les immunoglobulines sont construites sur un modèle uniforme ou par association de molécules bâties selon ce même modèle, tandis qu'il semble qu'il y ait une grande variété de structure dans les lectines. Dans le modèle de base des immunoglobulines, les deux sites de reconnaissance sont solidaires de deux demi-molécules identiques liées entre elles par des ponts disulfures. En revanche, la lectine est une association de sous-unités qui peuvent comporter ou ne pas comporter de site de reconnaissance et sont liées de façon non covalente. (Serge David ,1995)

I-5- Description de quelques lectines connues :

L'abrine et la ricine :

Sont des lectines à activité hémagglutinante extraites respectivement de l'arbre à chapelet et du ricine, reconnues pour leur toxicité. Elles sont constituées de deux fragments protéiques :

- **une chaîne A** : incapable de franchir les membranes cellulaires, inhibiteur de la synthèse des protéines ;

- **une chaîne B** : non cytotoxique, assurant la reconnaissance des sucres membranaires et la fixation de la lectine sur le récepteur pour faciliter la translocation de l'unité A à travers la membrane **(Bruneton, 1987)**.

La phasine phytoagglutinine provenant du haricot et spécifique aux hématies du groupe A est constituée de deux dimères canoniques rattachés par des liaisons bêta **(Hamelryck, 1996)**.

Viscine et convicine :

Sont des glycosides constitués d'une molécule de glucose liée à un radicale diviscine (pour la viscine) et iso-uramyl (pour la convicine). Leur présence dans les aliments se traduit surtout chez les pondeuses par une réduction de poids moyen de l'œuf et une baisse de l'intensité de ponte **(Muduli et al 1981)**, Cette activité est limitée par la présence de la vitamine E et A. ou de chélateurs de fer. **(Muduli et al 1982)**

Chapitres II : Classification des lectines

II-La classification des lectines de plantes

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

II-1-Le nombre de chaîne polypeptidique :

Trois classes (figure2) sont distinguées :

a-Mérolectines : Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides

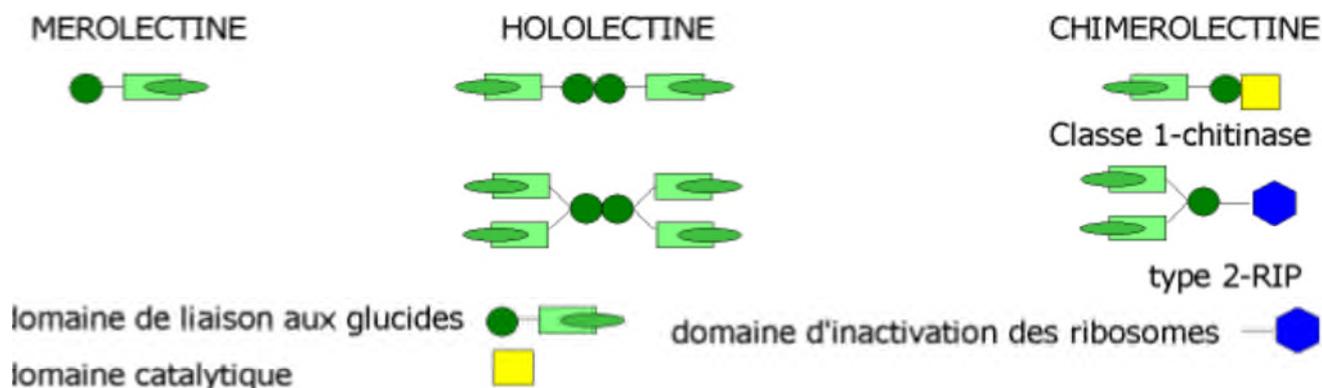
Elles sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules. **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

b-Les hololectines : elles contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi identiques, ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules. La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines. **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

c-Les chiméroléctines : Les chiméroléctines possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chiméroléctines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip Ribosome Inactivating Protéine :Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine). **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

Tableau I: Classification des lectines selon le nombre de domaine de liaison aux glucides **Van Damme et al.,(1998).**

Classe de lectines	caractéristiques
Mérolectines	Ce sont des protéines ayant un domaine de liaison aux glucides simples. Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.
Hololectines	Comportant toutes les lectines ayant des emplacements de liaison aux glucides di ou polyvalent.
Chimerolectines	Ce sont des protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimerolectines se conduisent comme des mérolectines ou comme des hololectines.
Superlectines	C'est une classe qui possède également au moins deux domaines de liaison aux glucides, mais différent des hololectines par le fait que leurs emplacements peuvent reconnaître des sucres structurellement indépendants.



D'après PEUMANS W.J. et V. DAMME J.M., 1995.

-Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109, pp 347-352.

Figure 2 : Les classes de lectines selon le nombre de chaîne polypeptidiques

II-2-La topologie :

Selon la base de leurs structure, les lectines se subdivisent en 3 classes (figure 3)

II-2-1- Les lectines simples :

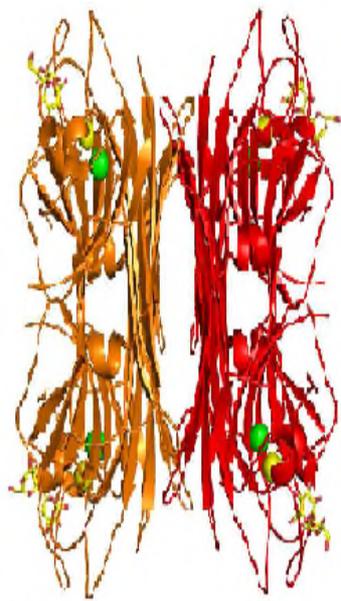
Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (figure 3-a) qui ne sont pas forcément identiques, et dont la masse moléculaire généralement n'excède pas en général 40 kDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines, une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose.

II-2-2-- Les lectines en mosaïque :

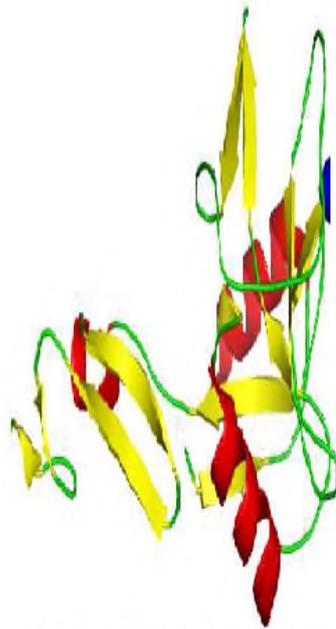
Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (figure 3-b).

II-2-3- Les assemblages macromoléculaires :

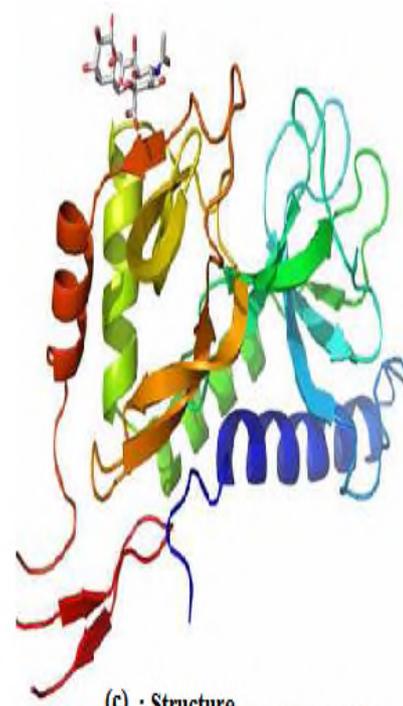
Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, appelées fimbriae ou pili (figure 3-c). La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité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



(a) Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine



(b) : Structure de la E-selectine humaine



(c) : Structure Lectine du microne me chez *Toxoplasma gondii*

Figure N°3 : Représentation graphique de quelques structures de lectines (Aragao ,2008)

Chapitre III :Spécificité et affinité des lectines

III- Spécificité et affinité des lectines

III- 1-spécificité et affinité vis-à-vis les glucides

Il est intéressant de noter que la plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres , Dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. Deux classes de lectines par rapport à leur spécificité celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon 2003**).

III-1-1-Les lectines qui reconnaissent les monosaccharides

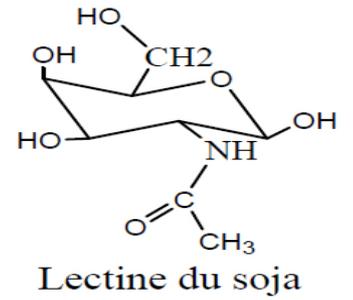
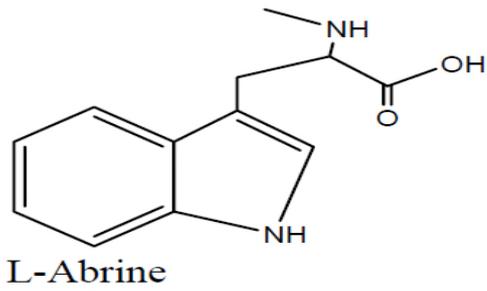
Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnus par les lectines se retrouvent le mannose reconnu par la lectine de *Allium sativum* ; *Canavalia ensiformis*, *vicia faba* ...etc ,le fucose reconnu par les lectines de *Aleuria aurantia* ; *Anguilla anguilla* ; *Lotus tetragonolobus* ...etc. le galactose/GalNA reconnu par les lectines de *Arachis hypogaea* ; *Coprinus cinereus* ; *Entamoeba histolytica*...etc (**Sharon 2003**)

III-1-2- Les lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifiques

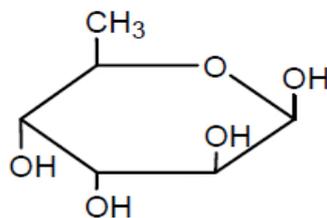
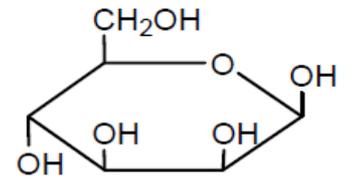
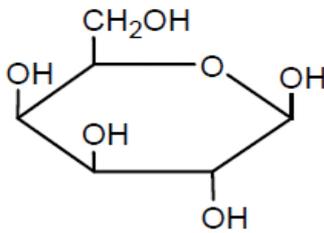
La cyanovirine-N reconnaît des glycannes de type oligomannose tels que la glycoprotéine gp120 du virus VIH (**Botos 2002**) ou la toxine de choléra qui est spécifique pour le GM1 présent sur la surface de cellules épithéliales .

L'affinité montrée pour les oligosaccharides est généralement beaucoup plus élevée que pour les monosaccharides par la présence de sites de liaison plus profonds formant plus de contacts avec le ligand.

▪ **Lectines**



sucres



L-Fucose

Figure 4: Quelques structures chimiques de sucres simples de la membrane cellulaire et de lectine végétales.(Doumbia,2004)

III-2- Propriétés de lectines

- Les lectines sont des protéines hydrosolubles retrouvées surtout dans les graines des légumineuses (Etzer, 1994)

- Elles ressemblent à des glycoprotéines de la membrane des cellules végétales et se comportent comme des anticorps en assurant un rôle défensif contre les bactéries et les champignons **(Guignard.J et al, 1985)**.
- Ce sont des substances thermolabiles, responsables de la toxicité de certaines plantes : ricin, jéquirity, haricot ... **(Bruneton, 1993)**.
- Elles sont aussi reconnues pour leur spécificité aux sucres, ce qui a permis leur usage dans la détermination des groupes sanguins **(Bird, 1974)**, (Tableau II) et à l'étude des structures osidiques de la membrane cellulaire, importantes pour élucider certains comportements de la cellule **(Hebert, 2001)**.

Tableau II : Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent (d'après Lis et Sharon, 2003)

Propriétés	Application
Induction de la mitose	- Etude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	- Isolement, purification et études structurales des glucides. - Purification des glycoconjugués (enzymes, hormones). - Modèles pour la réaction antigène-anticorps (test ELISA, etc)
Liaison aux sucres	- Etudes des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. - Structure et fonctionnement des membranes.
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	- Typage du sang. - Identification de nouveaux groupes sanguins.

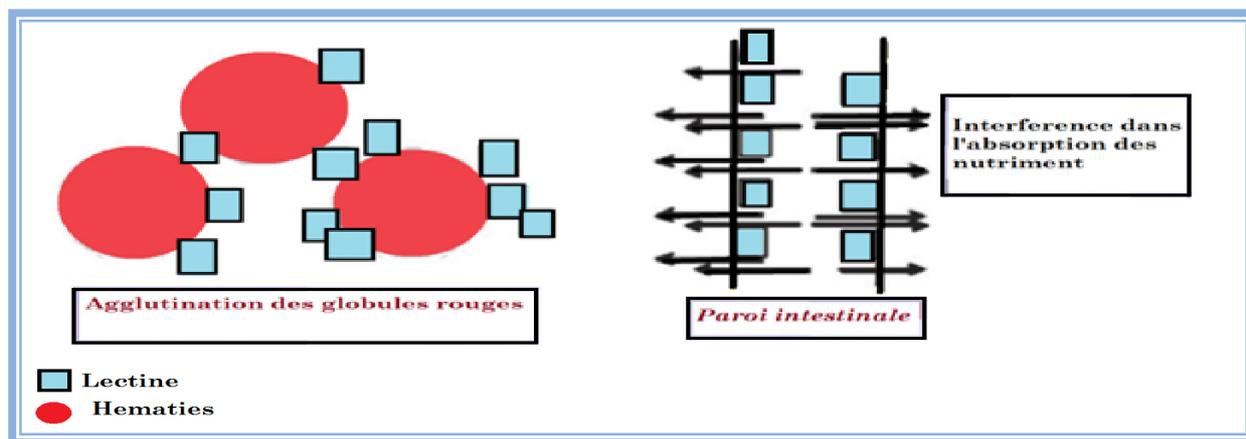


Figure 5 : Mécanisme d'action des lectines.(Makkar et al.,2007)

III-3- Les groupes sanguins et les lectines

Bird (1974) note que plusieurs lectines agglutinent les hématies, et relève une spécificité de groupe Sanguin .

Bien qu'aujourd'hui, les anticorps monoclonaux aient remplacé les lectines dans la détermination des groupes sanguins, leur usage est encore nécessaire (Pusztai et Ewen, 1999).

La spécificité des lectines aux groupes sanguins est présentée dans le tableau III(Doumbia, 2004).

Tableau III: Les lectines spécifiques aux groupes sanguins les plus connus

<i>Spécificités</i>	<i>Source de la lectine</i>	<i>Noms</i>
<i>Anti-A</i>	<i>Plante</i>	<i>Phaseolus limensis</i>
<i>Anti-B</i>	<i>Seaweed</i>	<i>Petita plumosa</i>
<i>Anti-AB</i>	<i>Plante</i>	<i>Crotalaria Striata</i>
<i>Anti-H</i>	<i>Plante</i>	<i>Lotus tetragonolobus</i>
<i>Anti-M</i>	<i>Plante</i>	<i>Iberis amaras</i>
<i>Anti-N</i>	<i>Plante</i>	<i>Vicia graminea</i>

III-4-Interaction lectines-glucides

Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (Varki 1993). Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. La Figure 6 donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.

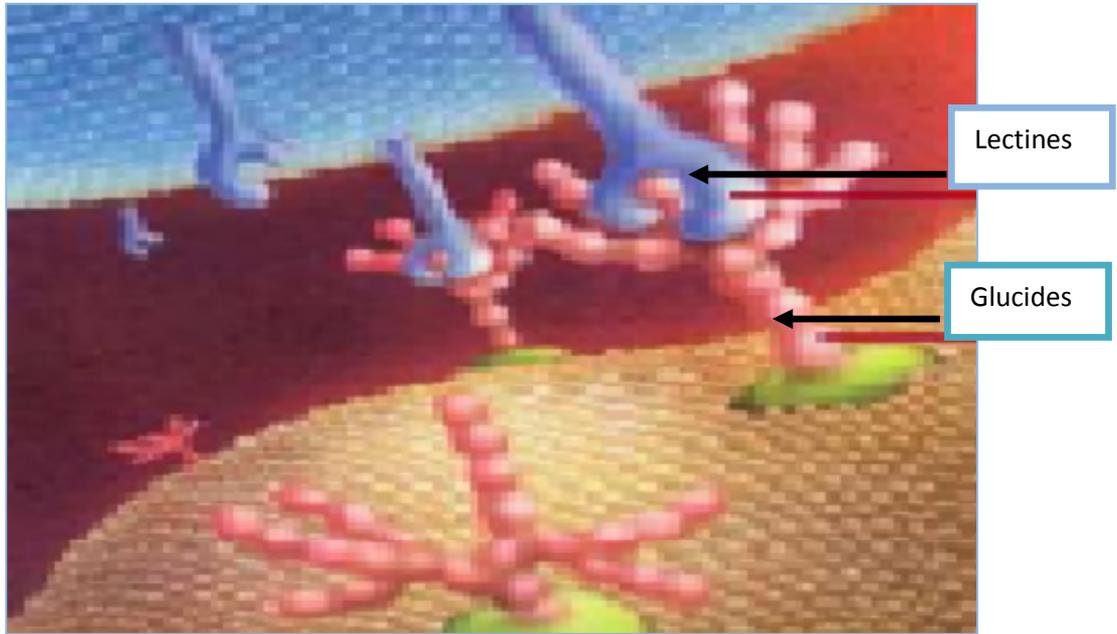


Figure N°6: Représentation schématique d'interaction lectines-glucides (Aragaro, 2008).

Chapitre IV : Propriété et intérêt des lectines

IV-Intérêt des lectines pour l'Homme

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

- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (Boyd and Shapleigh 1954) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.
- Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar, et al. 2005).
- Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (Guillot, et al. 2004), Tableau IV.

Tableau IV– Principaux glycanes associés au cancer (Guillot, et al. 2004).

Non de l'antigène	Séquence glycanique
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Tn	SA α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
T	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Le α	SA α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1-4 Fuc
Le x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Sialyl- Le x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Le y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1-2 α 1-3 Fuc Fuc
N-acétyllactosamine	Gal β 1-4GlcNAc

Le Tableau V décrit les principales lectines isolées de plantes ou d'invertébrés qui sont employées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie ou, plus généralement, en histopathologie. Les lectines sont utilisées en fonction des structures glycaniques associées aux états pathologiques (Guillot, et al. 2004). De par leur spécificité, les lectines se lient préférentiellement à un monosaccharide soit situé au bout de la chaîne soit placé dans une position non terminale des oligosaccharides complexes.

Tableau V: Lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	<i>Lycopersicum esculentum</i>	D-GlcNAc
PWL	<i>Phytolacca americana</i>	D-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare (wheat germ)</i>	D-GlcNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	D-GlcNAc
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β -
GSI-B4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	D-Gal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	D-GalNAc
LBL	<i>Phaseolus lunatus (Lima bean)</i>	D-GalNAc

Tableau VI: Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectine

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

Matériels et méthodes

But de travail :

Le travail porte sur l'évaluation de l'activité hémagglutinante d'extraits bruts et purifiés de lectines de trois graines de légumineuses (lentilles, fèves, féverole) et leurs différentes parties (cotylédons et téguments) sur les différents groupes d'hématies du sang humain, et l'étude de l'effet de différents traitements sur les lectines (température, pH) et sur les hématies (par la papaine et la trypsine) sur leur activité hémagglutinante.

V-1-Matériel

V-1-1-Matériel végétal :

Nos travaux ont été effectués sur 3 graines produites localement :

- Lentille (**a**) « *Lens culinaris* » : Provenant de la station ITGC de Sétif.
- Fève (**b**) « *Vicia faba major* » ou fève proprement dite, récoltée dans la zone de Remila-Béjaia.
- Féverole (**c**) « *Vicia faba minor* » : Originaire de Merdj Ouaman Amizour-Béjaia.

Des graines de chacune des espèces ont été décortiquées pour séparer les téguments et cotylédon, des différentes parties (entière, décortiqué et tégument) broyées et tamisées pour l'obtention d'une poudre sur laquelle nous avons travaillé.

V-1-2-Le Matériel sanguin :

Nous avons utilisé du sang humain, provenant du centre de transfusion sanguin (CTS) de Bejaia ;et comportant les 4 groupes A B AB O (RH+)

V-2-Méthodes

V-2-1-Extraction des lectines

L'extraction des lectines est réalisée par macération à l'eau physiologique (figure 7) selon la méthode décrite par **Doumbia (2004)**.

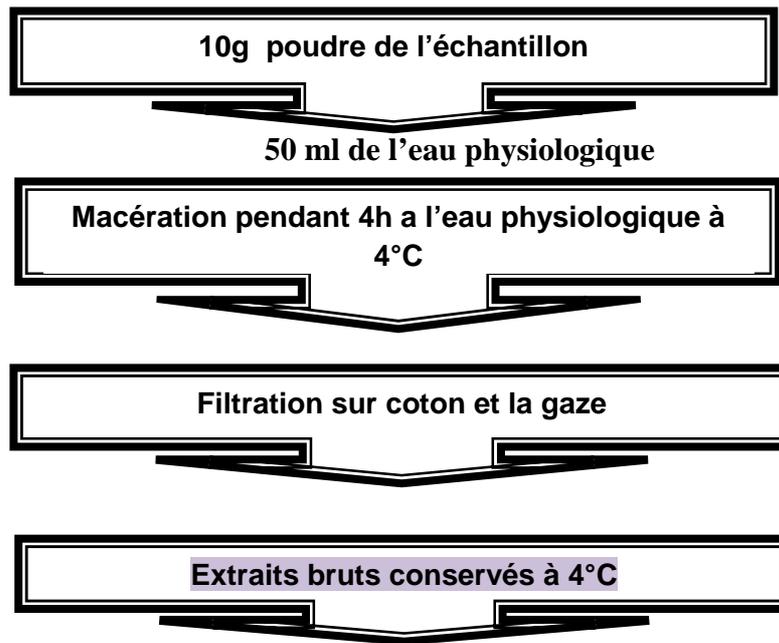


Figure 7: Protocole d'extraction des lectines (Dombia, 2004).

V-2-2- Purification des lectines au sulfate d'ammonium :

La purification a été effectuée sur les différents extraits bruts de légumineuses, selon la méthode de Meite et al 2008 , les différentes étapes sont résumées par la figure 8.

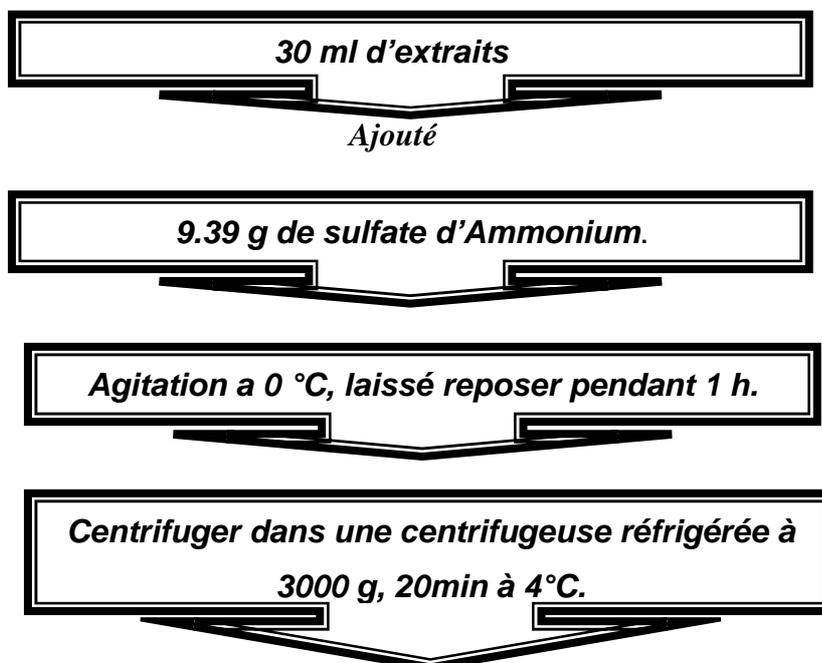


Figure 8: Méthode de purification avec du sulfate d'ammonium (Meite et al,2008).

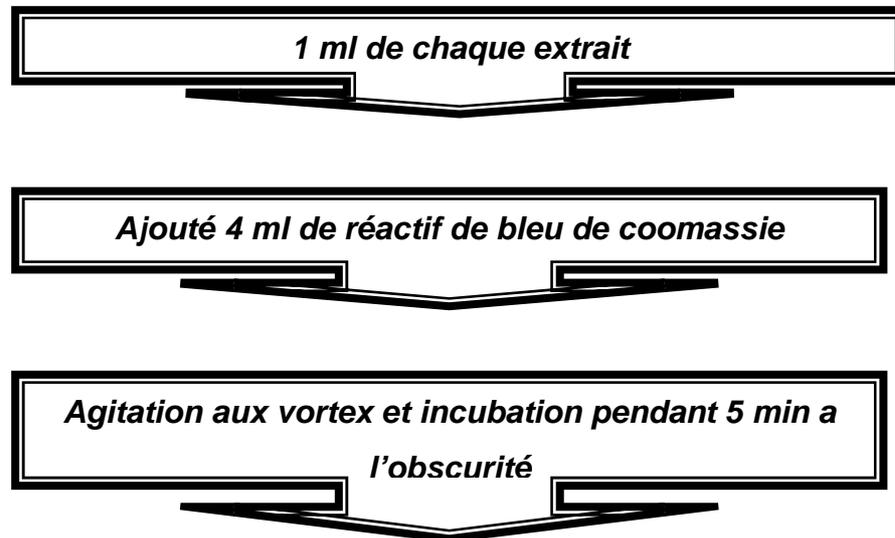
V-3-Les dosages

V- 3-1-Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de lectines

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

Les concentrations sont déterminées par référence à une gamme étalon à base de BSA, dont la concentration varie de 0 à 1400 µg, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.(annexe)

Mode opératoire :



Lecture de l'absorbance

à 595 nm

Figure N° 9 : Protocole expérimentale de dosage des protéines des différents extraits des lectines (Bradford ,1976)

V-3- 2-Dosage des glucides :

Les teneurs en glucides dans les extraits bruts et purifiés de lectines sont déterminées par la méthode décrite par **Dubois et al (1956)** :

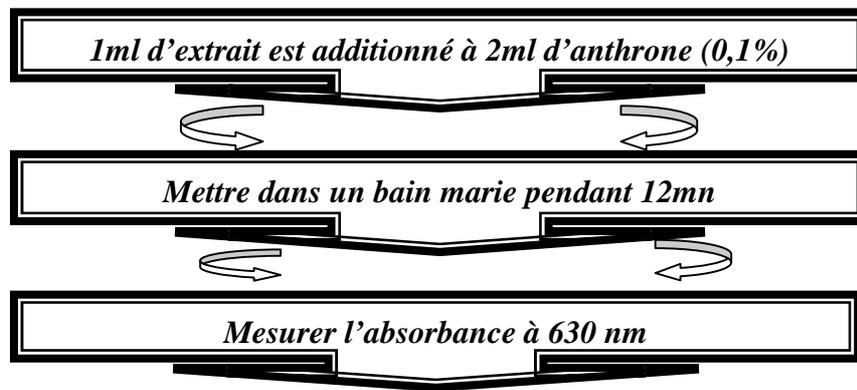


Figure 10 : Dosage des glucides

Les concentrations sont déterminées par référence à une gamme étalon à base de glucose, dont la concentration varie de 0 à 1400 µg, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.(annexe 1)

V-4-Tests d'agglutination :

V-4-1-Préparation des hématies :

La préparation de la suspension des hématies est illustrée par le schéma suivant « **figure 11** »

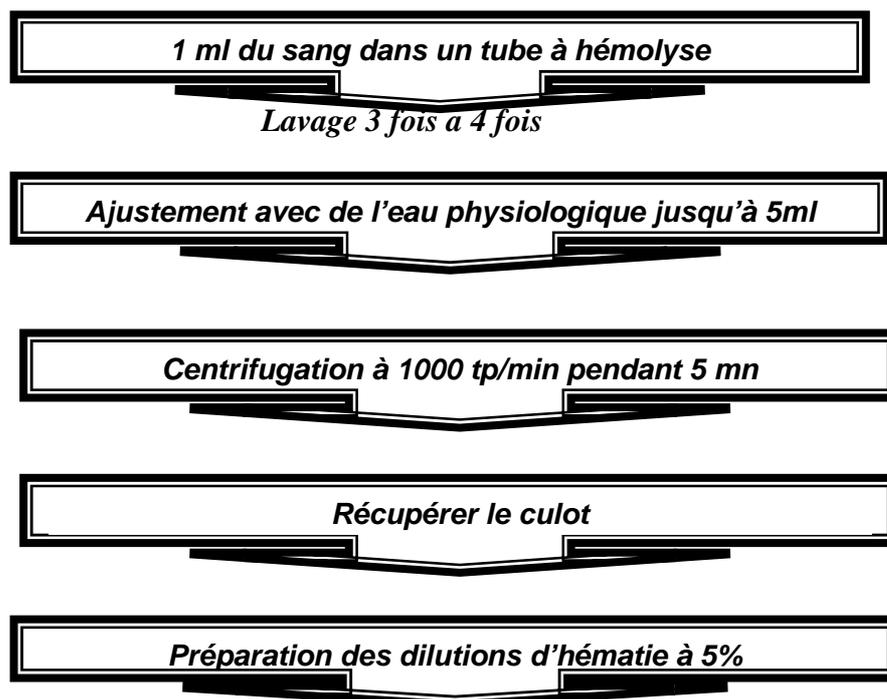


Figure 11: Préparation des hématies (Doumbia,2004)

V-4-2-Tests d'agglutinations visuelles :

Le test est réalisé selon le protocole décrit par **Doumbia (2004)**.

A une goutte d'extrait de chacun de nos échantillons placé sur une plaque propre, un volume équivalent de la suspension des érythrocytes à tester est ajouté, et l'ensemble est homogénéisé en remuant la plaque doucement et continuellement. Nous avons effectué la lecture à l'œil nu après 8 à 10 mn. Nous avons effectué une lecture au microscope optique pour tous les tests négatifs.

V-4-3 Détermination des titres des différents extraits de lectine.

Mode opératoire

L'activité hémagglutinante est exprimée par le titre. Ce dernier qui est la réciproque du plus grand rapport de dilution pour lequel une hémagglutination est observée. (**Gartner et Podleski, 1975**).

Exemple : Si 1/1024 est le plus grand rapport de dilution pour lequel une hémagglutination est observée le titre équivaut à 1024.

L'activité hémagglutinante des lectines est déterminée par la méthode de double dilution sérielle de **Jaff et al.(1972)**. Un volume de 50 μ l de chaque extrait (extrait brut) est dilué en série avec 50 μ l d'eau physiologique (chaque dilution en série réduit la concentration de l'extrait de moitié) ; 50 μ l de solution mère ou diluée sont mélangés à un volume égal de suspension d'hématie à 4% dans des puits d'une microplaque. Cette dernière est homogénéisée sur un agitateur pendant 5 min à la température ambiante. L'activité hémagglutinante des lectines est déterminée après estimation visuelle de l'hémagglutination après 30 mn. La concanavaline a été utilisée comme lectine standard.

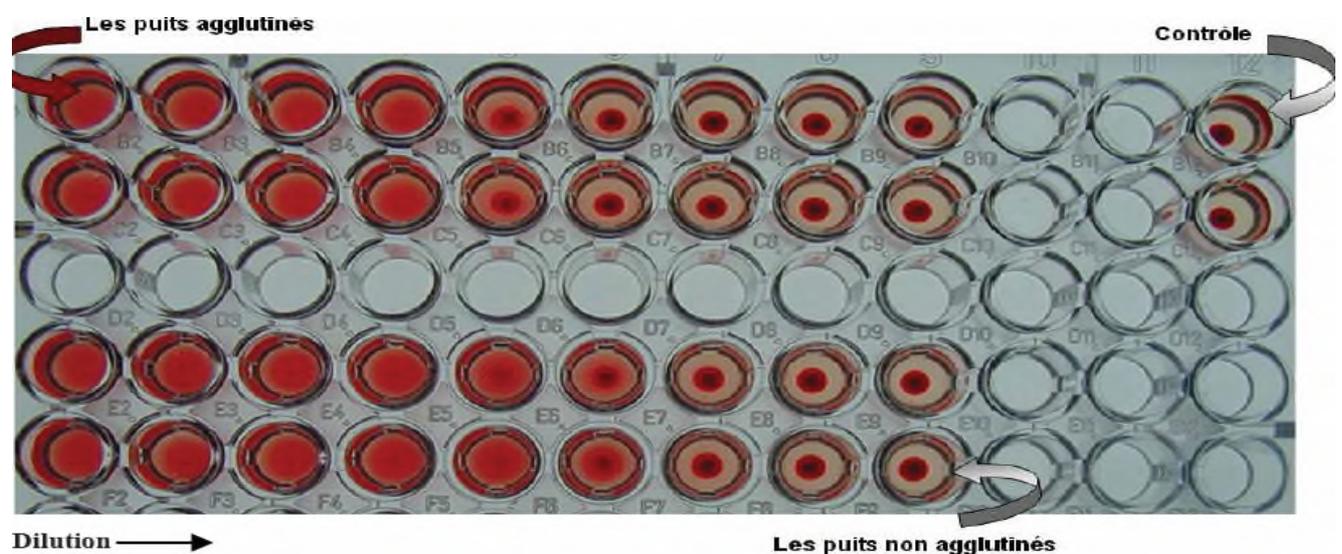


Figure 12: Test d'hémagglutination sur microplaque

V-5-Traitement des hématies avec la papaine et la trypsine :

Une aliquote de suspension d'hématies de 4% a été préparée .le traitement enzymatique est effectué selon la méthode de *Jaff et al (1972)*.les mélanges trypsine-hématies et papaine-hématies (0.1mg de trypsine ou de papaine/10ml de suspension d'hématies) sont incubés à 25°C pendant une heure puis centrifugé à 4000 trs/min pendant 10 min. Les culots obtenus sont dilués avec du tampon, afin d'obtenir une suspension d'hématie à (4% traitée a la trypsine ou la papaine).

V-6-Effets des différents traitements sur l'activité hémagglutinante des lectines

V- 6-1 -Effet de la température

Nous avons utilisé la méthode décrite par *Sampaio et al. (1998)*.Les extraits (bruts ou purifiés) de lectines (3ml) sont incubés à l'étuve à différentes températures (30°C ,45°C ,60°C ,75°C ,90°C, 105°C) pendant 30 minutes. A l'issu de cette incubation, les extraits sont rapidement refroidis (dans de la glace) et conservés au réfrigérateur (4°C).

Les activités hémagglutinantes des lectines traitées sont comparés aux lectines non traités (température ambiante 22°C) .

V-6-2-Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des lectines est déterminé selon la méthode décrite par *Adenike et Eretan (2003)*. Les extraits des lectines (bruts ou purifiés) ont été incubés pendant 30 minutes à différents pH (2-4-6 et 7) (tampon phosphate citrate 0,2M) ,pH 9 (tampon borate) et PH 11, Les tubes témoins sont incubés dans de l'eau physiologique.

L'activité hémagglutinante des extraits traités est déterminée après ajustement de leurs pH à 7.

V-7-Test d'inhibition par les sucres :

Nous avons utilisé les sucres suivants : Glucose, lactose, galactose, maltose, mannose, melibiose, saccharose, levulose.

V-7-1-Principe :

C'est une inhibition des réactions d'agglutination des hématies, exercée par un sucre en fonction de son affinité à se lier aux phytoagglutinines.

V-7-2-Technique :

Les tests d'inhibition de l'activité hemagglutinante induite par différents sucres sont réalisés de manière analogue aux tests d'agglutination (méthode des titres sur microplaque) .une série de double dilution des sucres à été préparé dans une solution saline, toutes ces dilutions ont été mixées avec un volume égal (25µl) d'extraits de lectines (bruts et purifié). le mélange est laissé reposé pendant 30 min à température ambiante ,puis une suspension d'hématies(5 %) de différents groupes a été rajoutée.la

concentration minimale des sucres dans le mélange réactionnel final qui complètement inhibé l'agglutination des lectines a été déterminée.(Wang et al,2000)

V-8-La méthode spectrale (mesure de l'activité hémagglutinante) :

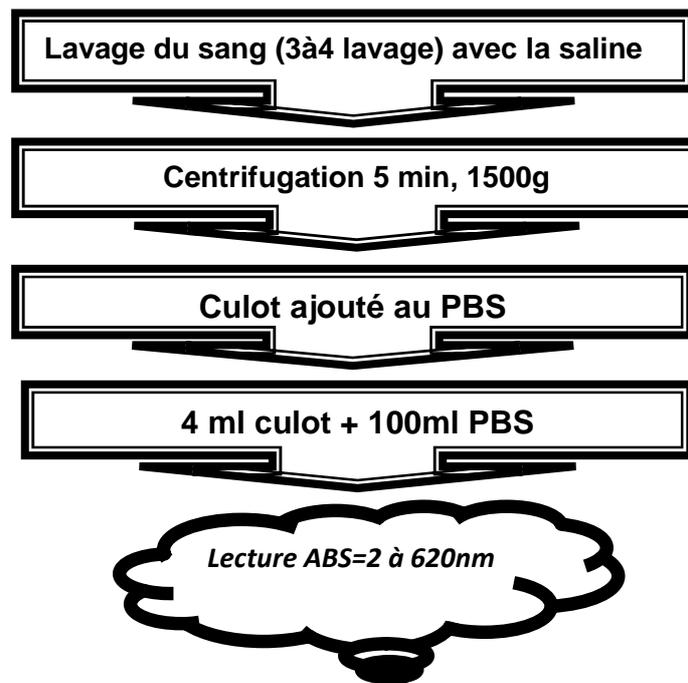
Nous avons utilisé la méthode décrite par (Makkar,2007)

Mode Opérateur :

Nous avons préparé les différentes solutions qui sont : la solution saline, PBS, Alsevers solution, anticoagulant, la trypsine a 1% et la solution de la concanavaline A.

V-8-1-Préparation de la suspension sanguine :

1ère étape :



2eme étape :

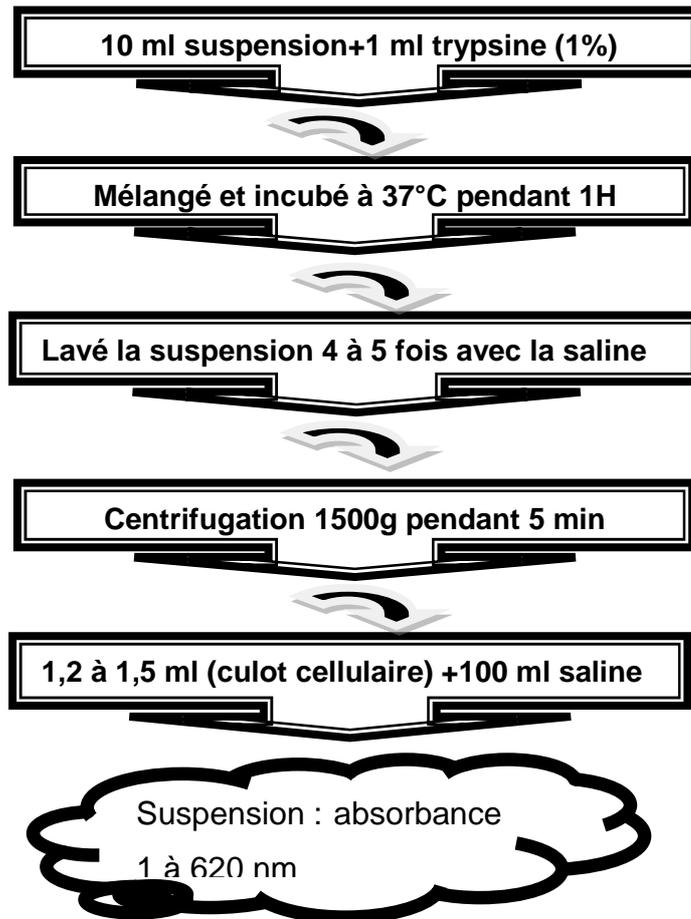


Figure 13: préparation de la suspension sanguine

V-8-2-Détermination de l'activité hémagglutinante :

Dans des cuvettes en plastique, nous avons mis 1 ml d'extrait (dans la première cuve) et nous avons préparé une série de double dilution (dilution avec PBS). Dans chaque cuve nous avons ajouté 1 ml de la suspension des érythrocytes. Nous avons maintenu les cuvettes en position verticale pour une durée de deux heures et demie à température ambiante. Lecture de l'absorbance à 520 nm

Chaque série de cuvettes doivent avoir 2 à 4 cuvettes de control contient 1 ml PBS + 1ml suspension.

V-8-3-Calcul de l'activité hémagglutinante :

L'Activité hémagglutinante est exprimée en unités arbitraires. Le nombre d'unités égal au nombre de dilutions provoquant une diminution de 50% de l'absorbance de la suspension d'érythrocyte pendant deux heures et demi dans les conditions décrite ci-dessus. Ce nombre de dilution (x) est calculé en mesurant l'absorbance des deux cuvettes plus proche à la moitié de l'absorbance du control (E50). L'une des lectures (Ea) étant plus faible et l'autre (Eb) étant plus élevée que E50. L'équation suivante est alors utilisée :

$$\text{Log } x = \log A + \log 2 (E50 - Ea) (Eb - Ea)$$

Résultats et discussion

VI-Résultats et discussion

VI-1-Résultats

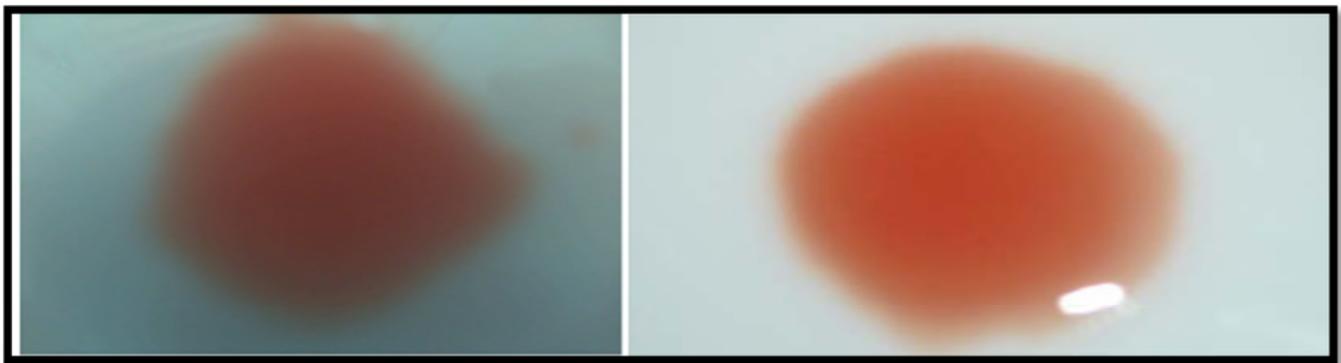
VI-1-1-Activité hémagglutinante des lectines

Nous avons élaboré au moyen de tests préliminaires une grille d'évaluation de l'activité hémagglutinante.(figure14)

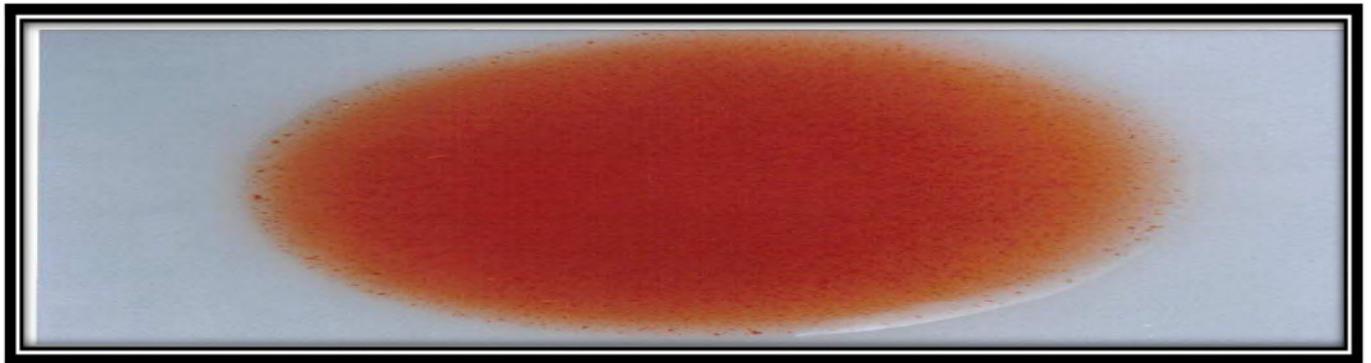
Cette dernière nous a permis de noter cinq niveaux d'activités hémagglutinantes :

- (-) Absence d'agglutination
- (+) très Faible agglutination
- (++) Faible agglutinantion
- (+++) *Forte agglutination*
- (++++) *Très forte agglutination*

Nos résultats montrent que tous les extraits manifestent une activité hémagglutinante décelable, à l'œil nu (Tableau VII)



+ Très Faible Agglutination



++ Faible agglutination



+++ Forte Agglutination



++++ Très forte Agglutination

Figure 14 : grilles des tests visuels

Tableau VII : Les résultats d'agglutination des neufs extraits bruts et purifiés

	A	B	AB	O
Lentille (b)	+++	+++	+++	++++
Lentille (p)	++	++	++	+++
Cotylédon lentille(b)	++++	++++	++++	++++
Cotyédon lentille (p)	+++	+++	+++	+++
Tégument lentille(b)	+	+	+	+
Tégument lentille (p)	+	+	+	+
Fève entière(b)	+++	+++	+++	+++
Fève entière (p)	++	++	++	++
Cotylédon de la fève(b)	+++	+++	+++	+++
Cotylédon de la fève (p)	++	++	++	++
Tégument fève (b)	+	+	+	+
Tégument fève (p)	+	+	+	+
Féverole(b)	++	++	+++	+++
Féverole (p)	+	+	++	++
Cotylédon féverol(b)	++++	++++	++++	++++
Cotylédon feverol(p)	+++	+++	++	++
Tégument féverole(b)	++	+	++	+++
Tégument féverole(p)	+	+	+	+

L'activité hémagglutinante de différents extraits bruts et purifiés dépend du substrat végétal utilisé et du groupe sanguin auxquels il est appliqué.

Globalement, nos données révèlent une plus grande activité hémagglutinante des extraits bruts vis-à-vis les différents groupes sanguin par rapport à l'activité obtenu avec les extraits purifiés.

Les extraits bruts et purifiés des lentilles entières présentent une forte agglutination comparativement aux extraits des deux autres légumineuses utilisés (fève et féverole entière).

Les hématies du groupe sanguin O manifestent une plus grande réactivité vis-à-vis des différents extraits de lectine (bruts et purifiés).Les groupes sanguins A ,B et AB montrent une réactivité comparable pour les différents extraits.

L'effet du décortilage sur l'activité hémagglutinante dépend de la graine considérée et du groupe sanguin utilisé. Pour les groupes A, B, AB et O, nous relevons une élévation de l'activité des extraits après décortilage des graines de lentille et féverole alors que pour la fève aucun changement n'est observé.

Une très faible agglutination des extraits bruts et purifiés des téguments de ces trois légumineuses a été observée, seuls les extraits bruts des téguments de la féverole manifestent, une plus forte agglutination sur les hématies du groupe O.

VI-1-2-Détermination des titres :

Les tests d'hémagglutination des différents extraits utilisés à différentes concentrations, nous ont permis de déterminer le titre de chacun de nos extraits avant et après purification (**Tableau VIII**). Les titres des différents extraits varient en fonction de la graine étudiée et ces différentes parties (cotylédon et tégument), et le groupe sanguin. Ils varient de 16 à 2048.

Tableau VIII : les titres de différents extraits bruts et purifiés

échantillon	Groupes sanguin			
	A	B	AB	O
WL BRUTE	256	256	256	1024
WL purifier	64	32	32	64
CL brute	512	512	512	2048
CL purifier	64	64	64	128
HL brute	128	128	128	256
HL purifier	16	16	16	16
WF brute	128	128	128	256
WFpurifier	64	32	32	64
CF brute	256	256	256	512
CF purifier	64	64	64	128
HF brute	64	64	64	128
HF purifier	32	32	32	64
WFR brute	128	128	128	256
WFRpurifier	64	64	64	128
CFR brute	256	256	256	512
CFRpurifier	128	128	128	256
HFR brute	64	64	64	128
HFRpurifier	16	16	16	64

Les titres présentés par les extraits bruts sont nettement plus élevés que ceux observés par les extraits purifiés. L'activité hémagglutinante des extraits diminue de 50 à 93.75%

Après purification Les extraits bruts de lentille entière affichent les titres les plus élevés pour tous les 4 groupes sanguins. Dans le cas des extraits purifiés, c'est l'extrait de féverole entière qui montre le titre le plus élevé sur les hématies du groupe O.

Les titres les plus marqués sont notés sur les hématies du groupe O, Le décorticage s'accompagne d'une élévation du titre pour tous les extraits bruts et purifiés quelque soit le groupe sanguin considéré : dans le cas des extraits de la lentille et féverole (bruts et purifiés) ce titre est multiplié par 2 à 4 quelque soit le groupe sanguin.

VI-1-3-Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés :

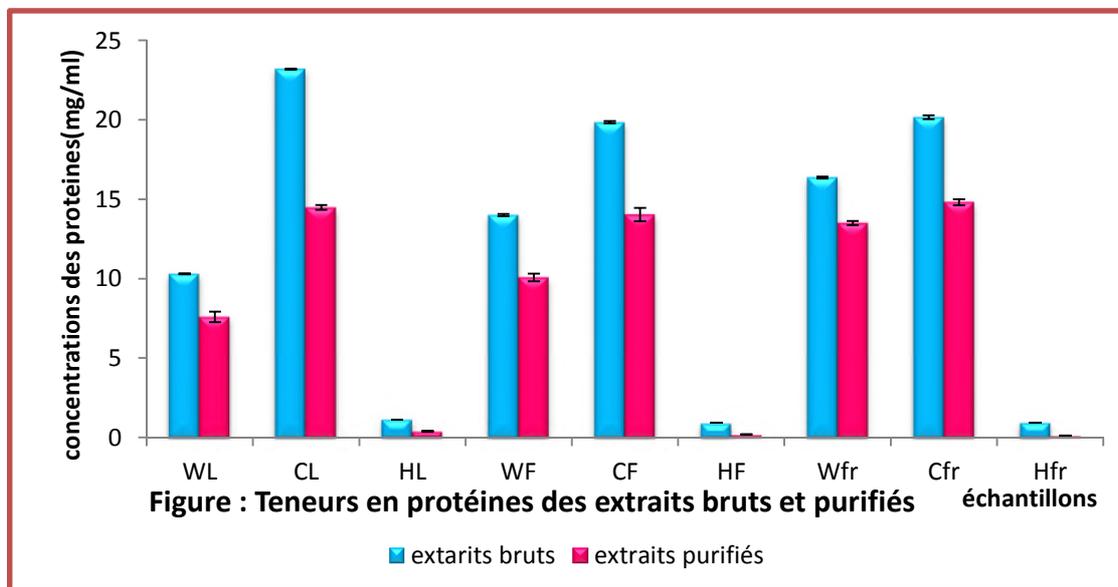


Figure 15: Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés

Nos données analytiques (figure 15) révèlent la variabilité de la teneur en protéine des différents extraits. L'analyse de la variance met en évidence les effets significatifs ($p < 0.05$) de chacun des facteurs mis en jeu.

Les extraits de légumineuses entières de fève et féverole affichent des teneurs en protéines ($14,00 \pm 0,06$, $16,37 \pm 0,06$) plus élevées que celle de *Lens culinaris* ($10,30 \pm 0,03$) ; ce classement est modifié par le décorticage au profit de cette dernière graine. Ce sont les téguments qui fournissent des extraits de lectine le moins pourvus en protéines (0.91 à 1.15).

La purification s'accompagne d'une réduction de teneurs en protéines des extraits allant de 17.4 à 87.33%, Quelque soit la graine considérée nous notons que les cotylédons présentent les plus fortes teneurs en protéines (26.52 à 37.52 %).

VI-1-4-Teneur en sucres des extraits brut et purifier :

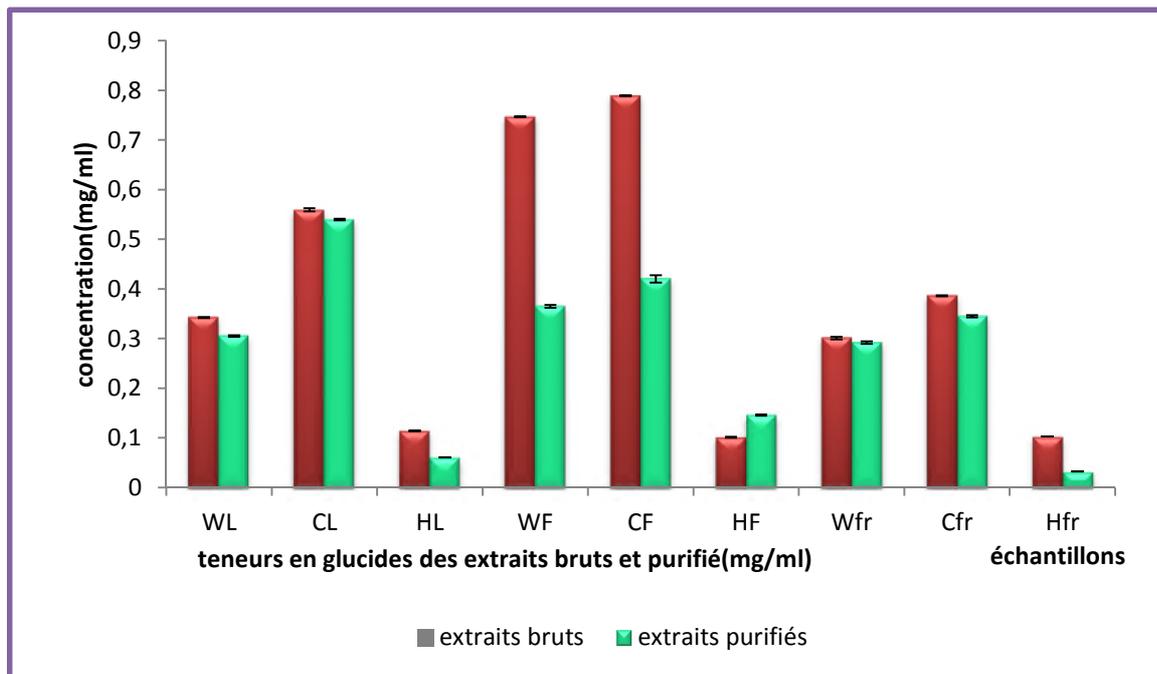


Figure 16: Teneurs en glucides des extraits bruts et purifiés

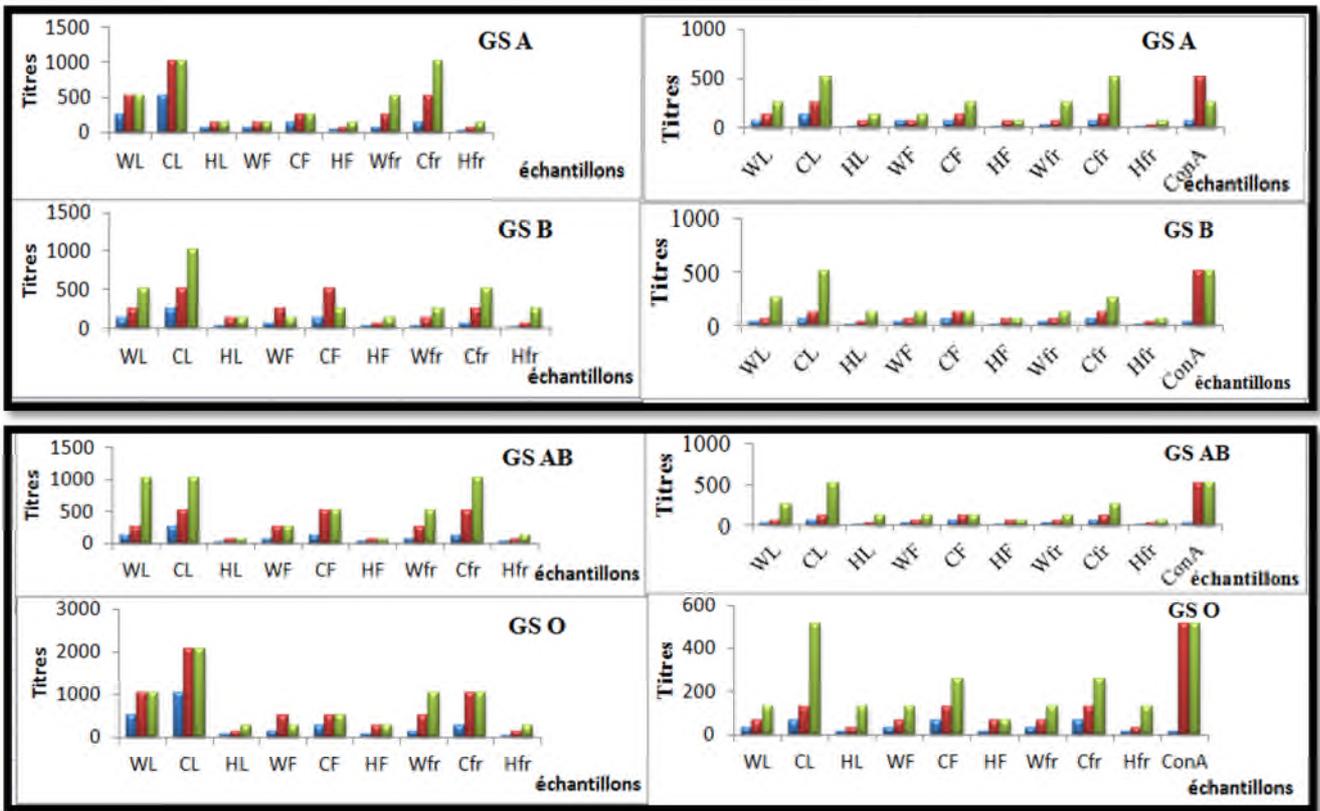
Les données analytiques montrent une variabilité de teneur en glucides des différents extraits de lectine.

Nous notons que les extraits bruts de fève (entière ou cotylédon) sont les plus riches en glucide (0,75 et 0,79) comparativement à ceux de lentille (0,34 et 0,56) et féverole (0,30 et 0,39).

Les teneurs des extraits s'accompagnent aussi bien d'une baisse de leur teneur en glucide que du classement des extraits. Ces baisses de teneurs en glucides sont particulièrement variables pour la fève entière ou décortiquée (46,7 à 51,2 % contre 2,9 à 10,9 pour les autres graines entières ou décortiquées) et les téguments varient entre (46,7 à 68,5 %).

VI-1-5-Effet de traitement des hématies avec la trypsine et la papaïne :

Nous notons globalement que le traitement préalable d'hématies par la papaïne s'accompagne d'une élévation de l'activité hémagglutinante de mes extraits. Cette augmentation est supérieure à celle enregistrée avec la trypsine. Ce phénomène est notamment marqué avec les différents extraits purifiés.



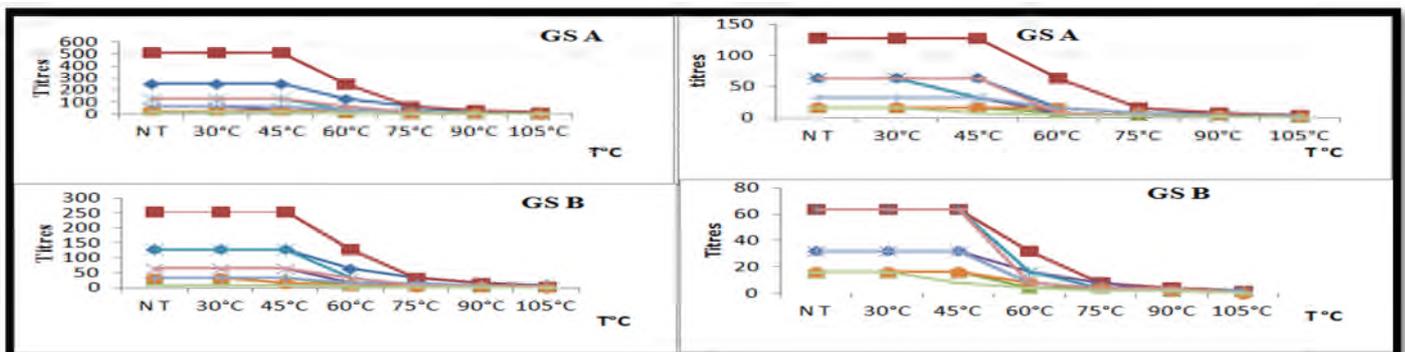
■ hématies non traité ■ hématies traité à la trypsine ■ hématies traité à la papaine

Figure 17: Effet du traitement des hématies avec la trypsine et papaine

VI-1-6-Effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits bruts et purifiés :

La variation de l'activité hémagglutinante des extraits avec l'élévation de la température le traitement définit deux phases (figure 19).

La première phase est caractérisée par une thermorésistance des extraits, l'activité hémagglutinante est préservée jusqu'à 45°C pour tout les extraits bruts et purifiés (*Vicia faba Major* *Lens culinaris* et *Vicia faba Minor*) ce dernier présente toute fois les téguments et cotylédons de la fève et cotylédon féverole ne maintiennent leur thermorésistance que jusqu'à 30 °C (figure 10) ,puis ils présentent une diminution significative à 45°C.



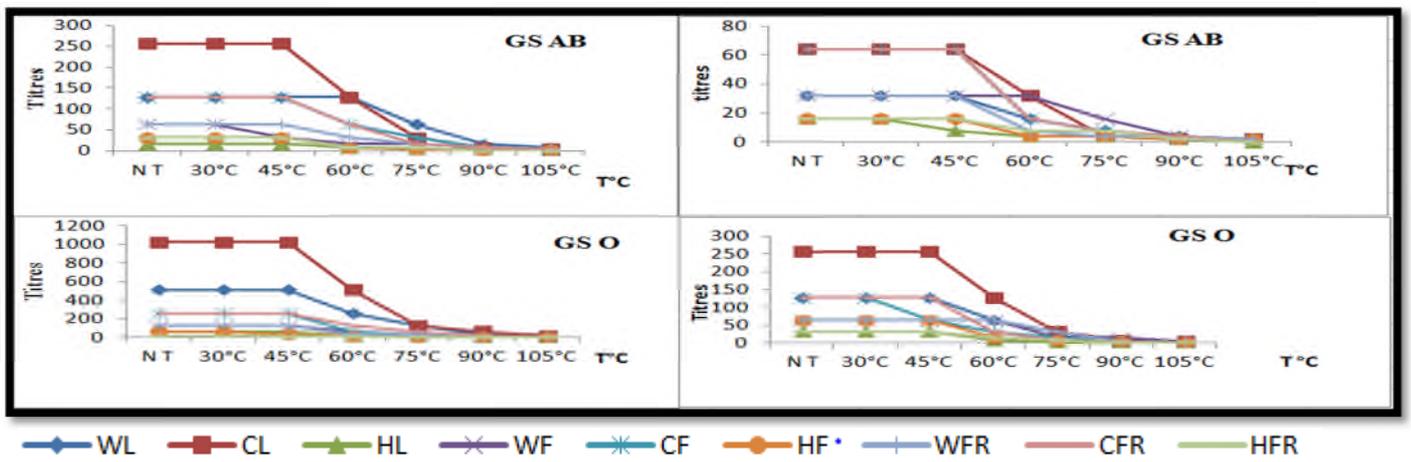


Figure 18: Effets du traitement des extraits avec les différentes températures.

La deuxième phase est caractérisée par une thermo-sensibilité des extraits allant jusqu'à l'inhibition totale de l'activité pour une température de 105°C., au cours de cette deuxième phase, la perte d'activité est d'abord (de 45° à 75 °C) puis elle diminue de façon progressive.

VI-1-7-Effet du pH sur l'activité hemagglutinante des extraits bruts et purifiés :

L'évolution de l'activité hemagglutinante en fonction de pH définit quatre phases principales :

La première phase se caractérise par une très faible augmentation de l'activité hemagglutinante et s'étalent du pH 2 au pH5.

La deuxième phase (pH 5 à pH7) affiche une très forte élévation de l'activité hemagglutinante.

La troisième phase s'étend de pH 7 au pH9 et s'accompagne d'un maintien de l'activité hemagglutinante à un niveau constant.

La dernière phase (pH>7) est caractérisée par l'amorce d'une réduction de l'activité hemagglutinante, au cours de cette dernière phase, la baisse d'activité varie de 50 à 75%.

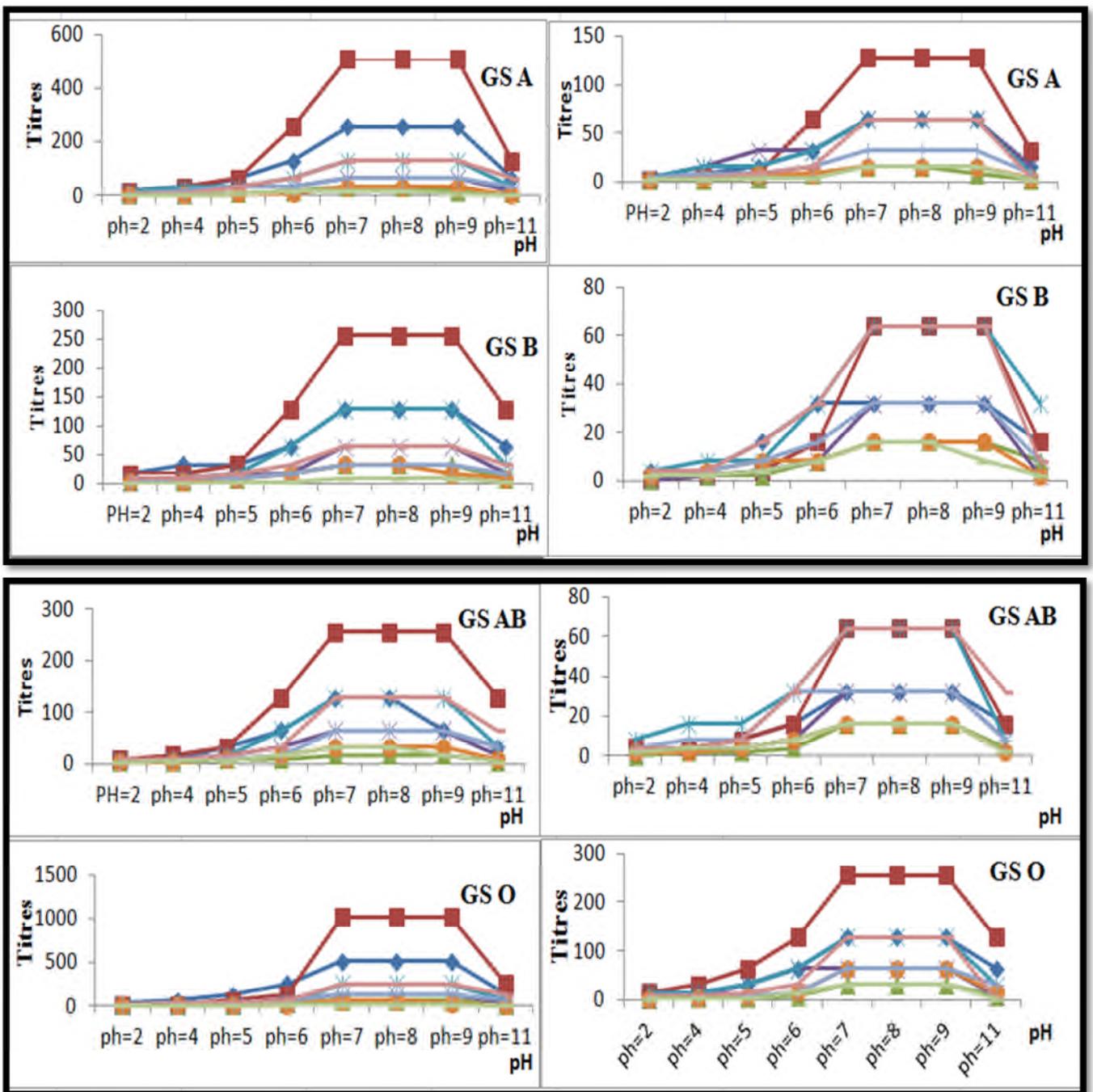


Figure 19: Effet du pH sur l'activité hémagglutinante s des extraits bruts et purifiés.

VI-1-8-Test d'inhibition par les sucres :

Les résultats montrent que le mannose et lévulose présentent la plus faible concentration inhibitrice (0.0975 μ M, 0.195 μ M) de l'action des extraits bruts de fève, féverole et la lentille (0.09 à 0.39 μ M/ml); la plus forte concentration (25 mM et 12.5 μ M) a été notée pour le glucose vis-à-vis la fève et lentille entière et pour le galactose (12.5 μ M) vis à vis la fève entière.

Après décorticage, le lévulose manifeste la plus faible concentration inhibitrice pour les extraits bruts et purifiés de cotylédons, féverole et lentilles (0.0975 à 3.12 mM).

Les téguments des extraits bruts et purifiés des téguments fève ont une très grande affinité au lévulose utilisé respectivement à une concentration de (0.39 et 1.56 mM). Le saccharose et galactose présentent la plus faible concentration inhibitrice (0.195 mM, 6.25 mM) sur les extraits bruts et purifié des téguments féveroles.

Le saccharose et melibiose inhibent fortement les extraits bruts des téguments de lentilles avec une concentration de 0.78 mM, sur l'extrait purifié, l'inhibition de l'activité est exercée par le mannose à une concentration de 12.5 mM.

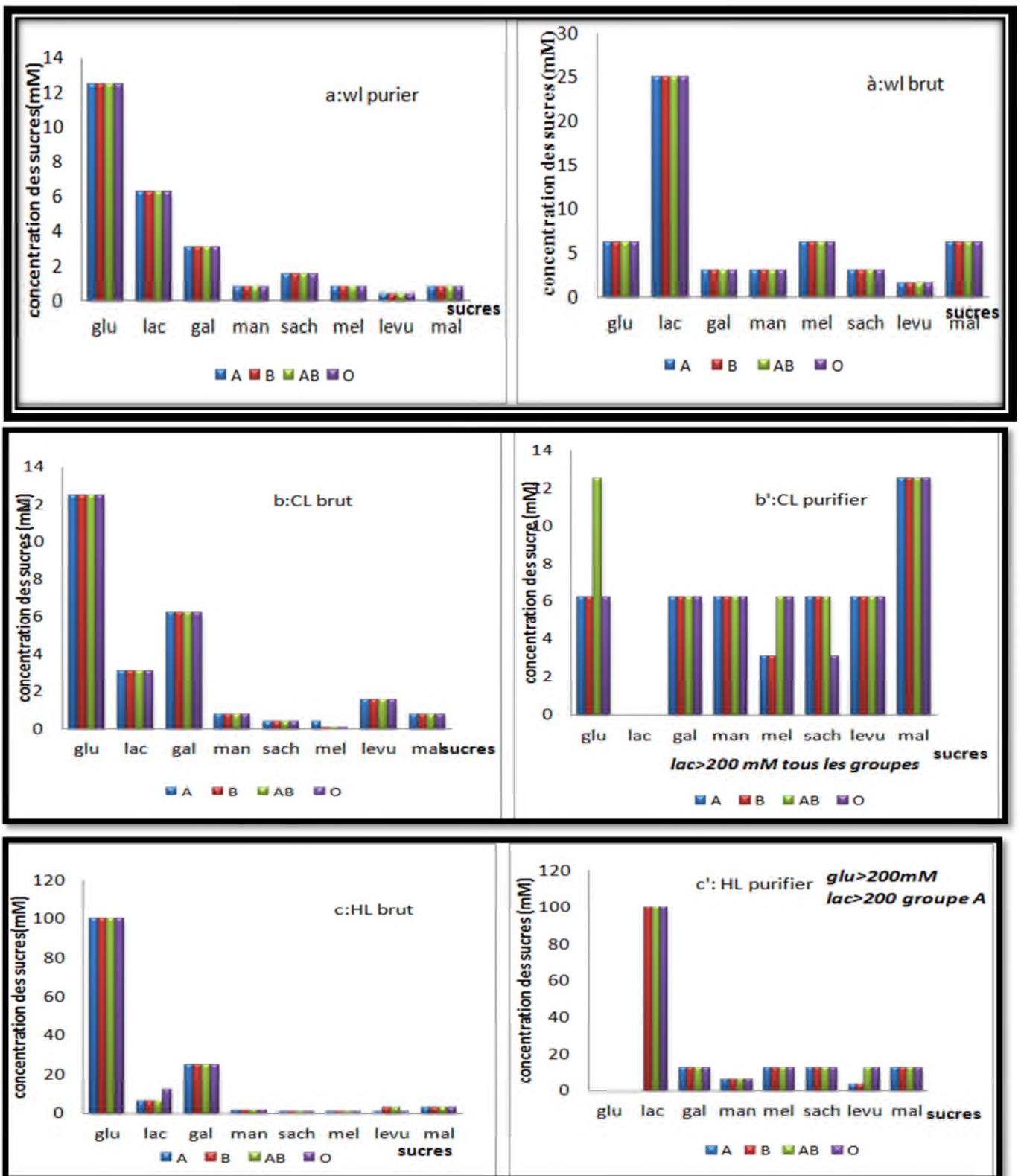


Figure 20 : Concentration minimales des sucres utilisés pour inhiber l'AH de différents extraits bruts et purifiés de lentilles

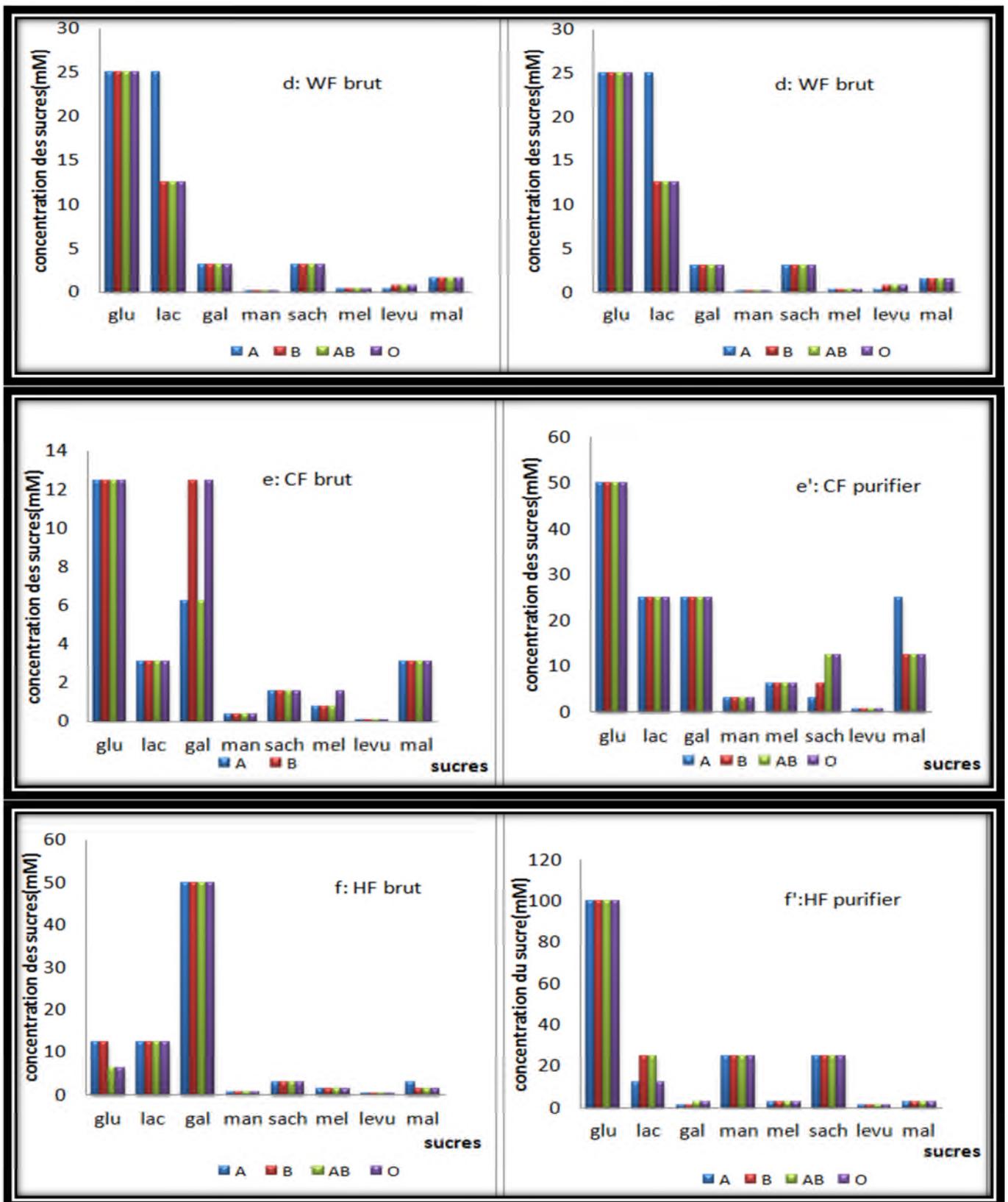


Figure 21: Concentration minimale des sucres utilisés pour inhiber l'AH de différents extraits bruts et purifiés de fève

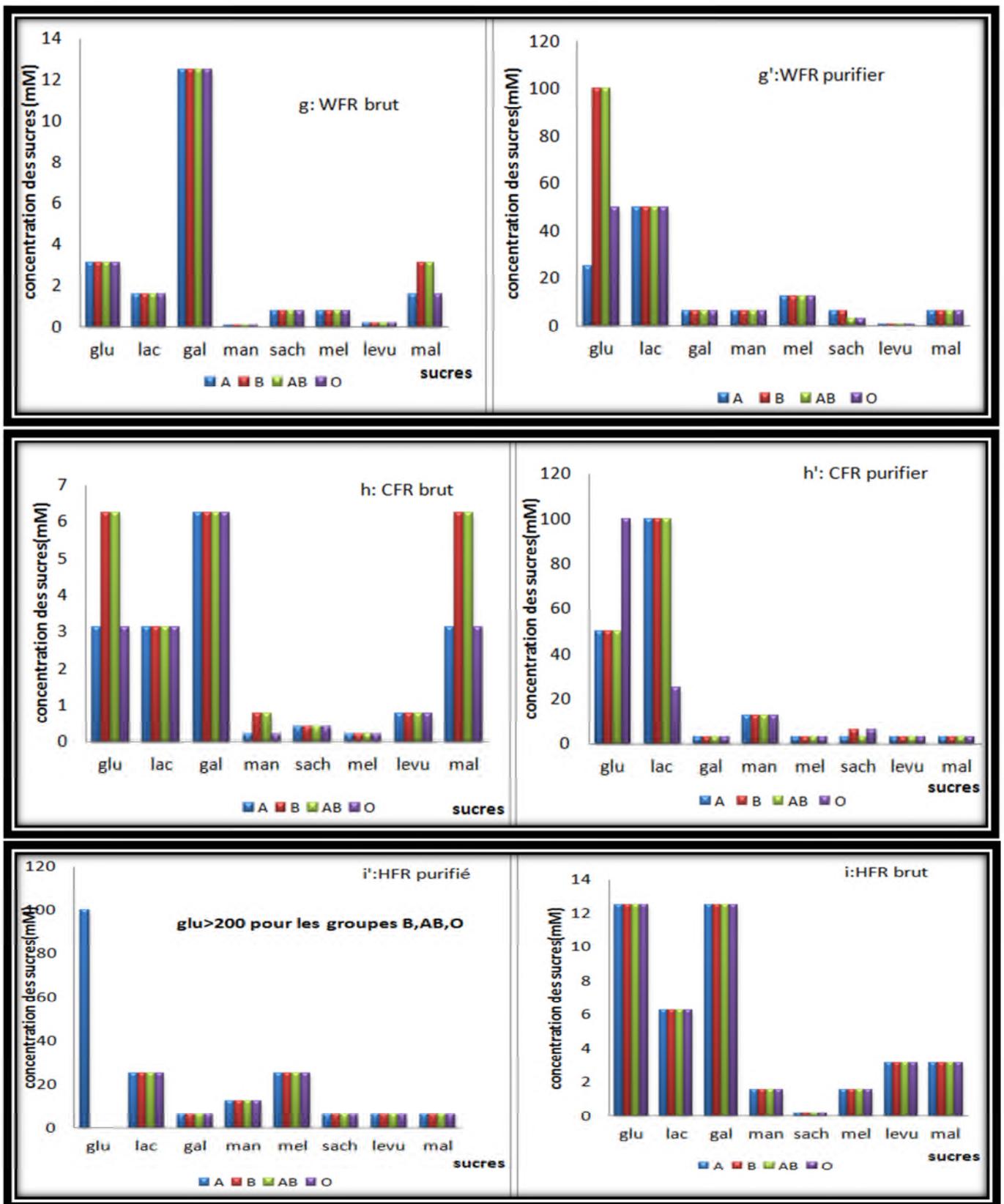


Figure 22 : Concentration minimales des sucres utilisés pour inhiber l'AH de différents extraits bruts et purifiés de féverole.

VI-1-9-Mesure de l'activité hémagglutinante par la méthode spectrale

Nos données analytiques montrent que la concanavoline A prise comme standard manifeste une activité hémagglutinante variable selon le groupe sanguin considéré ,la plus faible valeur est notée pour le groupe B (179.5 unité/ml) alors que l'activité la plus élevée est enregistrée pour le groupe O (1794.7 U/ml) et le groupe A (1516.2 U/ml).

Seuls les extraits bruts des cotylédons des lentilles et féve ainsi que ceux de féverole graine entière affichent une activité supérieure à celle du standard (190.7 ;271 et 274 Unité/ml respectivement).Ces augmentations varient de 6.27 % (cotylédon lentilles)à 52.65% (féverole entière).

Après purification ,l'activité des extraits de graines entière varient respectivement pour le groupe B 2.8à 4.12 celle de la concanavoline A.pour le groupe AB , l'activité des lectines purifiés de feve (entière et cotylédon) represente 1.6 à 1.9 fois celle du standard.

Pour le groupe O, l'activité des lectines de feverole entière et cotyledon feve equivaut à 1.09 et 1.56 fois celle de la concanavoline A.

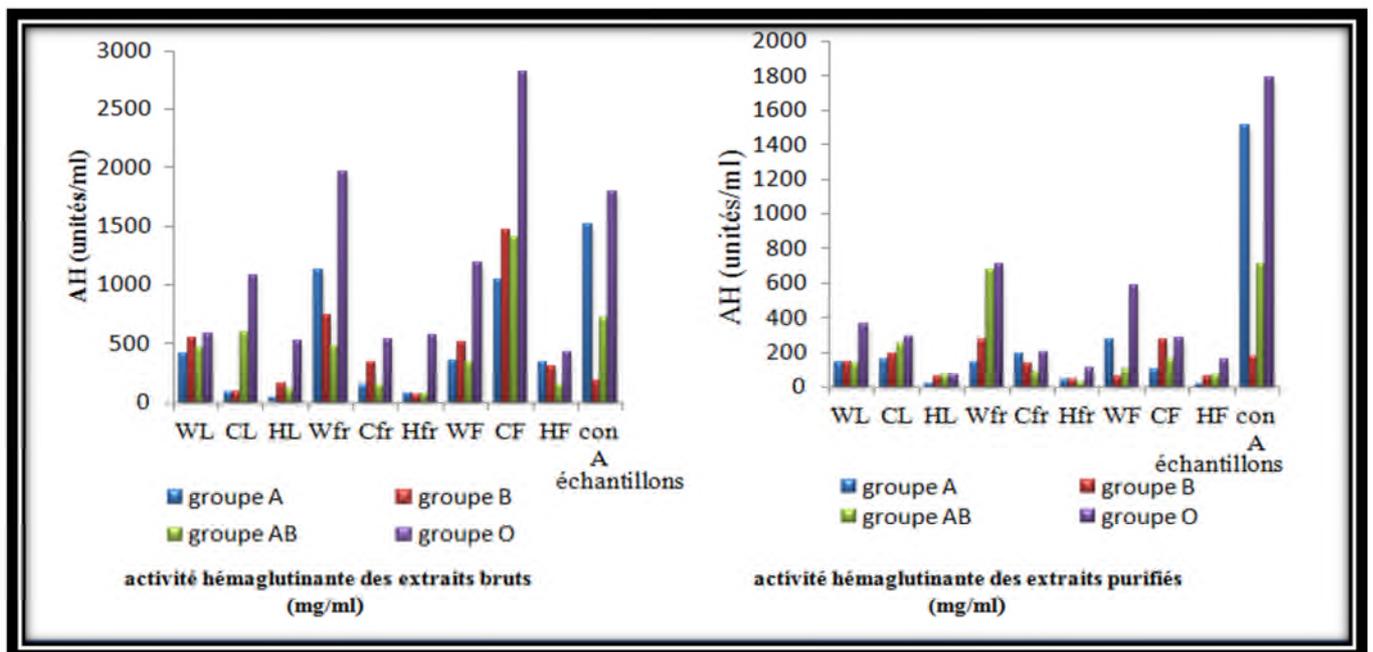


Figure 23: Activité hémagglutinante des extraits bruts et purifiés

Discussion générale

Les lectines sont tenues pour responsable de la toxicité de légumes consommés crus ou mal cuite, et elles sont citées au rang des facteurs antinutritionnels. Dans la perspective d'une exploitation rationnelle de nos graine de légumineuses locales (*Lens culinaris*, *Vicia faba major et minor*), il nous paraît judicieux d'entreprendre et d'approfondir les études antinutritionnelles et notamment leurs lectines et l'évaluation de différents traitements sur leur activité hémagglutinante.

Quand aux techniques d'agglutination que nous avons employées, elles ont été élaborées par Beth Vincent et permettent d'identifier des antigènes à la surface des hématies à l'aide de phytoagglutinines (**Letonturier, 1996**).

Les extraits bruts et purifiés de ces trois graines de légumineuses ont le pouvoir d'agglutiner les érythrocytes des différents groupes sanguins (A, B, AB, O), nous avons mis en évidence la présence de lectines dans les différents extraits. Comme le signifient **Teixina-sa et al (2009)**, ce genre de test est utilisé pour la détection de la présence de lectines dans un échantillon.

Cette activité survient lorsque la lectine se lie à des glucides qui se trouvent à la surface des érythrocytes formant un réseau entre elles. L'intensité de l'agglutination varie en fonction de groupe sanguin et de substrat utilisé.

Nous avons remarqué que pour le même extrait brut et purifié, le groupe O affiche une plus grande réactivité alors que le comportement des hématies des autres groupes varie. Une telle variabilité est observée par différents auteurs. **Machuk et al. (1999)** ont montré une très forte agglutination avec les extraits de lectines *Sphenostyles stenocapa* pour le groupe sanguin O ; les lectines de *Talisia esculenta* préfèrent le groupe sanguin humain AB (**Freire et al., 2002**). Les chercheurs **Machuk et al. (1999)** ; **Freire et al. (2002)** ; **Sarkar et al. (2010)** et **Charungchitrak et al. (2011)** attribuent ces différences entre groupes sanguins à la nature des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et qui ne sont pas totalement reconnues par les lectines utilisés, mettant ainsi en évidence la présence de lectine dans les différents extraits. Les tests d'agglutination (**Teixina-sa et al, 2009**) sont en effet utilisés pour détecter ces substances dans un échantillon.

Nous avons relevé que l'intensité de l'agglutination varie en fonction du groupe sanguin et du substrat végétal utilisé.

Notre étude montre que les extraits de *Lens Culinaris* manifestent une activité hémagglutinante supérieure à celle de *Vicia faba* ; le titre varie de 128 à 256, pour la lentille entière contre 256 à 1024, pour féverole entière et la fève entière. Ces différences interspécifiques sont similaires à celles rapportées par **Pasquet et al. (1987)** ; et **Roy et al, (2010)**. De même **Meite et al. (2008)** notent que

l'AH des extraits bruts de courges (4 à 32) est très faible par rapport à celle des extraits de graines d'haricot (512 à 1024). l'AH des *Phaseolus* est très supérieures à celles des *Vigna* et celle du pois d'angole (**Jaffe ,1980**).

Lens culinaris manifeste une activité hémagglutinante supérieure à celle de *vicia faba*. le titre varie de 256 à 1024 pour la lentille entre 128 à 256.

Le décortiquage des graines s'accompagne d'une élévation du titre des cotylédons de toutes les graines alors que celui des téguments diminue.

Nos données analytiques ont révélé en effet des différences de teneurs en protéine et glucides entre extraits bruts de lectine. la graine entière de *vicia faba* affiche une teneur plus élevée que celle de *lens culinaris* alors que nous notons le contraire pour les cotylédons.

Il en est de même pour les glucides plus présents dans les extraits bruts de fève que de lentille et féverole. Nos résultats montrent une baisse de l'activité des extraits après purification et suggèrent la présence dans les extraits bruts d'autre substance capable d'agglutiner les hématies.

Les graines de légumineuses sont connues pour être riches en composés phénoliques, de tels composés ont été mis en évidence par **Boudjou et al (2012)** travaillant sur les mêmes échantillons utilisés dans le présent travail. les tannins sont localisés essentiellement dans les téguments éliminés par le décortiquage (**Grevier,1999 ;Boudjou et al 2012**). En accord avec **Makkar et al (2007)**. ces composés phénoliques solubilisés par le solvant se retrouvent dans les extraits bruts de lectines et manifesteraient une activité hémagglutinante. nos données pour les graines entières et les extraits purifiés confortent cette hypothèse.

Chungchitrak et al (2010) attribuent ces différences d'activité hémagglutinante à la nature des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et qui ne sont pas totalement reconnues par les lectines utilisées.

Le décortiquage s'accompagne d'une élévation du titre pour toutes les graines quelque soit le groupe sanguin considéré, mais dans les téguments les titres diminuent dans toutes les graines.

Lens Culinaris et *Vicia Faba* sont connues pour leurs richesses en tannins (**Kayci et Melcion , 1992 ; et Yadav et al., 2007**). La présence de tels composés a été mise en évidence par **Tazart (2011)** et **Zatouche (2011)** travaillant sur les mêmes échantillons utilisés dans le présent travail. Les tannins sont localisés essentiellement dans les téguments et éliminés par le décortiquage (**Creveu, 1999**). En accord avec **Makkar et al., (2007)**, les tannins de nos substrats seraient solubilisés par le solvant utilisé (eau physiologique) avec pour conséquence une interaction Tannins-lectine. Les faibles activités des extraits de graines entières par rapport aux graines décortiquées correspondantes sont en accord avec cette hypothèse.

Nous avons utilisé la purification par précipitation différentielle qui donne une solution limpide très concentrée en agglutinine. Les lectines purifiées sont souvent peu stables et doivent généralement être conservées dans les conditions les protégeant de la dégradation. La conservation à basse température est de rigueur. Les protéines particulières ou lectines sont stables sous forme sèche (en poudre), c'est la meilleure façon de les conserver. **(Doumbia, 2004)**.

Le traitement par la trypsine et la papaine des hématies augmente l'activité hémagglutinante des extraits c'est pour cela le traitement des hématies par des enzymes protéolytiques comme, la trypsine et la papaine, a pour rôle de digérer les protéines qui masquent les glucides membranaires avec pour conséquence une amélioration de la réactivité des hématies traitées **(jaffe, 1980)**.

Le traitement thermique modifie l'activité des extraits (bruts et purifiés) de lectines, en accord avec celle de **Henderson et al (1986)** et laissent donc suggérer que les pratiques alimentaires traditionnelles ou modernes des populations contribuent à éliminer les lectines de nos graines étudiées et par conséquent à améliorer leur valeur nutritionnelle.

Nous avons noté une thermoresistance des lectines jusqu'à 45 °C et une thermosensibilité à partir de 60 °C. Des observations similaires sont rapportées par différents auteurs (**Sampaio et al. 1998 ; et Adenike et Ertan, 2003**) travaillant sur diverses sources de lectines (lectines de *Hevea brasiliensis*, lectine *Filicina*) Des baisses d'activités de 20% à 80% sont rapportées par **Dhuna et al. (2005) ; Wong et al. (2006)**, et **Sitohy et al. (2007)**. Les lectines sont de nature protéique et la perte de l'activité hémagglutinante par le chauffage suggère une dénaturation des lectines s'accompagne d'un affaiblissement de l'interaction entre lectines et sucres **(Schwarz et al, 1993)**

Nous avons observés des diminutions du titre de 256 à 64 et dans les extraits purifiés elle diminue de 64-2 pour un pH 2-6, sauf dans le groupe O la diminution du titre de 512-64 pour les extraits bruts. **Tamiza et al. (2007)** rapportent des AH de lectines plus élevés dans la zone à pH neutre que dans la zone de pH acide et basique. **Sitohy et al. (2007)** notent que l'hémagglutination est remarquablement affectée par le pH acide alors qu'elle est maintenue à pH 6 et 9 elle diminue à partir du pH 11 pour tous les extraits bruts et purifiés.

Nous avons enregistré des diminutions des titres des extraits à pH acides (2-5) et maintien de la zone de pH neutre. Des résultats similaires sont rapportés par **Tamiza et al (2007) ; (Loris et al, 1998)**

Les tests d'inhibition par les sucres est utilisé pour montrer qu'ils ont une affinité avec les lectines, ce qui leur permet leur usage dans la détermination des groupes sanguins (Bird, 1974). Et à l'étude des

structures osidiques de la membrane cellulaire, importante pour élucider certain comportement de la cellule (**Hebert,2001**).

Le fucose qui appartient à l'antigène de base des groupes sanguins ou groupe O ; Le galactose caractérise le groupe B (**Nathan,1972**), dans la plupart de nos résultats nous avons constaté que levulose qui est l'isomère de fructose qui a une forte inhibition des lectines par rapport au autre sucre. L'inhibition des extraits par le fructose peut indiquer leur pouvoir à agglutiner les hématies de tous les groupes du système ABO, puisque le fucose est la composante de l'antigène de base des groupes sanguins.

Les différences de comportement des extraits en présence des divers sucres utilisés traduisent les différentes affinités.

Dans des conditions expérimentales, nos données par la méthode spectrales montrent que certains extraits ont une activité hémagglutinante plus élevée que le standard (Con A), comme pour la concanavaline, nous avons enregistré une variabilité des facteurs de groupes sanguins.

Conclusion

CONCLUSION

Nous avons extrait des substances à effet agglutinant sur les hématies que nous appellerons lectines et notre travail montre que les trois graines de légumineuse produite localement (lentille, fève, féverole) renferment des lectines (des protéines à pouvoir hémagglutinant sur les différentes hématies du système ABO humain).les extraits brut et purifié de la lentille affiche une activité hémagglutinante supérieur à celle de vicia faba (entières ou décortiqués)

La purification diminue le degré d'agglutination dans tous les groupes sanguins .

nous avons constaté que les température allant jusqu'à 105°C, élimine l'effet hémagglutinante de lectine.

Le traitement de nos extraits par différents PH, joue un rôle dans le mentient,la diminution ou l'augmentation de l'activité hémagglutinante dans les différents milieu utilisé acide ,base ou milieu neutre.

Nous avons supposé que la réaction d'hémagglutination par les extraits de graines observée et leur inhibition par un sucre simple, témoignent de la présence de lectine dans l'extrait concerné, vus l'inhibition par des oligosaccharides, les lectines de *Lens culinaris* et *Vicia faba*, présenteraient des sites de fixation pour les différents sucres simple utilisés.

Perspective :

Pour bien approfondir cette étude, il sera probable d'élargir le spectre de recherche ,en faisant une études sur les hématies des animaux domestique.

Pour avoir des échantillons de lectine pur, il faut procéder à d'autre technique de purification comme les techniques de chromatographie.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Adresse électronique

ABOVIE sur www.abovie.com

Adenike K , Eretan O.(2003). Purification and partial characterization of a lectin from the fresh Leaves of kalanchoe crenata (Andr.) Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 37, p. 229-233.

Alencar, N.M., Cavalcante, C.F., Vasconcelos, M.P., Leite, K.B., Aragao, K.S., Assreuy,A.M., Nogueira, N.A., Cavada, B.S. and Vale, M.R. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. J Pharm Pharmacol, 57, 919-922.

Aragao A K (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. Université Grenoble I – Joseph fourier.pp40

B

Bird G.(1974).plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte Anomalies. Ann.N.Y.Acard.Sci,234-129

Bonneil, E., Young, N. M., Lis, H., Sharon, N., Thibault, P. (2004); Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the Erythrina genus by mass spectrometry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426, 241-249

Botos I., O'Keefe B. R., Shenoy S. R., Cartner L. K., Ratner D. M., Seeberger P. H., Boyd M. R. et Wlodawer A. (2002). Structures of the complexes of a potent anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 277: 34336-34432.

Boudjou S, Dave Oomah B.,Hosseinian F.,Zaidi.,F (2012) phenolic content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions.*Food chemistry* 138:1543-1550

Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954), Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.

Bradford M .M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding , *Analysis Biochemistry* .Volume 72 .p 248-254.

Bruneton J (1993), Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, édition Technique et documentation Lavoisier, Paris, P1889, 1992

C

Charungchittrak S., Petsom A. , Sangvanich P., Karnchanatat A.(2011) . Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of Archidendron jiringa Nielsen .*Food. Chem* .126: 1025–1032.

Creveiu G. (1999) Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois INRA Production Animale, 12 (2), 147-161

D

DhunaV ,Bains J ., Kamboj S ., Singh J ., Shanmugavel B.(2005). Purification and Characterization of a Lectin from *Arisaema tortuosum* Schott Having in-vitro Anticancer Activity against Human Cancer Cell Lines. *Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 5, pp. 526-532

Doumbia M (2004), Etude de l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne, thèse de pharmacie, FMPOS, Bamako, 85P.

Ε

Edelman G.M. ,Cunningham B.A.,Reeke G.N.,Becher J.W. ,Waxdal M.J.et Wang J.L.(1972).The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A.*proc .Nat.Acad.Sci.*69 :2580-2584.

Etzler M E (1994), Isolement et caractérisation des sous-unités de D B 58, d'une lectine des et feuilles de *Dolichos biflorus*, *Biochimie* 33 : 9778-9783

Φ

Freire M. G. M., Gomes V. M., Corsini R. E., Machado O. L. T., De Simone S. G.,Novello J. C., et al. (2002). Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physi. Bioch.* 40: 61–68

Θ

Gallego del Sol F., Nagano C., Cavada B.S. et Calvete J.J. (2005). The first crystal structure of a mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *J. Mol. Biol.* 353:574-583

Guignard J L, Cosson L, Henri M (1985), Abrégé de phytochimie, édition Masson, Paris, P 66

Guillot, J., Guerry, M., Kanska, G., Caldefie-Chezet, F., De Latour, M. and Penault-Llorca, F. (2004) ; Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, 91, 141-158.

Κ

Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M.H., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L.,Loris, R (1996), The crystallographic structure of phytohemagglutinin L.; *J. Biol.Chem.*, **271**, 20479-20485.

Hardman, K.D. and Ainsworth, C.F. (1972) Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 11, 4910-4919

Hebert E (2001), Lectines membranaires et transduction du signal, médecine/sciences, 17: 486-9.

Hester G., Kaku H., Goldstein I.J. et Wright C.S. (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nature Struct, Biol.* 2 :472-479

Henderson C.W., Scheerens J.C. & Berry J.W.,1986. Antinutritional factors in *Cucurbita* seed meals. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 434-436.

§

Jaffe W.G., 1980. Hemagglutinins (Lectins). In Liener I.E., Eds. *Toxic constituents of plant foodstuffs (second edition)*. New York and London : Academic Press. pp.73-102.

ℵ

Kaysi Y. Melcion J.P.(1992). Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique :exemples d'application à la graine de féverole.*INRA.Prod.Anim.*5(1) :3-17

ℒ

Letonturier (1996), Immunologie générale 5ème édition Masson, Paris, P100

Lis ,H et Sharon,N.(1998).Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition *chem..Rev.*98:637-674

Loris R., HamelryckT ., Bouckaert J, Wyns J (1998).Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta.*Vol: 138. p 9-36.

N

- Machuka J. S., Okeola O. G., Van Damme E. J. M., Chrispeels M. J., Van Leuven F. et Peumans W. J. (1999).** Isolation and partial characterisation of galactose specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochem.* 51 : 721–728 .
- Makela O (1957),** Studies in hemagglutinins of *leguminosae* seeds, *Ann Med Exp.Biol.Suppl*, P 11-35
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P et Becker, K. (2007).** Plant Secondary Metabolites. *Humana Press*. 17-26pp.
- Meite A., Koffi G. K et Offoumou A. M.(2008).**Evaluation de l'activité hémagglutinante des lectines des graines de trois espèces de Cucurbitaceae couramment consommées en Côte d'Ivoire. *Scie. Nat* 5 (2) :199 – 204
- Michael D. Swanson ; Harry C. Winter ; Irwin J. Goldstein ; David M. Markovitz (2010):** *A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication*; *Journal of Biological Chemistry* , vol. 285, n° 12, 8646-8655
- Muduuli, D.S., Marquardt, R.R., Guenter, W. (1981).** Effect of dietary vicine on the productive performance of laying chickens. *Can. J. Anim. Sci.* **61**. 757-764pp.
- Muduuli, D.S., Marquardt, R.R., Guenter, W. (1982).** Effect of dietary vicine and vitamin E supplementation on the productive performance of growing and laying chickens. *Br. J. Nutr.* **47**:53-60.

P

- Pasquet R,Fosto ,M , Noubi L (1987).** Comparaison de la valeur nutritionnel de quelques légumineuses locales a celle des légumineuses introduites ou en voie d'introduction au Cameroun. *revue science technique* .Tome IV. P 57
- Peumans W.J.et Damme .V.J.M. (1995).**Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109, 347-352.
- Pusztai A, Ewen S W B (1999),** Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine , *Lancet* 354(9187) : 1353-1354
- Pusztai A. (1991).** *Plant Lectins*, Cambridge University Press, New York.

R

Renkonen K O (1948), Studies on hemagglutinins present in seeds of some representative of the family of leguminosae, *Ann Med. Exp. Biol. Fenn*, p 26

Roy F.,Boye J.I., Simpson B.K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43, 432–442.

Rutenber, E., Katzin, B.J., Ernst, S., Collins, E.J., Mlsna, D., Ready, M.P. and Robertus J.D. (1991). Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins*. 10: 240-250.

S

Saboia Aragao, K. (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. universite grenobleI joseph fourier.18p

Sampaio, A. H., Rogers, D. S. J. And Barwell, C. J. (1998) Agalactose-specific lectin from red marine alga, *Ptilota filicina*. *Phytochem*. 48, 765-769

Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. and Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a -prism fold. *Nature Struct. Biol.*, 3, 596-603.

Sarkar M. Kawsar A, Rahman Md , Yasumitsu H ,O zeki (2010). Biological Effects of a Carbohydrate-Binding Protein from an Annelid, *Perinereis nuntia* Against Human and Phytopathogenic Microorganisms. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6:1.

Schwarz F., Deep K ., Rama G., Bhat S ., Avadhesh S .(1993). Thermodynamics of Monosaccharide Binding to ConcanavalinA , Pea (*Pisum sativum*) Lectin, and Lentil (*Lens culinaris*) Lectin .*Bio Chy*. p. 7668-7677

Serge D.(1995). Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres ,introduction chimique aux glycosciences,CNRS,Paris,

Sharon N, Lis M (1972), Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins science, P177-949.

Sharon N. (2003) .Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: An atomic view. *Trends Biochem Sci* . 18: 221-226

Sharon, N. and Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.

Sitohy M, Doheim M, Badr H (2007). Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chem*. 104: 971-979

§

Tamiza Y., Tang A., Hossain A., Nurul A .(2007). Effet of Physico-chemical Agent on the Biological activities of the Mulberry Seed lectins .*Biochemistry* 2(2): 111-117.

Tazrart K.(2011).Composés phénoliques et activité antioxydante des extraits de fèves ,feveroles et lentilles.

Teixeira-Sa D., Reicher F., Braga RC., Beltramini LM.et Moreira RA. (2009) . Isolation of a lectin and galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei*. *Phytochem* .70:1965-1972

¶

Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rougé, P. (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.ith diverse biological roles. *Critical Rev. Plant Sci.*, 17, 575-692.

¶

Yadav S.S., McNeil D.L., Stevenson P.C. (2007).in History. Lentil an Ancient Crop for Modern Times. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

W

Wang N ., Daun J .K. (2006) .Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chem* .95 : 493–502.

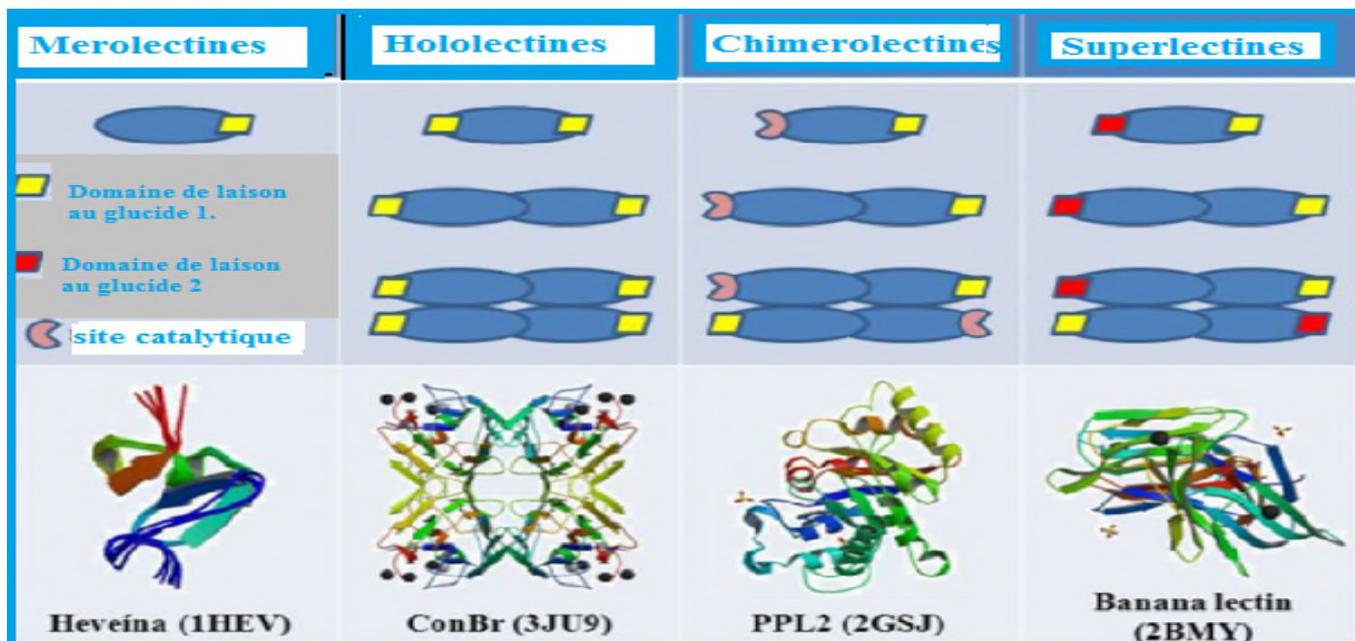
Wright C.S. (1980). Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J .Mol. Biol.* 141: 267-291.

Z

Zatouche A.(2011) *Vicia faba (minor, major), Lens culinaris*. Approche de quelques métabolites secondaires .mémoire de fin de cycle.Béjaia.

Annexes

Annexe N°I: Classification structure des lectines des plantes (Van Damme *et al* 1998).



Eau physiologique

0.9g NaCl
 1000ml d'eau distillée } Stérilisé à l'autoclave.

Réactif du Bradford

50 mg de bleu de Coomassie.

25ml d'éthanol absolu à 95%

50 ml d'acide phosphorique.

Ajuster jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

Remarque : Dissoudre le bleu de Coomassie dans l'éthanol, agiter pendant 1 heure puis ajouter l'acide phosphorique et enfin ajuster avec de l'eau distillée.

Préparation de la BSA dans le tampon acétate :

➤ Préparation du tampon :

11,55 ml d'acide acétique dans un litre d'eau distillée.

27,2 g d'acétate de sodium dans un litre d'eau distillée

Une fois préparé on prend :

14,8 ml de la solution acide acétique } Ajuster jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.
 35,2 ml de l'acétate de sodium }

Tampon phosphate-citrate

Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M (soit 105,06 g de $C_6H_7O_8$, H₂O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na_2HPO_4 sec par litre).

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml.

pH	Na₂HPO₄ à 0,50M	Acide citrique à 0,50M
3,0	16,44 ml	31,78 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml
7,0	65,88 ml	7,06 ml

Tampon Borate

Préparer une solution d'acide borique et de chlorure de potassium 0,20 M (soit 12,41 g de H_3BO_3 sec et 14,91 g de KCl sec par litre) et une solution décarbonatée de soude 0,20 M (8,00 g de soude par litre). Ne pas chauffer l'acide borique au-dessus de 50 °C.

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml

pH	KCl, H₂BO₃ à 0,20 M	NaOH à 0,20 M
9,0	50 ml	21,40 ml

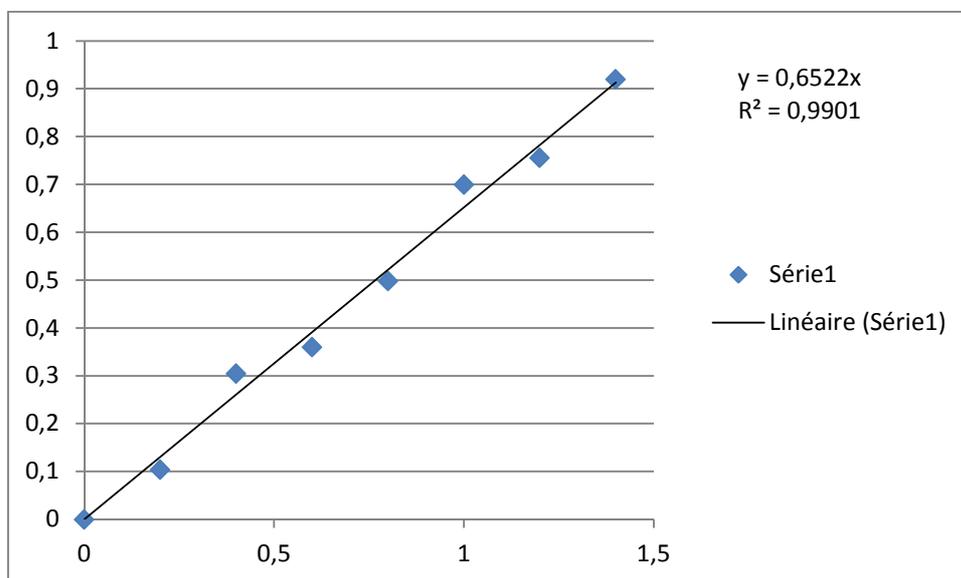
Matériels techniques et produits chimiques utilisés

Matériels technique		
Balance électronique,	Autoclave.	Agitateur de microplaque,
Eprouvettes graduées,	Etuve,	Lame et lamelle,
Compresse à gaze, Coton hydrophile,	Flacons, récupérées, lavées, stérilisées à l'étuve à 100degre pendant 24 h,	Micropipette, Embouts , Pissette en plastique, Vortex.
Entonnoir,	Plaque de groupage,	
Erlenmeyers,	Compte gouttes,	
Moulin électrique,	Porte-tubes,	
Plaque agitatrice, Papier aluminium, Bécher,	Centrifugeuse, Réfrigérateur,	
Spatule,	Seringue, marqueur,	
Tamis,	Etiquette,	
Tubes à essais.	Tube à hémolyse,	

Préparation de l'anthon :

0.1 g de l'anthon dans 100 ml de l'acide sulfurique.

Courbe BSA :



Résumé

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, et la famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèce contenant des lectines végétales.ces dernières possèdent une affinité aux monosaccharides, d'où leur capacité d'agglutiner les érythrocytes avec une spécificité de groupe, ainsi le traitement des hématies avec les enzymes augmente l'activité hémagglutinante.

Ce travail a porté sur la mise en évidence de lectine dans les graines de trois légumineuses produites localement :les lentilles, fève ,féverole et d'évaluer leur réactivité vis-à-vis des différents groupes sanguins du système ABO .

Nos résultats confirment la présence de lectines dans les trois légumineuses, par les tests d'agglutination réalisés. De plus tous les extraits de lectines manifestent une activité hémagglutinante, variable en fonction du substrat .et le groupe sanguin O apparait le plus réactif vis –à-vis des extraits utilisé avec un titre 2048 .

Mot clés :

Légumineuses, lectines, activité hémagglutinante ;les différents traitements.

Abstract:

Lectins are ubiquitous molecules, and the legume family offers the largest number of species containing plant lectins , they have an affinity for monosaccharide, their ability to agglutinate erythrocytes, with a specific blood group.

In this work we focused on the identification of lectins in the seeds of three locally produced legumes : lentils, beans and evaluate their reactivity against the different ABO blood group system.

Our results affirm the presence of lectin in our three legumes, by agglutination tests performed, and all the extracts exhibit a lectin hemagglutinating activity, which varies depending on the substrate, the blood type O is the most reactive against the extracts used, with a title 2048.

Keywords:

Legumes, lectin ,haemagglutinating activity,different treatment used.

Dédicace

Ce modeste travail

Est dédié à toutes les personnes que j'aime :

À mes très chers parents, qui se sont sacrifiés pour

M'offrir un climat idéal de travail et qui n'ont jamais cessé de

Me témoigner leur affection et de m'apporter leur soutien

Depuis toujours, je leur serai toujours reconnaissante pour leurs encouragements et leurs investissements, consentis dans un seul but : ma réussite.

Ma très chère grande mère qui est digne

De ma gratitude et de mon estime.

À mes frères : Lotfi , yanis

À mes très chères sœurs : Rima, maya .

À ma meilleure amie : karima

Et sans oublier ma belle famille .

Un grand merci pour mon amour Brahim de m'avoir soutenue durant tout mon cursus universitaire et pour réalisé ce modeste travail.

Ainsi que toute la promotion de Biochimie Appliquée.

Liste des abréviations

A : Nombre de dilution de tube ayant une absorbance proche à E50

Ea : Absorbance de tube A

Eb : Absorbance de tube B (ayant une absorbance plus que E50)

E50 : Moitié de l'absorbance du control

ABS : Absorbance

BSA : Buffer solution albumine

CON A : Concanavaline A

GALNAC : Gluconeuramique acid

KDA : Kilo dalton

Nm : Nanomètre

TP : Tampon phosphate

Ug : microgram

FAO : Food et Agriculture .Org.

WL : whole lens culinaris

CL: Cotyledon lens culinaris

HL: Hool lens culinaris

WF: Whole faba been major

HF: Hool faba been major

WFR: Whole faba bean minor

CFR: Cotylédon faba bean minor

HFR: Hool faba bean minor

Elisa: Enzyme linked imunoabsorbent assay

Liste des figures

Figure 1 : la structure de quelque lectines de plante.....	2
Figure 2 : les classes de lectines selon le nombre de chaine polypeptidique.....	4
Figure 3 : Représentation graphique de quelque structure de lectine.....	6
Figure 4 : Quelque structure chimique de sucre simple de la membrane cellulaire et de lectine végétales.....	8
Figure 5 : Mécanisme d'action des lectines.....	9
Figure 6 : Représentation schématique d'interaction lectines –glucides.....	10
Figure 7 : protocole d'extraction des lectines.....	14
Figure 8 : Méthode de purification avec sulfate d'ammonium.....	14
Figure 9 : protocole de dosage des protéines.....	15
Figure 10 : protocole de dosage des sucres.....	16
Figure 11 : méthode de préparation des hématies.....	16
Figure 12 : Test d'héماغglutination sur microplaque.....	17
Figure 13 : préparation des suspensions sanguines.....	20
Figure 14 : grilles des tests visuelles.....	22
Figure 15 : Teneurs en protéine des extraits bruts et purifié.....	26
Figure 16 : teneur en glucide des extraits bruts et purifié.....	27
Figure 17 : Effet du traitement des hématies par la trypsine et papaine.....	27
Figure 18 : effet du traitement des extraits bruts et purifiés T°	29
Figure 19 : effet du traitement des extraits bruts et purifié avec pH.....	30
Figure 20 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhiber l'AH de lentille.....	31
Figure 21 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhiber AH de fève.....	33
Figure 22 : concentration minimale des sucres utilisé pour inhibé l'AH féverole.....	34
Figure 23 : Activité héماغglutinante des extraits bruts et purifié par la methose spectrale.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : classification des lectines selon le nombre de domaine de liaison aux glucides.....	5
Tableau II : Exemples de propriétés biologiques de lectines et des applications qui en résultent.....	9
Tableau III : les lectines spécifiques aux groupes sanguins les plus connus.....	10
Tableau IV : Représentation schématique d'interaction lectines-glucides.....	11
Tableau V : Lectines utilisé pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie.....	12
Tableau VI : Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectines.....	13
Tableau VII : les resultats d'agglutination des neufs extraits bruts et purifiés.....	23
Tableau VIII : les titres de différents extraits bruts et purifié.....	25

Sommaire

Sommaire

Chapitre I :généralité sur les lectines

I-les lectines.....	1
I-1- Historique.....	1
I-2- Origine terminologique.....	1
I-2-1- Définition.....	1
I-2-1-1- la structure des lectines.....	1
I-3-Comparaison des anticorps anti-sucres et des lectines.....	2
I-4- Description de quelque lectines connues.....	3
I-4-1-viscine et conviscine.....	3

Chapitre II :Classification des lectines

II-1- la classification de lectine de plante.....	4
II-1-1-Le nombre de chaine polypeptidique.....	4
II-1-1-1- Mérolectine.....	4
II-1-1-2-Hololectine.....	4
II-1-1-3-Chimérolectines.....	4
II-2-la topologie.....	5
II-2-1-les lectines simples.....	5
II-2-2- les lectine en mosaïque.....	6
II-2-3-Les assemblages macromoléculaires.....	6

Chapitre III : Spécificité et affinité des lectines

III-1-la spécificité et affinité via à vis les glucides.....	7
III-1-1-les lectines qui reconnaissent les monosaccharides.....	7
III-1-2- les lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifique.....	7
III-2- Les propriétés des lectines.....	8
III-3- Les groupes sanguins et les lectines.....	10
III-4-Interaction lectine-glucide.....	10

Chapitre IV :proprété et intérêt des lectines

IV-Intérêt des lectines pour l'homme.....	10
IV-Propriétés et application des lectines.....	10

Chapitre V : Matériel et Méthodes

V-1-Matériel.....	13
V-1-1-Matériel végétal.....	13
V-1-2-Matériel sanguin.....	13
V-2-Méthode.....	13
V-2-1- Extraction des lectines.....	13
V-2-2-Purification des lectines par le sulfate d'ammonium.....	14
V-3- les dosages.....	15
V-3-1- Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés.....	15
V-3-2-Dosage des sucres des extraits bruts et purifiés.....	15
V-4- Test d'agglutination.....	15
V-4-1-Préparation des hématies.....	16
V-4-2- Test d'agglutination visuel.....	16
V-4-3- Détermination des titres des différents extraits bruts et purifiés.....	17
V-5- Traitement des hématies avec la papaïne et la trypsine.....	17
V-6- Effet de différent traitement sur l'activité hémagglutinante.....	18
V-6-1- Effet de la température.....	18
V-6-2-Effet de Ph.....	18
V-7- Test d'inhibition par les sucres.....	18
V-7-1- Principe.....	18
V-7-2- Technique.....	18
V-8- Méthode spectrale.....	19
V-8-1- Préparation de la suspension des hématies.....	19
V-8-2-Détermination de l'activité hémagglutinante.....	20
V-8-3-Calcul de l'activité hémagglutinante.....	20

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI-Résultats et discussion.....	21
VI-1-Résultats.....	21
VI-1-1- Activité hémagglutinante des lectines.....	21
VI-1-2-Détermination des titres.....	24
VI-1-3-Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés.....	26
VI-1-4-Teneur en glucide des extraits bruts et purifiés.....	27
VI-1-5- Effet du traitement des hématies avec la trypsine et papaine.....	28
VI-1-6- Effet de la température sur l'activité hémagglutinante.....	29
VI-1-7-Effet du pH sur l'activité hémagglutinante.....	30
VI-1-8- test d'inhibition par les sucres.....	32
VI-1-9-Mesure de l'activité hemagglutinante par la méthode spectrale.....	36
VI-2-Discussion générale.....	37
Conclusion et perspectives.....	41
Annexes	
Références bibliographiques	

Introduction

Introduction

Les lectines sont des protéines d'origine animale ou végétale, capables de se fixer de façon spécifique et réversible aux résidus osidiques des membranes cellulaires sans pour autant exercer une activité enzymatique (**Bruneton, 1993**).

Notons que la toute première description des lectines fut faite en 1888 par Stillmark dans un rapport soumis à l'université de Dorpat en Estonie. En effet, il mit en évidence l'activité agglutinante de la lectine du *Ricinus communis* sur des hématies humaines (**Sharon, 1972**). A partir de ce moment, de nombreux travaux furent consacrés aux lectines. Ainsi, en 1919, James mit au point la purification des lectines à partir de la concanavaline A ; elles facilitent ainsi leur usage dans le domaine de la recherche. Ce n'est qu'en 1945 que Boyd et Reguera parvinrent à déterminer la spécificité des lectines à pouvoir agglutiner les globules rouges sanguins. (**Sharon, 1972**).

Les lectines des plantes sont des protéines possédant au moins un domaine non catalytique de liaison réversible à des mono-ou oligosaccharides spécifiques. Elles peuvent se classer en trois groupes selon le nombre de domaines liaison aux sucres et la présence ou non d'une activité catalytique spécifique (**Abovie .com2004**)

La plupart des lectines des végétaux supérieurs sont localisés dans la graine : elles se forment au cours de la maturation et disparaissent au cours de la germination. Elles sont surtout fréquentes chez les FABACEAE (arachide, soja, lentille, canavalia, haricot etc.). (**Bruneton ,1993**). La famille des Légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales (**Makela .1954**) .

Cette étude traite les différents traitement sur l'activité hémagglutinante des lectines de trois légumineuses locale (lens culinaris , vicia faba minor et major).

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'évaluation de l'activité hémagglutinante des différents extraits (bruts et purifiés) avec identification des score d'agglutination, puis aux différents traitements (température, pH, trypsine et papaïne) et les différent test d'inhibition utilisé avec les différents sucres.

Chapitres I :Généralité sur les lectines

I-Les lectines

I-1- Historique

A l'origine, le terme lectine dérivé du mot latin *legere* (qui veut dire « sélectionner »), faisait référence à la propriété de certaines protéines d'agglutiner sélectivement les hématies humaines (**Boyd et Shapleigh 1954**).

Les lectines ont été découvertes pour la première fois par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui rapporte que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon and Lis 2004**) depuis lors, beaucoup de travaux furent consacrés aux lectines (**Roken, 1948**).

En 1954, Boyd et Shapleigh ont démontré la propriété de ces protéines à agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and Shapleigh 1954**). Les lectines deviennent alors des outils scientifiques pour l'investigation des sites de fixations spécifiques et un modèle pour l'étude des réactions d'agglutinations (**Gold et Balding, 1975**). Elles permettent les études structurales des polymères de carbohydrates et mucopolysaccharides et des réactifs spécifiques pour l'isolement de ces substances.

I-2-Définition

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon 1998**). Ce sont des molécules ubiquitaires, qui se retrouvent dans toutes les classes d'organismes : chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués.

I-3- Structure des lectines

Il existe une grande variété de lectines avec une très grande diversité structurale. La première structure cristalline d'une lectine à être déterminée par diffraction des rayons X fut la concanavaline A (**Edelman 1972; Hardman 1972**).

Les lectines de plante qui appartiennent à une même famille taxonomique (légumineuses, céréales, etc.) montrent une homologie de séquence/structure remarquable (**Van Damme 1998**). Les lectines de légumineuses adoptent toutes une structure typique appelée « β jelly roll » ou « lectin fold » formée par deux feuillets β superposés. Les lectines de céréales sont très différentes et sont caractérisées par la présence de domaines structuraux très riches en cystéine qui sont appelés domaine hévéine (du nom d'une petite protéine de 43 acides aminés extraite de l'hévéa). La première structure cristallographique déterminée dans cette famille est la lectine de germe de grain de blé WG (Fig 3-a),

spécifique pour les oligosaccharides à NeuAc ou à GlcNAc (**Wright 1980**). La ricine, ainsi qu'un grand nombre de toxines végétales, est constituée d'une lectine en trèfle (ricine B) associée à une toxine (ricine A) , (Fig 3-b) (**Rutenber 1991**). La famille de la lectine de perce neige (**Hester, Kaku et al. 1995**) ainsi que la famille de la jacaline (Fig 3-c) (**Sankaranarayanan 1996**) adoptent toutes deux des repliements protéiques de **type prisme β qui peuvent former une grande variété d'oligomères** (**Gallego del Sol et al., 2005**).

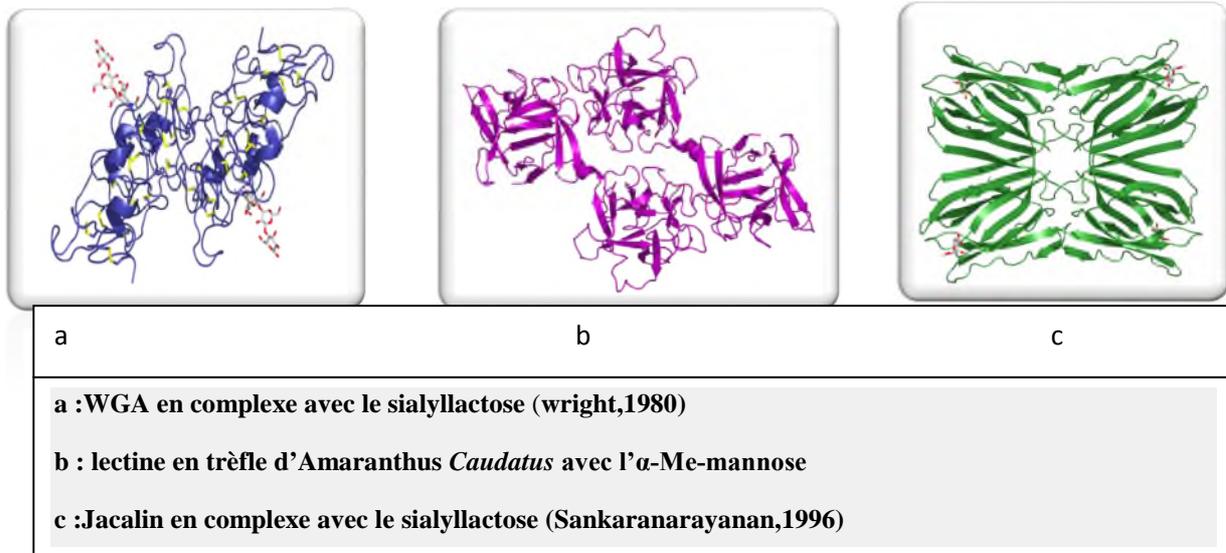


Figure 1 : La structure de quelques lectines de plante

I -4-Comparaison des anticorps anti-sucre et des lectines

Les lectines et anticorps sont des protéines (ou glycoprotéines) possédant plusieurs sites d'association réversible sur leur molécule, qui en font des réactifs de réticulation réversible. Donc avec les deux familles de molécule, on observe l'association avec des mono- et oligosaccharides, la précipitation des macromolécules polysaccharidiques et glycoprotéines avec dissolution des précipités en présence d'un excès de polysaccharides, et enfin l'agglutination de cellules. Précipitation et agglutination sont une conséquence de la multivalence des deux réactifs opposés et sont inhibées en présence du ligand mono- ou oligosaccharidique spécifique. Les immunoglobulines sont construites sur un modèle uniforme ou par association de molécules bâties selon ce même modèle, tandis qu'il semble qu'il y ait une grande variété de structure dans les lectines. Dans le modèle de base des immunoglobulines, les deux sites de reconnaissance sont solidaires de deux demi-molécules identiques liées entre elles par des ponts disulfures. En revanche, la lectine est une association de

sous-unités qui peuvent comporter ou ne pas comporter de site de reconnaissance et sont liées de façon non covalente. (Serge David ,1995)

I-5- Description de quelques lectines connues :

L'abrine et la ricine :

Sont des lectines à activité hémagglutinante extraites respectivement de l'arbre à chapelet et du ricine, reconnues pour leur toxicité. Elles sont constituées de deux fragments protéiques :

- **une chaîne A** : incapable de franchir les membranes cellulaires, inhibiteur de la synthèse des protéines ;

- **une chaîne B** : non cytotoxique, assurant la reconnaissance des sucres membranaires et la fixation de la lectine sur le récepteur pour faciliter la translocation de l'unité A à travers la membrane (Bruneton, 1987).

La phasine phytoagglutinine provenant du haricot et spécifique aux hématies du groupe A est constituée de deux dimères canoniques rattachés par des liaisons bêta (Hamelryck, 1996).

Viscine et convicine :

Sont des glycosides constitués d'une molécule de glucose liée à un radicale diviscine (pour la viscine) et iso-uramyl (pour la convicine). Leur présence dans les aliments se traduit surtout chez les pondeuses par une réduction de poids moyen de l'œuf et une baisse de l'intensité de ponte (Muduli et al1981), Cette activité est limitée par la présence de la vitamine E et A. ou de chélateurs de fer. (Muduli et al 1982)

Chapitres II : Classification des lectines

II-La classification des lectines de plantes

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

II-1-Le nombre de chaîne polypeptidique :

Trois classes (figure2) sont distinguées :

a-Mérolectines : Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seule domaine de liaison aux glucides

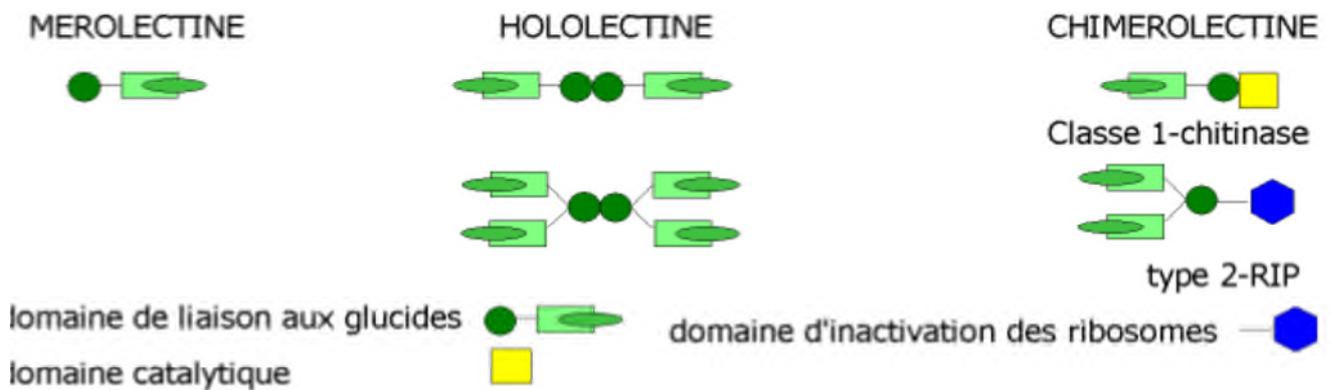
Elles sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules. **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

b-Les hololectines : elles contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi-identiques, ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glucoconjugués ou agglutiner les cellules. La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines. **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

c-Les chimérolectines : Les chimérolectines possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip Ribosome Inactivating Protéine :Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine). **.(PeumansW.J.et Van Damme.,1995)**

Tableau I: Classification des lectines selon le nombre de domaine de liaison aux glucides **Van Damme et al.,(1998).**

Classe de lectines	caractéristiques
Mérolectines	Ce sont des protéines ayant un domaine de liaison aux glucides simples. Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.
Hololectines	Comportant toutes les lectines ayant des emplacements de liaison aux glucides di ou polyvalent.
Chimerolectines	Ce sont des protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimerolectines se conduisent comme des mérolectines ou comme des hololectines.
Superlectines	C'est une classe qui possède également au moins deux domaines de liaison aux glucides, mais différent des hololectines par le fait que leurs emplacements peuvent reconnaître des sucres structurellement indépendants.



D'après PEUMANS W.J. et V. DAMME J.M., 1995.

-Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109, pp 347-352.

Figure 2 : Les classes de lectines selon le nombre de chaîne polypeptidiques

II-2-La topologie :

Selon la base de leurs structure, les lectines se subdivisent en 3 classes (figure 3)

II-2-1- Les lectines simples :

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (figure 3-a) qui ne sont pas forcément identiques, et dont la masse moléculaire généralement n'excède pas en général 40 kDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines, une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose.

II-2-2-- Les lectines en mosaïque :

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (figure 3-b).

II-2-3- Les assemblages macromoléculaires :

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

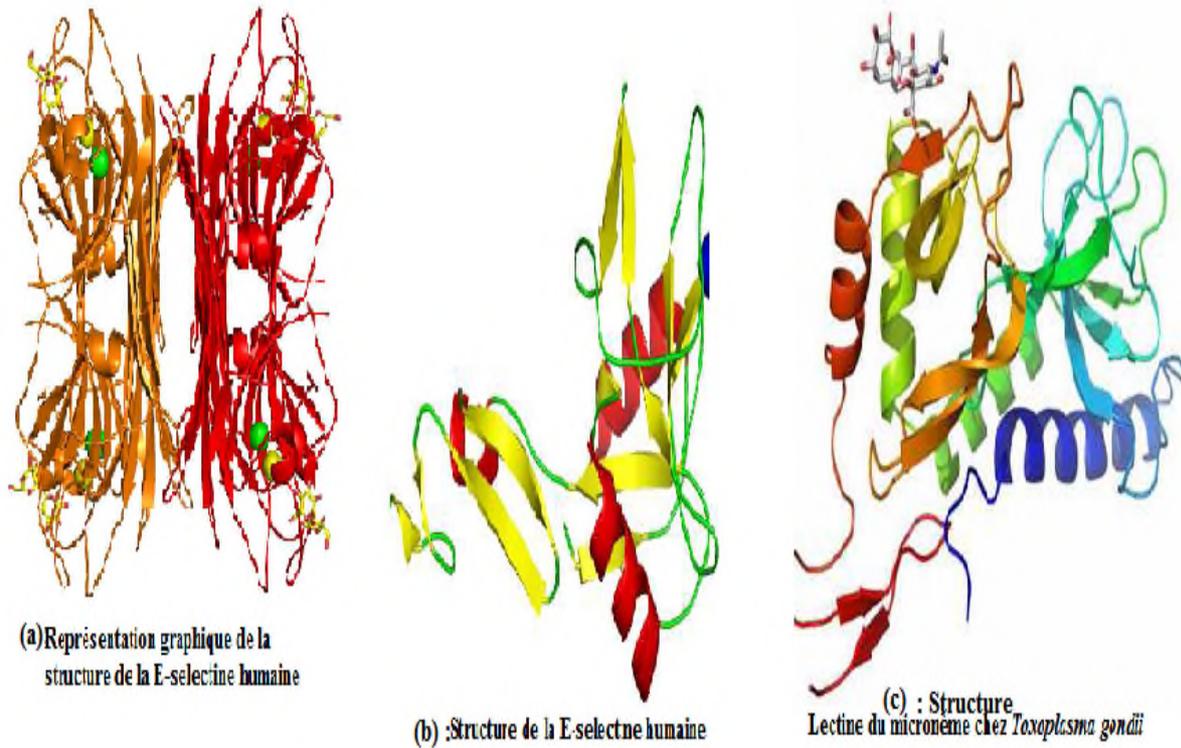


Figure N°3 : Représentation graphique de quelques structures de lectines (Aragao ,2008)

Chapitre III :Spécificité et affinité des lectines

III- Spécificité et affinité des lectines

III- 1-spécificité et affinité vis-à-vis les glucides

Il est intéressant de noter que la plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres , Dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. Deux classes de lectines par rapport à leur spécificité celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon 2003**).

III-1-1-Les lectines qui reconnaissent les monosaccharides

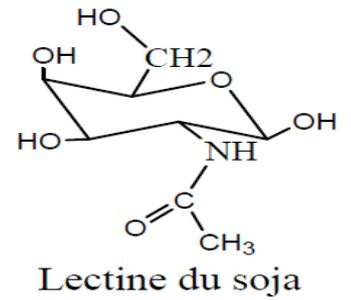
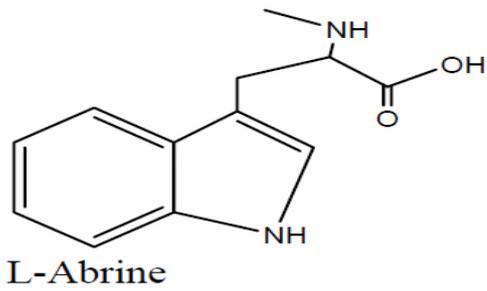
Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnus par les lectines se retrouvent le mannose reconnu par la lectine de *Allium sativum* ; *Canavalia ensiformis*, *vicia faba* ...etc ,le fucose reconnu par les lectines de *Aleuria aurantia* ; *Anguilla anguilla* ; *Lotus tetragonolobus* ...etc. le galactose/GalNA reconnu par les lectines de *Arachis hypogaea* ; *Coprinus cinereus* ; *Entamoeba histolytica*...etc (**Sharon 2003**)

III-1-2- Les lectines qui reconnaissent les oligosaccharides spécifiques

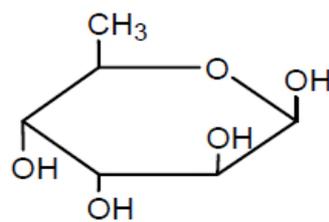
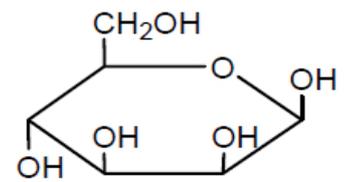
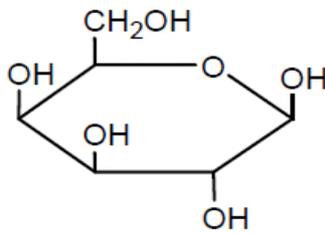
La cyanovirine-N reconnaît des glycannes de type oligomannose tels que la glycoprotéine gp120 du virus VIH (**Botos 2002**) ou la toxine de choléra qui est spécifique pour le GM1 présent sur la surface de cellules épithéliales .

L'affinité montrée pour les oligosaccharides est généralement beaucoup plus élevée que pour les monosaccharides par la présence de sites de liaison plus profonds formant plus de contacts avec le ligand.

▪ Lectines



sucres



L-Fucose

Figure 4: Quelques structures chimiques de sucres simples de la membrane cellulaire et de lectine végétales.(Doumbia,2004)

III-2- Propriétés de lectines

- Les lectines sont des protéines hydrosolubles retrouvées surtout dans les graines des légumineuses (**Etzer, 1994**)
- Elles ressemblent à des glycoprotéines de la membrane des cellules végétales et se comportent comme des anticorps en assurant un rôle défensif contre les bactéries et les champignons (**Guignard.J et al, 1985**).
- Ce sont des substances thermolabiles, responsables de la toxicité de certaines plantes : ricin, jéquirity, haricot ... (**Bruneton, 1993**).
- Elles sont aussi reconnues pour leur spécificité aux sucres, ce qui a permis leur usage dans la détermination des groupes sanguins (**Bird, 1974**), (Tableau II) et à l'étude des structures osidiques de la membrane cellulaire, importantes pour élucider certains comportements de la cellule (**Hebert, 2001**).

Tableau II : Exemples de propriétés biologiques des lectines et des applications qui en résultent (d'après Lis et Sharon, 2003)

Propriétés	Application
Induction de la mitose	- Etude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	- Isolement, purification et études structurales des glucides. - Purification des glycoconjugués (enzymes, hormones). - Modèles pour la réaction antigène-anticorps (test ELISA, etc)
Liaison aux sucres	- Etudes des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. - Structure et fonctionnement des membranes.
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	- Typage du sang. - Identification de nouveaux groupes sanguins.

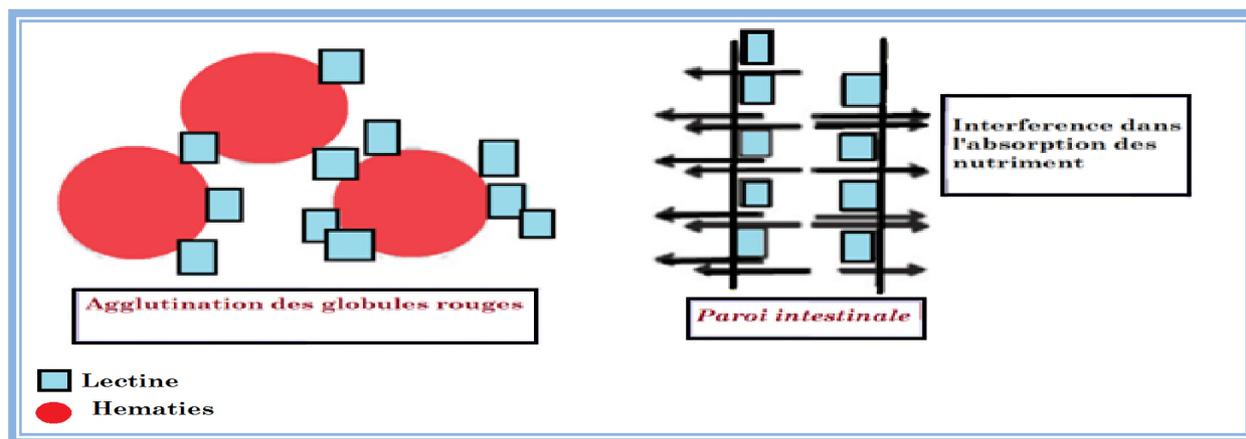


Figure 5 : Mécanisme d'action des lectines.(Makkar et al.,2007)

III-3- Les groupes sanguins et les lectines

Bird (1974) note que plusieurs lectines agglutinent les hématies, et relève une spécificité de groupe Sanguin .

Bien qu'aujourd'hui, les anticorps monoclonaux aient remplacé les lectines dans la détermination des groupes sanguins, leur usage est encore nécessaire (Pusztai et Ewen, 1999).

La spécificité des lectines aux groupes sanguins est présentée dans le tableau III(Doumbia, 2004).

Tableau III: Les lectines spécifiques aux groupes sanguins les plus connus

<i>Spécificités</i>	<i>Source de la lectine</i>	<i>Noms</i>
<i>Anti-A</i>	<i>Plante</i>	<i>Phaseolus limensis</i>
<i>Anti-B</i>	<i>Seaweed</i>	<i>Petita plumosa</i>
<i>Anti-AB</i>	<i>Plante</i>	<i>Crotalaria Striata</i>
<i>Anti-H</i>	<i>Plante</i>	<i>Lotus tetragonolobus</i>
<i>Anti-M</i>	<i>Plante</i>	<i>Iberis amaras</i>
<i>Anti-N</i>	<i>Plante</i>	<i>Vicia graminea</i>

III-4-Interaction lectines-glucides

Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (Varki 1993). Les interactions protéine/glucide sont

impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. La Figure 6 donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.

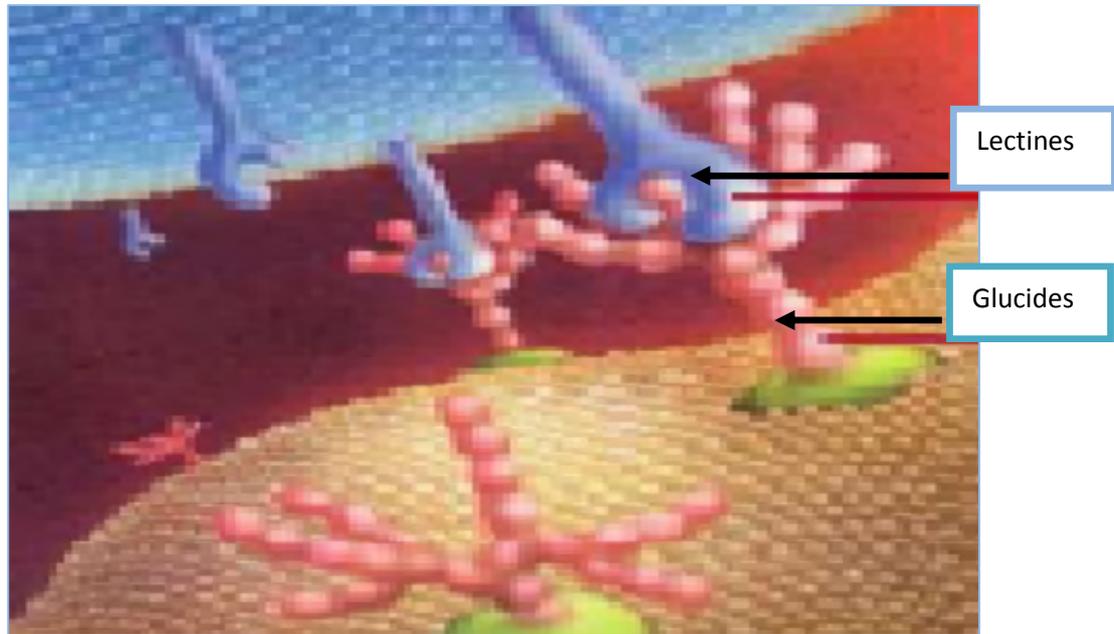


Figure N°6: Représentation schématique d'interaction lectines-glucides (Aragaro, 2008).

Chapitre IV : Propriété et intérêt des lectines

IV-Intérêt des lectines pour l'Homme

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

- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Shapleigh 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.
- Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar, et al. 2005**).
- Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot, et al. 2004**), **Tableau IV**.

Tableau IV– Principaux glycanes associés au cancer (**Guillot, et al. 2004**).

Non de l'antigène	Séquence glycanique
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Tn	SA α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
T	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Le α	SA α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1-4 Fuc
Le ^x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Sialyl- Le ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1-2 α 1-3 Fuc Fuc
N-acétyllactosamine	Gal β 1-4GlcNAc

Le Tableau V décrit les principales lectines isolées de plantes ou d'invertébrés qui sont employées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie ou, plus généralement, en histopathologie. Les lectines sont utilisées en fonction des structures glycaniques associées aux états pathologiques (**Guillot, et al. 2004**). De par leur spécificité, les lectines se lient préférentiellement à un

monosaccharide soit situé au bout de la chaîne soit placé dans une position non terminale des oligosaccharides complexes.

Tableau V: Lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	<i>Lycopersicum esculentum</i>	D-GlcNAc
PWL	<i>Phytolacca americana</i>	D-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare (wheat germ)</i>	D-GlcNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	D-GlcNAc
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β -
GSI-B4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	D-Gal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	D-GalNAc
LBL	<i>Phaseolus lunatus (Lima bean)</i>	D-GalNAc

Tableau VI: Récapitulatif des structures tridimensionnelles de lectine

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

*Matériels et
méthodes*

But de travail :

Le travail porte sur l'évaluation de l'activité hémagglutinante d'extraits bruts et purifiés de lectines de trois graines de légumineuses (lentilles, fèves, féverole) et leurs différentes parties (cotylédons et téguments) sur les différents groupes d'hématies du sang humain, et l'étude de l'effet de différents traitements sur les lectines (température, pH) et sur les hématies (par la papaïne et la trypsine) sur leur activité hémagglutinante.

V-1-Matériel**V-1-1-Matériel végétal :**

Nos travaux ont été effectués sur 3 graines produites localement :

- Lentille (a) « *Lens culinaris* » : Provenant de la station ITGC de Sétif.
- Fève (b) « *Vicia faba major* » ou fève proprement dite, récoltée dans la zone de Remila-Béjaia.
- Féverole (c) « *Vicia faba minor* » : Originaire de Merdj Ouaman Amizour-Béjaia.

Des graines de chacune des espèces ont été décortiquées pour séparer les téguments et cotylédon, des différentes parties (entière, décortiqué et tégument) broyées et tamisées pour l'obtention d'une poudre sur laquelle nous avons travaillé.

V-1-2-Le Matériel sanguin :

Nous avons utilisé du sang humain, provenant du centre de transfusion sanguin (CTS) de Bejaia ; et comportant les 4 groupes A B AB O (RH+)

V-2-Méthodes**V-2-1-Extraction des lectines**

L'extraction des lectines est réalisée par macération à l'eau physiologique (figure 7) selon la méthode décrite par **Doumbia (2004)**.

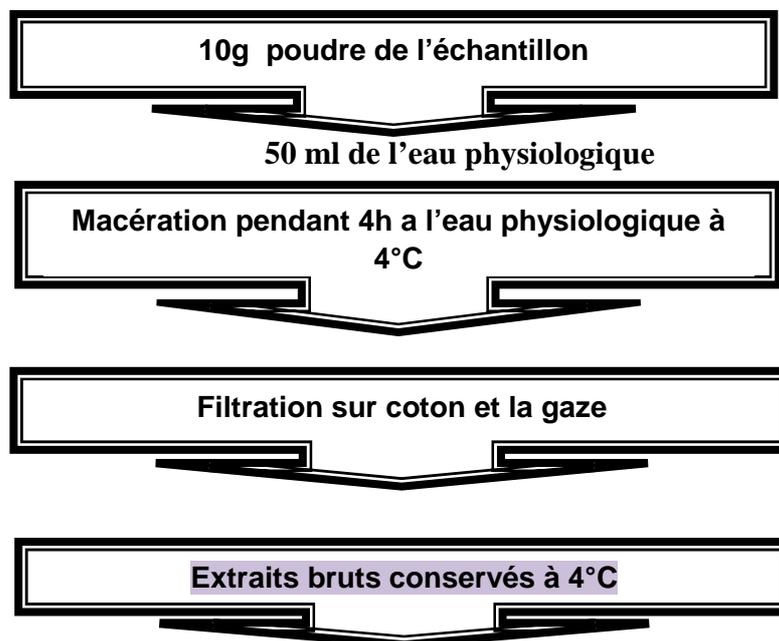


Figure 7: Protocole d'extraction des lectines (Dombia, 2004).

V-2-2- Purification des lectines au sulfate d'ammonium :

La purification a été effectuée sur les différents extraits bruts de légumineuses, selon la méthode de Meite et al 2008 , les différentes étapes sont résumées par la figure 8.

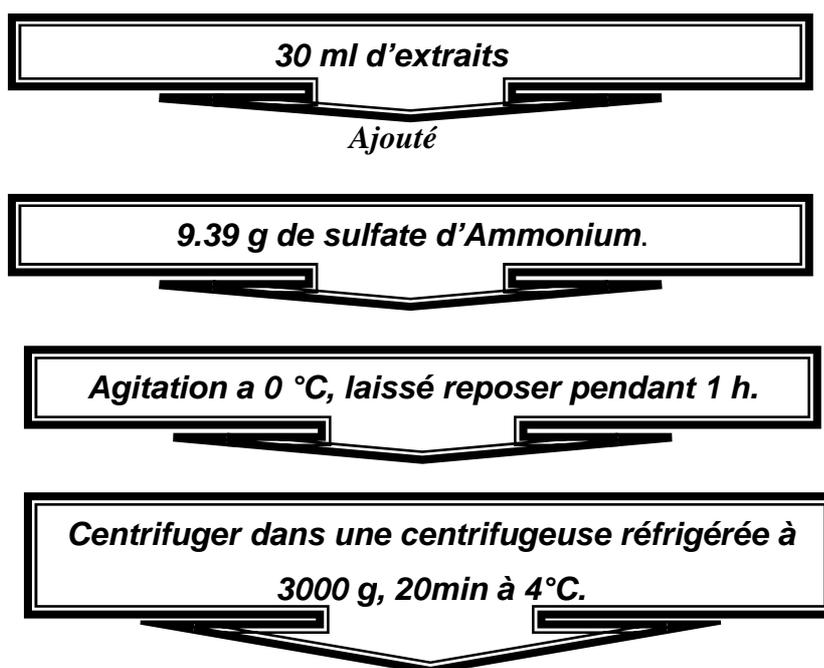


Figure 8: Méthode de purification avec du sulfate d'ammonium (Meite et al,2008).

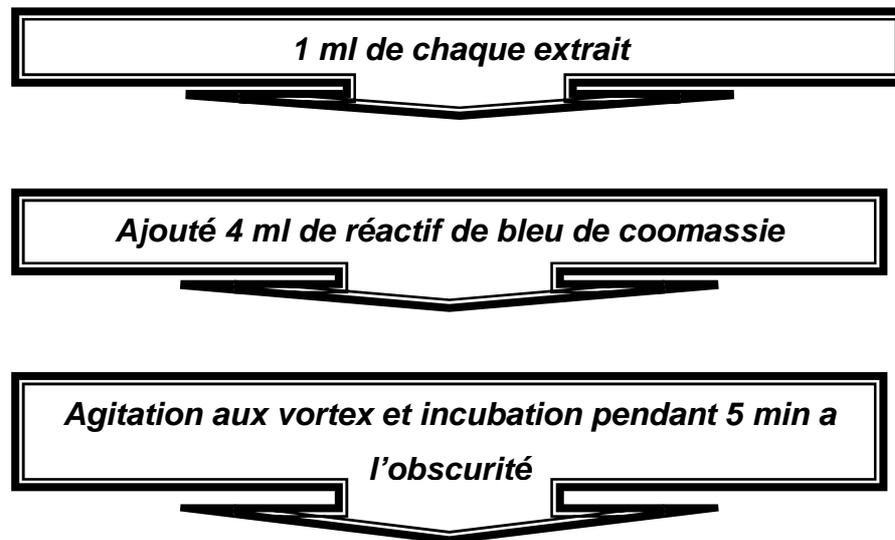
V-3-Les dosages

V- 3-1-Dosage des protéines des extraits bruts et purifiés de lectines

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

Les concentrations sont déterminées par référence à une gamme étalon à base de BSA, dont la concentration varie de 0 à 1400 µg, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.(annexe)

Mode opératoire :



Lecture de l'absorbance

à 595 nm

Figure N° 9 : Protocole expérimentale de dosage des protéines des différents extraits des lectines (**Bradford ,1976**)

V-3- 2-Dosage des glucides :

Les teneurs en glucides dans les extraits bruts et purifiés de lectines sont déterminées par la méthode décrite par **Dubois et al (1956)** :

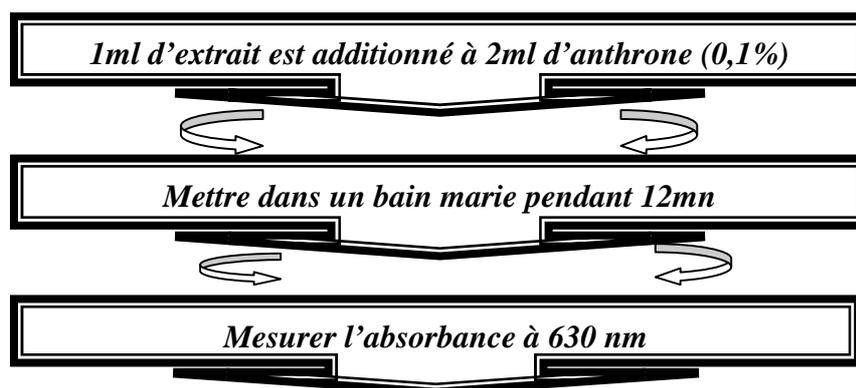


Figure 10 : Dosage des glucides

Les concentrations sont déterminées par référence à une gamme étalon à base de glucose, dont la concentration varie de 0 à 1400 µg, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.(annexe 1)

V-4-Tests d'agglutination :

V-4-1-Préparation des hématies :

La préparation de la suspension des hématies est illustrée par le schéma suivant « **figure 11** »

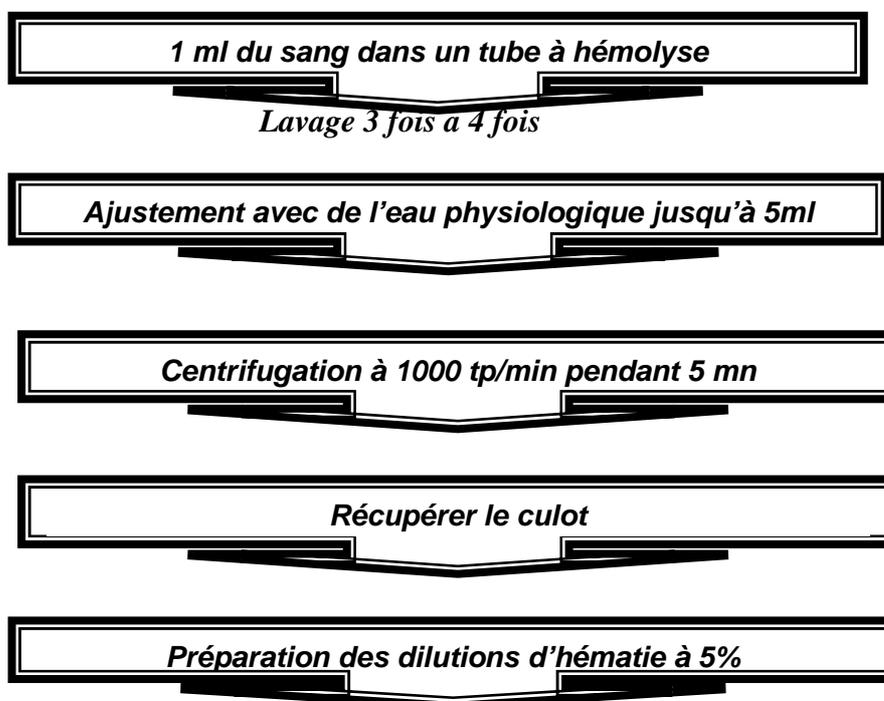


Figure 11: Préparation des hématies (Doumbia,2004)

V-4-2-Tests d'agglutinations visuelles :

Le test est réalisé selon le protocole décrit par **Doumbia (2004)**.

A une goutte d'extrait de chacun de nos échantillons placé sur une plaque propre, un volume équivalent de la suspension des érythrocytes à tester est ajouté, et l'ensemble est homogénéisé en remuant la plaque doucement et continuellement. Nous avons effectué la lecture à l'œil nu après 8 à 10 mn. Nous avons effectué une lecture au microscope optique pour tous les tests négatifs.

V-4-3 Détermination des titres des différents extraits de lectine.**Mode opératoire**

L'activité hémagglutinante est exprimée par le titre. Ce dernier qui est la réciproque du plus grand rapport de dilution pour lequel une hémagglutination est observée. (**Gartner et Podleski , 1975**).

Exemple : Si 1/1024 est le plus grand rapport de dilution pour lequel une hémagglutination est observée le titre équivaut à 1024.

L'activité hémagglutinante des lectines est déterminée par la méthode de double dilution sérielle de **Jaff et al.(1972)**. Un volume de 50 μ l de chaque extrait (extrait brut) est dilué en série avec 50 μ l d'eau physiologique (chaque dilution en série réduit la concentration de l'extrait de moitié) ; 50 μ l de solution mère ou diluée sont mélangés à un volume égal de suspension d'hématie à 4% dans des puits d'une microplaque. Cette dernière est homogénéisée sur un agitateur pendant 5 min à la température ambiante. L'activité hémagglutinante des lectines est déterminée après estimation visuelle de l'hémagglutination après 30 mn. La concanavaline a été utilisée comme lectine standard.

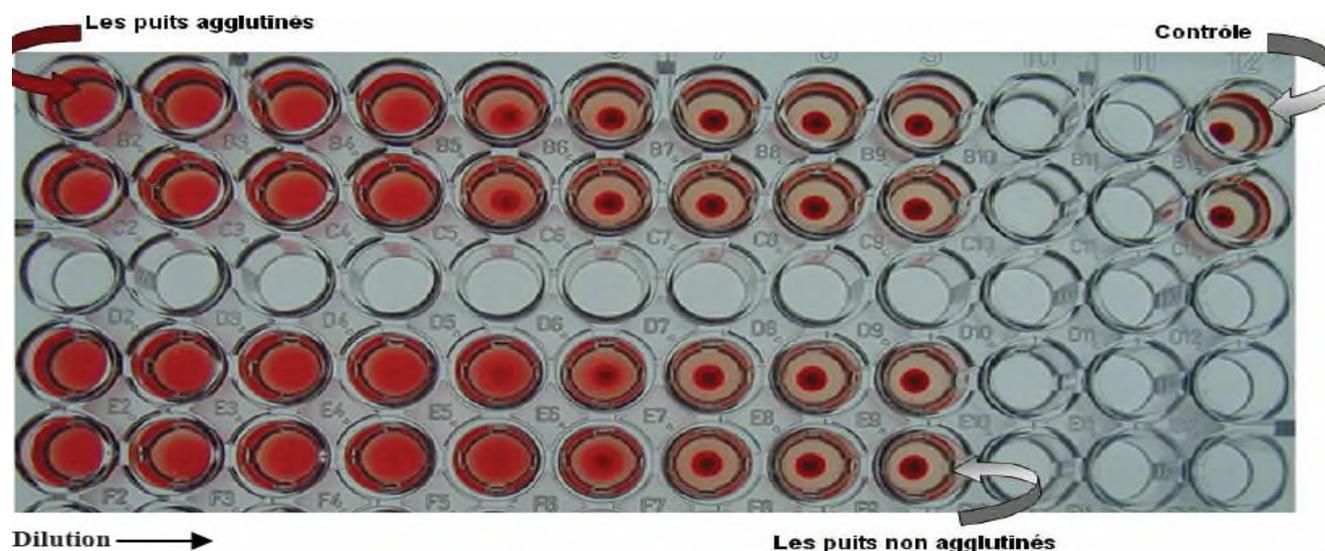


Figure 12: Test d'hémagglutination sur microplaque

V-5-Traitement des hématies avec la papaïne et la trypsine :

Une aliquote de suspension d'hématies de 4% a été préparée .le traitement enzymatique est effectué selon la méthode de *Jaff et al (1972)*.les mélanges trypsine-hématies et papaïne-hématies (0.1mg de trypsine ou de papaïne/10ml de suspension d'hématies) sont incubés à 25°C pendant une heure puis centrifugé à 4000 trs/min pendant 10 min. Les culots obtenus sont dilués avec du tampon, afin d'obtenir une suspension d'hématie à (4% traitée a la trypsine ou la papaïne).

V-6-Effets des différents traitements sur l'activité hémagglutinante des lectines

V- 6-1 -Effet de la température

Nous avons utilisé la méthode décrite par *Sampaio et al. (1998)*.Les extraits (bruts ou purifiés) de lectines (3ml) sont incubés à l'étuve à différentes températures (30°C ,45°C ,60°C ,75°C ,90°C, 105°C) pendant 30 minutes. A l'issu de cette incubation, les extraits sont rapidement refroidis (dans de la glace) et conservés au réfrigérateur (4°C).

Les activités hémagglutinantes des lectines traitées sont comparés aux lectines non traités (température ambiante 22°C) .

V-6-2-Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante des lectines est déterminé selon la méthode décrite par *Adenike et Eretan (2003)*. Les extraits des lectines (bruts ou purifiés) ont été incubés pendant 30 minutes à différents pH (2-4-6 et 7) (tampon phosphate citrate 0,2M) ,pH 9 (tampon borate) et PH 11, Les tubes témoins sont incubés dans de l'eau physiologique.

L'activité hémagglutinante des extraits traités est déterminée après ajustement de leurs pH à 7.

V-7-Test d'inhibition par les sucres :

Nous avons utilisé les sucres suivants : Glucose, lactose, galactose, maltose, mannose, melibiose, saccharose, levulose.

V-7-1-Principe :

C'est une inhibition des réactions d'agglutination des hématies, exercée par un sucre en fonction de son affinité à se lier aux phytoagglutinines.

V-7-2-Technique :

Les tests d'inhibition de l'activité hemagglutinante induite par différents sucres sont réalisés de manière analogue aux tests d'agglutination (méthode des titres sur microplaque) .une série de double dilution des sucres à été préparé dans une solution saline, toutes ces dilutions ont été mixées avec un volume égal (25µl) d'extraits de lectines (bruts et purifié). le mélange est laissé reposer pendant 30 min à température ambiante ,puis une suspension d'hématies(5 %) de différents groupes a été rajoutée.la concentration minimale des sucres dans le mélange réactionnel final qui complètement inhibé l'agglutination des lectines a été déterminée.(Wang et al,2000)

V-8-La méthode spectrale (mesure de l'activité hémagglutinante) :

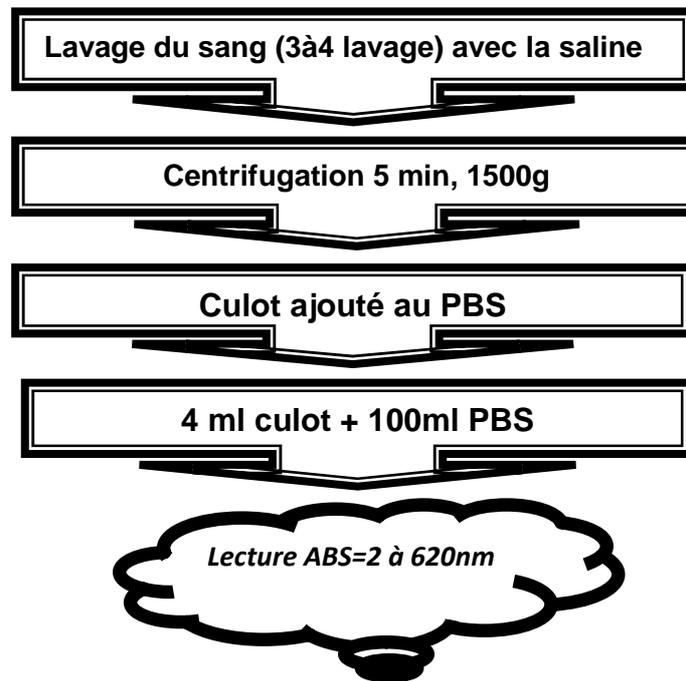
Nous avons utilisé la méthode décrite par (Makkar,2007)

Mode Opérateur :

Nous avons préparé les différentes solutions qui sont : la solution saline, PBS, Alsevers solution, anticoagulant, la trypsine a 1% et la solution de la concanavaleine A.

V-8-1-Préparation de la suspension sanguine :

1ère étape :



2eme étape :

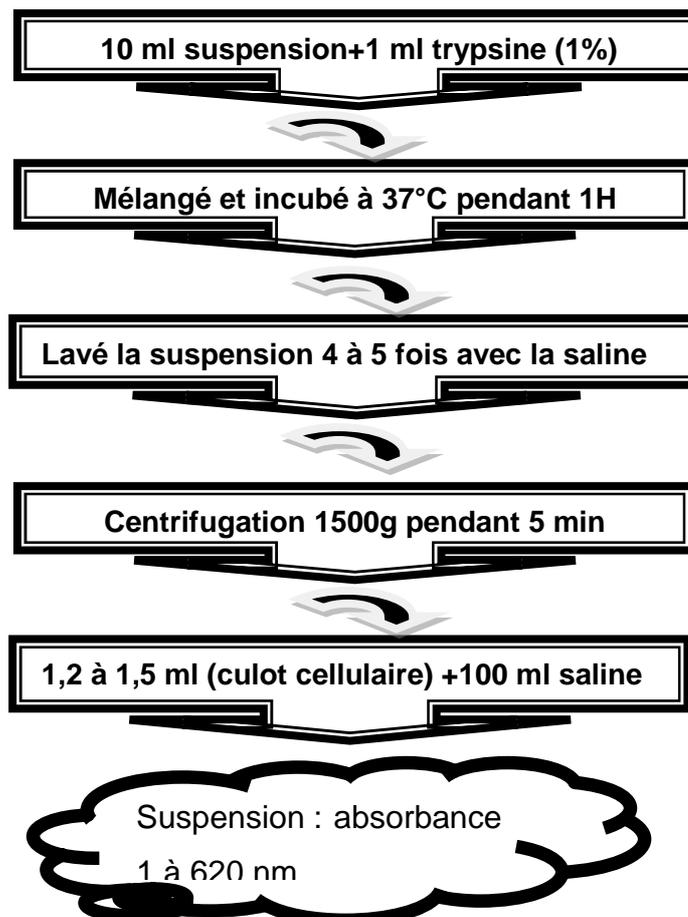


Figure 13: préparation de la suspension sanguine

V-8-2-Détermination de l'activité hémagglutinante :

Dans des cuvettes en plastique, nous avons mis 1 ml d'extrait (dans la première cuve) et nous avons préparé une série de double dilution (dilution avec PBS). Dans chaque cuve nous avons ajouté 1 ml de la suspension des érythrocytes. Nous avons maintenu les cuvettes en position verticale pour une durée de deux heures et demie à température ambiante. Lecture de l'absorbance à 520 nm

Chaque série de cuvettes doivent avoir 2 à 4 cuvettes de control contient 1 ml PBS + 1ml suspension.

V-8-3-Calcul de l'activité hémagglutinante :

L'Activité hémagglutinante est exprimée en unités arbitraires. Le nombre d'unités égal au nombre de dilutions provoquant une diminution de 50% de l'absorbance de la suspension d'érythrocyte pendant deux heures et demi dans les conditions décrite ci-dessus. Ce nombre de dilution (x) est calculé en mesurant l'absorbance des deux cuvettes plus proche à la moitié de l'absorbance du control (E50). L'une des lectures (Ea) étant plus faible et l'autre (Eb) étant plus élevée que E50. L'équation suivante est alors utilisée :

$$\text{Log } x = \log A + \log 2 (E50 - Ea) (Eb - Ea)$$

Résultats et discussion

VI-Résultats et discussion

VI-1-Résultats

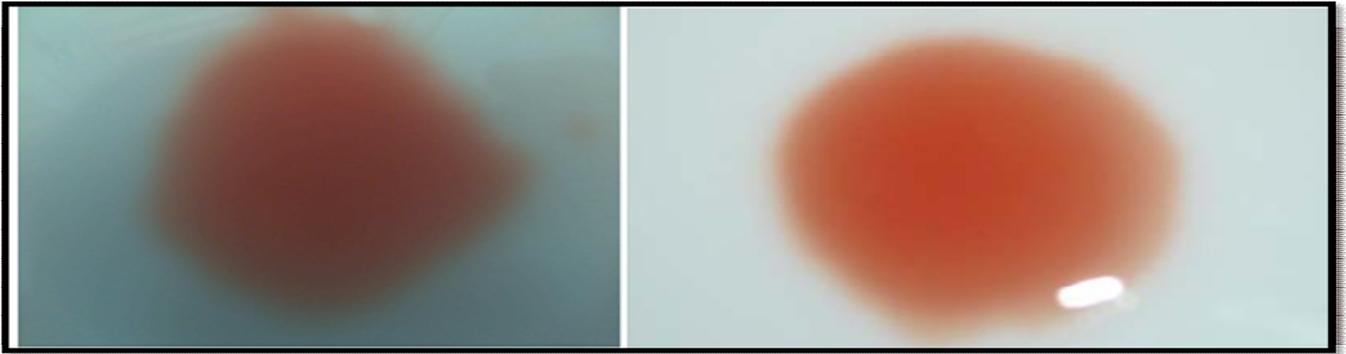
VI-1-1-Activité hémagglutinante des lectines

Nous avons élaboré au moyen de tests préliminaires une grille d'évaluation de l'activité hémagglutinante.(figure14)

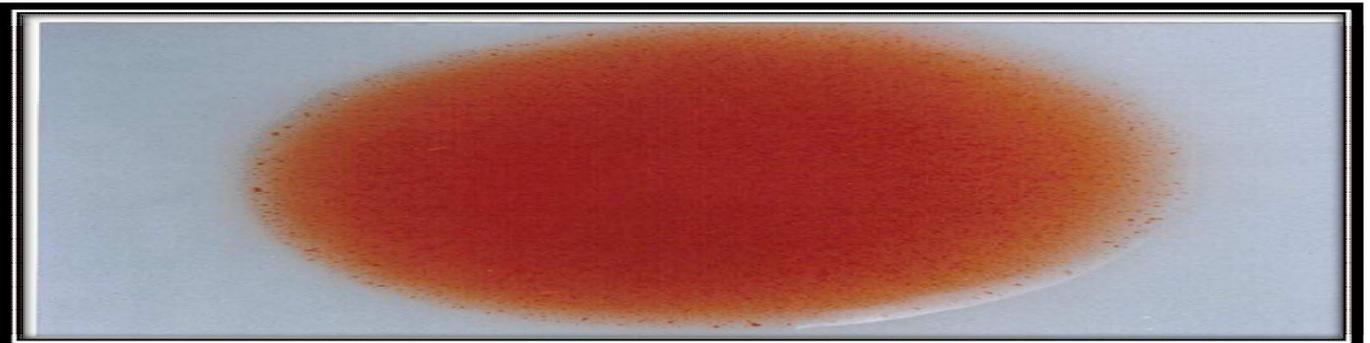
Cette dernière nous a permis de noter cinq niveaux d'activités hémagglutinantes :

- (-) Absence d'agglutination
- (+) très Faible agglutination
- (++) Faible agglutinantion
- (+++) *Forte agglutination*
- (++++) *Très forte agglutination*

Nos résultats montrent que tous les extraits manifestent une activité hémagglutinante décelable, à l'œil nu (Tableau VII)



+ Très Faible Agglutination



++ Faible agglutination



+++ Forte Agglutination



++++ Très forte Agglutination

Figure 14 : grilles des tests visuels

Tableau VII : Les résultats d'agglutination des neufs extraits bruts et purifiés

	A	B	AB	O
Lentille (b)	+++	+++	+++	++++
Lentille (p)	++	++	++	+++
Cotylédon lentille(b)	++++	++++	++++	++++
Cotyédon lentille (p)	+++	+++	+++	+++
Tégument lentille(b)	+	+	+	+
Tégument lentille (p)	+	+	+	+
Fève entière(b)	+++	+++	+++	+++
Fève entière (p)	++	++	++	++
Cotylédon de la fève(b)	+++	+++	+++	+++
Cotylédon de la fève (p)	++	++	++	++
Tégument fève (b)	+	+	+	+
Tégument fève (p)	+	+	+	+
Féverole(b)	++	++	+++	+++
Féverole (p)	+	+	++	++
Cotylédon féverol(b)	++++	++++	++++	++++
Cotylédon feverol(p)	+++	+++	++	++
Tégument féverole(b)	++	+	++	+++
Tégument féverole(p)	+	+	+	+

L'activité hémagglutinante de différents extraits bruts et purifiés dépend du substrat végétal utilisé et du groupe sanguin auxquels il est appliqué.

Globalement, nos données révèlent une plus grande activité hémagglutinante des extraits bruts vis-à-vis les différents groupes sanguin par rapport à l'activité obtenu avec les extraits purifiés.

Les extraits bruts et purifiés des lentilles entières présentent une forte agglutination comparativement aux extraits des deux autres légumineuses utilisés (fève et féverole entière).

Les hématies du groupe sanguin O manifestent une plus grande réactivité vis-à-vis des différents extraits de lectine (bruts et purifiés).Les groupes sanguins A ,B et AB montrent une réactivité comparable pour les différents extraits.

L'effet du décortilage sur l'activité hémagglutinante dépend de la graine considérés et du groupe sanguin utilisé .Pour les groupe A B AB et O, nous relevons une élévation de l'activité des extraits après décortilage des graines de lentille et féverole alors que pour la fève aucun changement n'est observé.

Une très faible agglutination des extraits bruts et purifiés des téguments de ces trois légumineuses a été observé, seuls les extraits bruts des téguments de la féverole manifestent , une plus forte agglutination sur les hématies du groupe O.

VI-1-2-Détermination des titres :

Les tests d'hémagglutination des différents extraits utilisés à différentes concentrations , nous ont permis de déterminer le titre de chacun de nos extraits avant et après purification (**Tableau VIII**). Les titres des différents extraits varient en fonction de la graine étudiée et ces différentes parties (cotylédon et tégument), et le groupe sanguin.ils varient de 16 à 2048.

Tableau VIII : les titres de différents extraits bruts et purifiés

échantillon	Groupes sanguin			
	A	B	AB	O
WL BRUTE	256	256	256	1024
WL purifier	64	32	32	64
CL brute	512	512	512	2048
CL purifier	64	64	64	128
HL brute	128	128	128	256
HL purifier	16	16	16	16
WF brute	128	128	128	256
WFpurifier	64	32	32	64
CF brute	256	256	256	512
CF purifier	64	64	64	128
HF brute	64	64	64	128
HF purifier	32	32	32	64
WFR brute	128	128	128	256
WFRpurifier	64	64	64	128
CFR brute	256	256	256	512
CFRpurifier	128	128	128	256
HFR brute	64	64	64	128
HFRpurifier	16	16	16	64

Les titres présentés par les extraits bruts sont nettement plus élevés que ceux observés par les extraits purifiés. L'activité hémagglutinante des extraits diminue de 50 à 93.75%

Après purification Les extraits bruts de lentille entière affichent les titres les plus élevés pour tous les 4 groupes sanguins. Dans le cas des extraits purifiés, c'est l'extrait de féverole entière qui montre le titre le plus élevé sur les hématies du groupe O.

Les titres les plus marqués sont notés sur les hématies du groupe O, Le décorticage s'accompagne d'une élévation du titre pour tous les extraits bruts et purifiés quel que soit le groupe sanguin

considéré :dans le cas des extraits de la lentille et féverole (bruts et purifiés) ce titre est multiplié par 2 à 4 quelque soit le groupes sanguin.

VI-1-3-Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés :

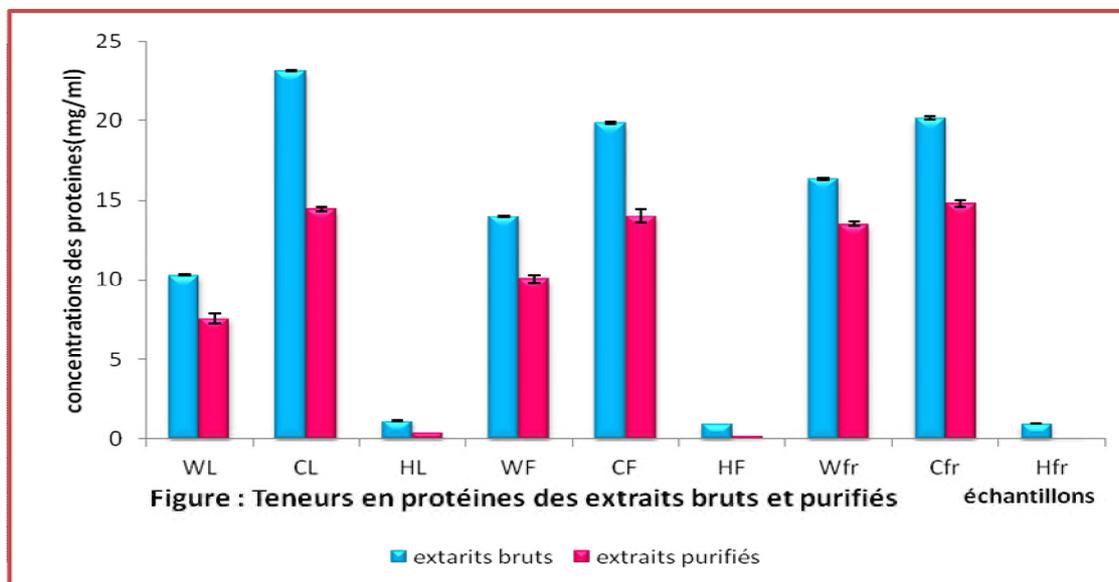


Figure 15: Teneur en protéine des extraits bruts et purifiés

Nos données analytiques (figure 15) révèlent la variabilité de la teneur en protéine des différents extraits. L'analyse de la variance met en évidence les effets significatifs ($p < 0.05$) de chacun des facteurs mis en jeu.

Les extraits de légumineuses entières de fève et féverole affichent des teneurs en protéines ($14,00 \pm 0,06$, $16,37 \pm 0,06$) plus élevées que celle de *Lens culinaris* ($10,30 \pm 0,03$) ; ce classement est modifié par le décorticage au profit de cette dernière graine. Ce sont les téguments qui fournissent des extraits de lectine le moins pourvus en protéines (0.91 à 1.15).

La purification s'accompagne d'une réduction de teneurs en protéines des extraits allant de 17.4 à 87.33%, quelque soit la graine considérée nous notons que les cotylédons présentent les plus fortes teneurs en protéines (26.52 à 37.52 %).

VI-1-4-Teneur en sucres des extraits brut et purifier :

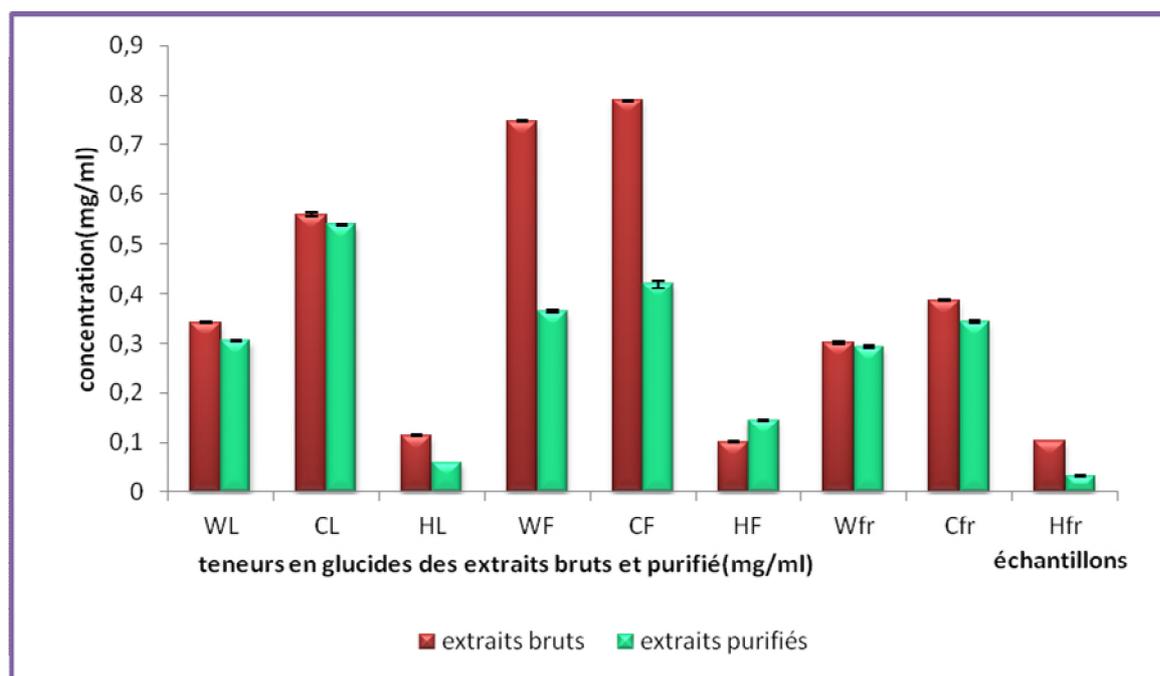


Figure 16: Teneurs en glucides des extraits bruts et purifiés

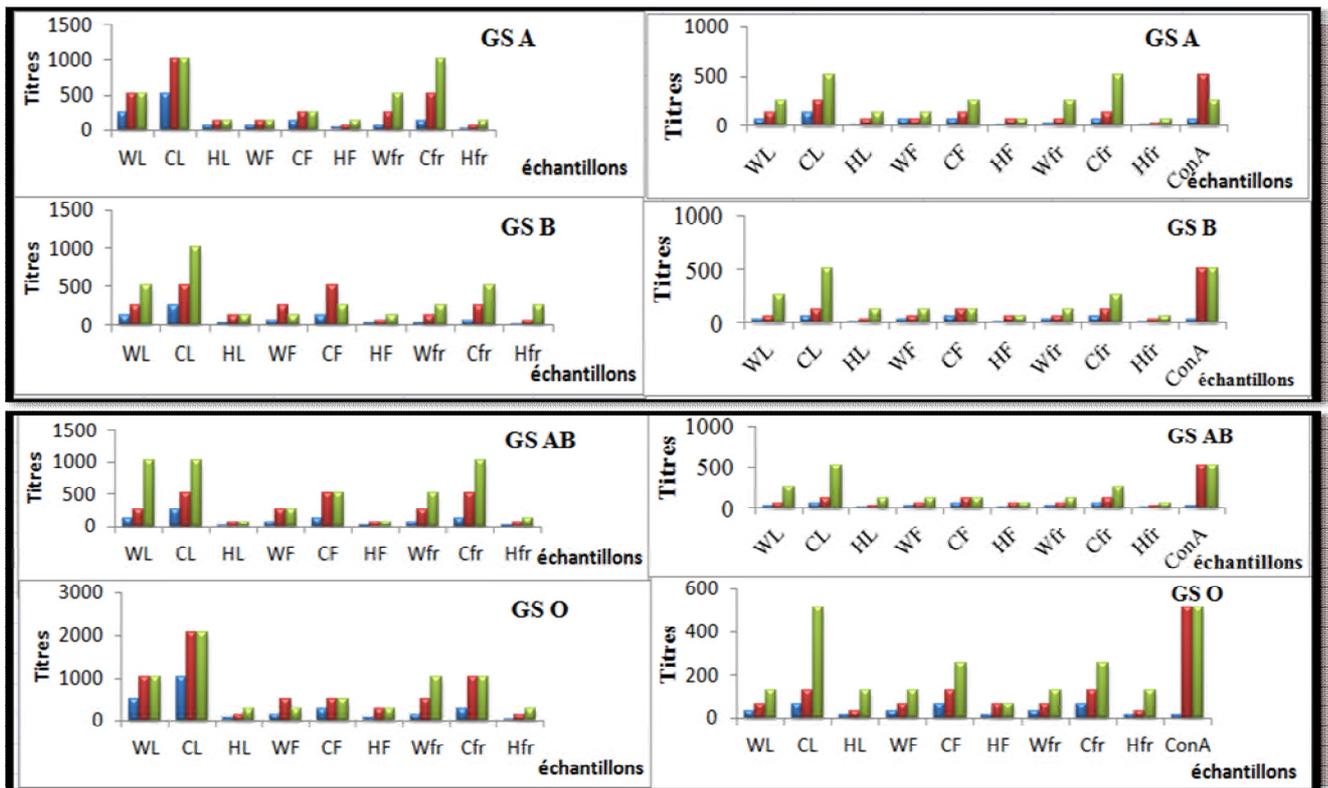
Les données analytiques montrent une variabilité de teneur en glucides des différents extraits de lectine.

Nous notons que les extraits bruts de fève (entière ou cotylédon) sont les plus riches en glucide (0,75 et 0,79) comparativement à ceux de lentille (0,34 et 0,56) et féverole (0,30 et 0,39).

Les teneurs des extraits s'accompagnent aussi bien d'une baisse de leur teneur en glucide que du classement des extraits. Ces baisses de teneurs en glucides sont particulièrement variables pour la fève entière ou décortiquée (46,7 à 51,2 % contre 2,9 à 10,9 pour les autres graines entières ou décortiquées) et les téguments varient entre (46,7 à 68,5 %).

VI-1-5-Effet de traitement des hématies avec la trypsine et la papaïne :

Nous notons globalement que le traitement préalable d'hématies par la papaïne s'accompagne d'une élévation de l'activité hématagglutinante de nos extraits. Cette augmentation est supérieure à celle enregistrée avec la trypsine. Ce phénomène est notamment marqué avec les différents extraits purifiés.



■ hématies non traité ■ hématies traité à la trypsine ■ hématies traité à la papaine

Figure 17: Effet du traitement des hématies avec la trypsine et papaine

VI-1-6-Effet de la température sur l'activité hémagglutinante des extraits bruts et purifiés :

La variation de l'activité hemagglutinante des extraits avec l'élévation de la température le traitement définit deux phases (figure 19).

La première phase est caractérisée par une thermorésistance des extraits, l'activité hémagglutinante est préservée jusqu'à 45°C pour tout les extraits bruts et purifiés (*Vicia faba Major* *Lens culinaris* et *Vicia faba Minor*) ce dernier présente toute fois les téguments et cotylédons de la fève et cotylédon féverole ne maintiennent leur thermorésistance que jusqu'à 30 °C (figure 10) ,puis ils présentent une diminution significative à 45°C.

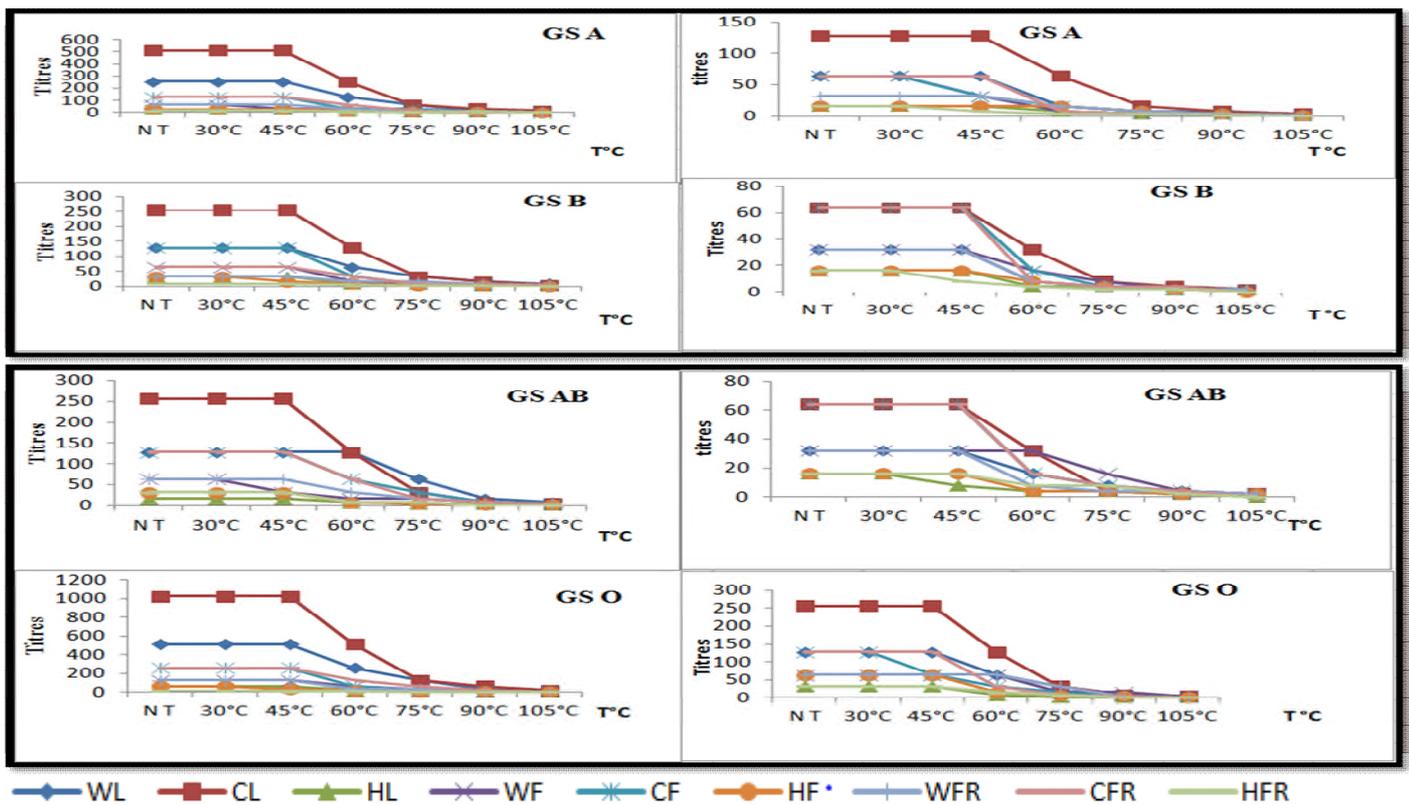


Figure 18: Effets du traitement des extraits avec les différentes températures.

La deuxième phase est caractérisée par une thermo-sensibilité des extraits allant jusqu'à l'inhibition totale de l'activité pour une température de 105°C., au cours de cette deuxième phase, la perte d'activité est d'abord (de 45° à 75 °C) puis elle diminue de façon progressive.

VI-1-7-Effet du ph sur l'activité hemagglutinante des extraits bruts et purifiés :

L'évolution de l'activité hemagglutinante en fonction de pH définit quatre phases principales :

La première phase se caractérise par une très faible augmentation de l'activité hemagglutinante et s'étalent du pH 2 au pH5.

La deuxième phase (pH 5 à pH7) affiche une très forte élévation de l'activité hemagglutinante.

La troisième phase s'étend de pH 7 au pH9 et s'accompagne d'un maintien de l'activité hemagglutinante à un niveau constant.

La dernière phase (pH>7) est caractérisée par l'amorce d'une réduction de l'activité hemagglutinante, au cours de cette dernière phase, la baisse d'activité varie de 50 à 75%.

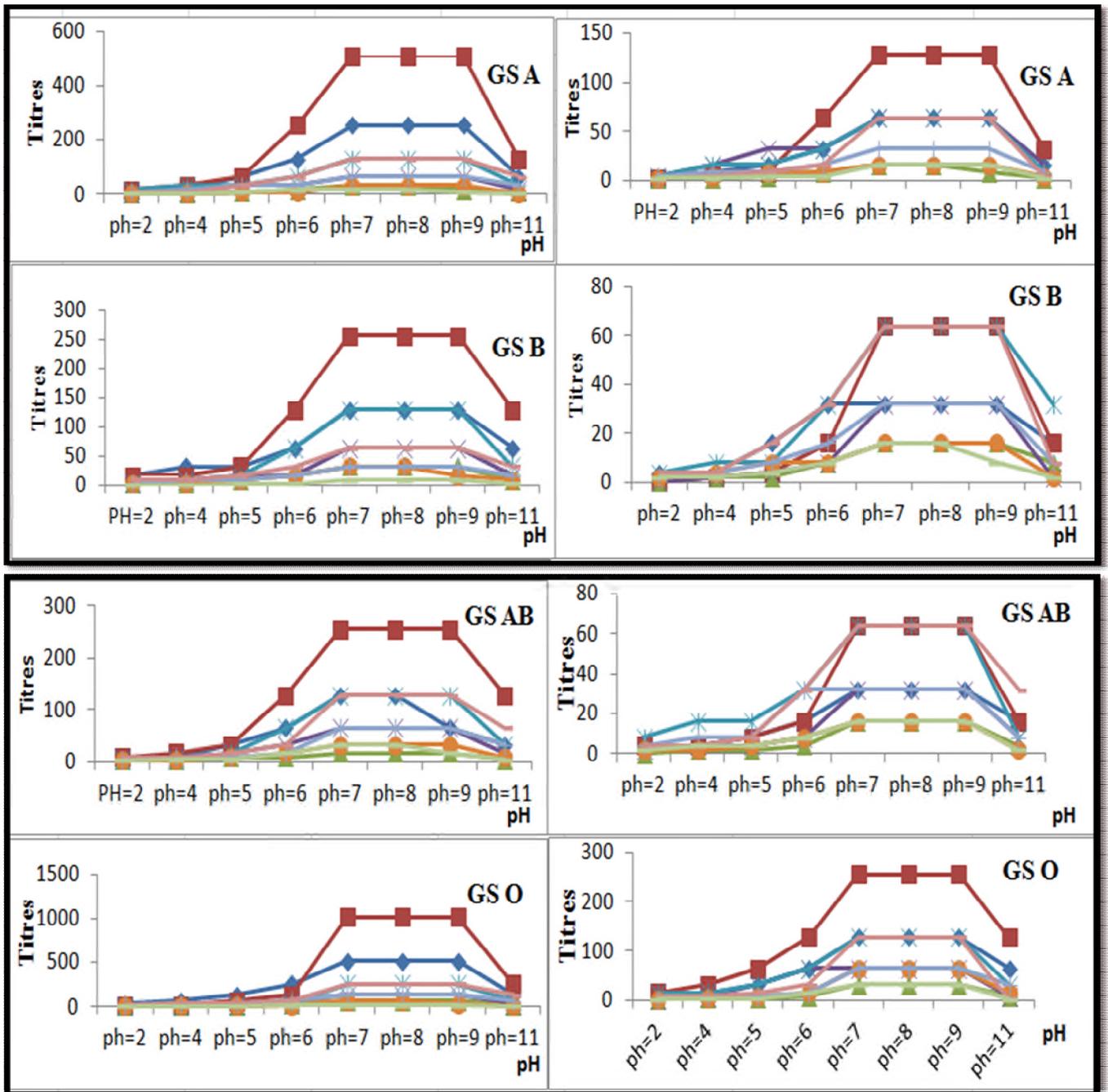


Figure 19: Effet du pH sur l'activité hémagglutinante s des extraits bruts et purifiés.

VI-1-8-Test d'inhibition par les sucres :

Les résultats montrent que le mannose et lévulose présentent la plus faible concentration inhibitrice (0.0975 μ M, 0.195 μ M) de l'action des extraits bruts de fève, féverole et la lentille (0.09 à 0.39 μ M/ml) ; la plus forte concentration (25 mM et 12.5 μ M) a été notée pour le glucose vis-à-vis la fève et lentille entière et pour le galactose (12.5 μ M) vis à vis la fève entière.

Après décorticage, le lévulose manifeste la plus faible concentration inhibitrice pour les extraits bruts et purifiés de cotylédons, féverole et lentilles (0.0975 à 3.12 mM).

Les téguments des extraits bruts et purifiés des téguments fève ont une très grande affinité au lévulose utilisé respectivement à une concentration de (0.39 et 1.56 mM). Le saccharose et galactose présentent la plus faible concentration inhibitrice (0.195 mM, 6.25 mM) sur les extraits bruts et purifiés des téguments féveroles.

Le saccharose et melibiose inhibent fortement les extraits bruts des téguments de lentilles avec une concentration de 0.78 mM, sur l'extrait purifié, l'inhibition de l'activité est exercée par le mannose à une concentration de 12.5 mM.

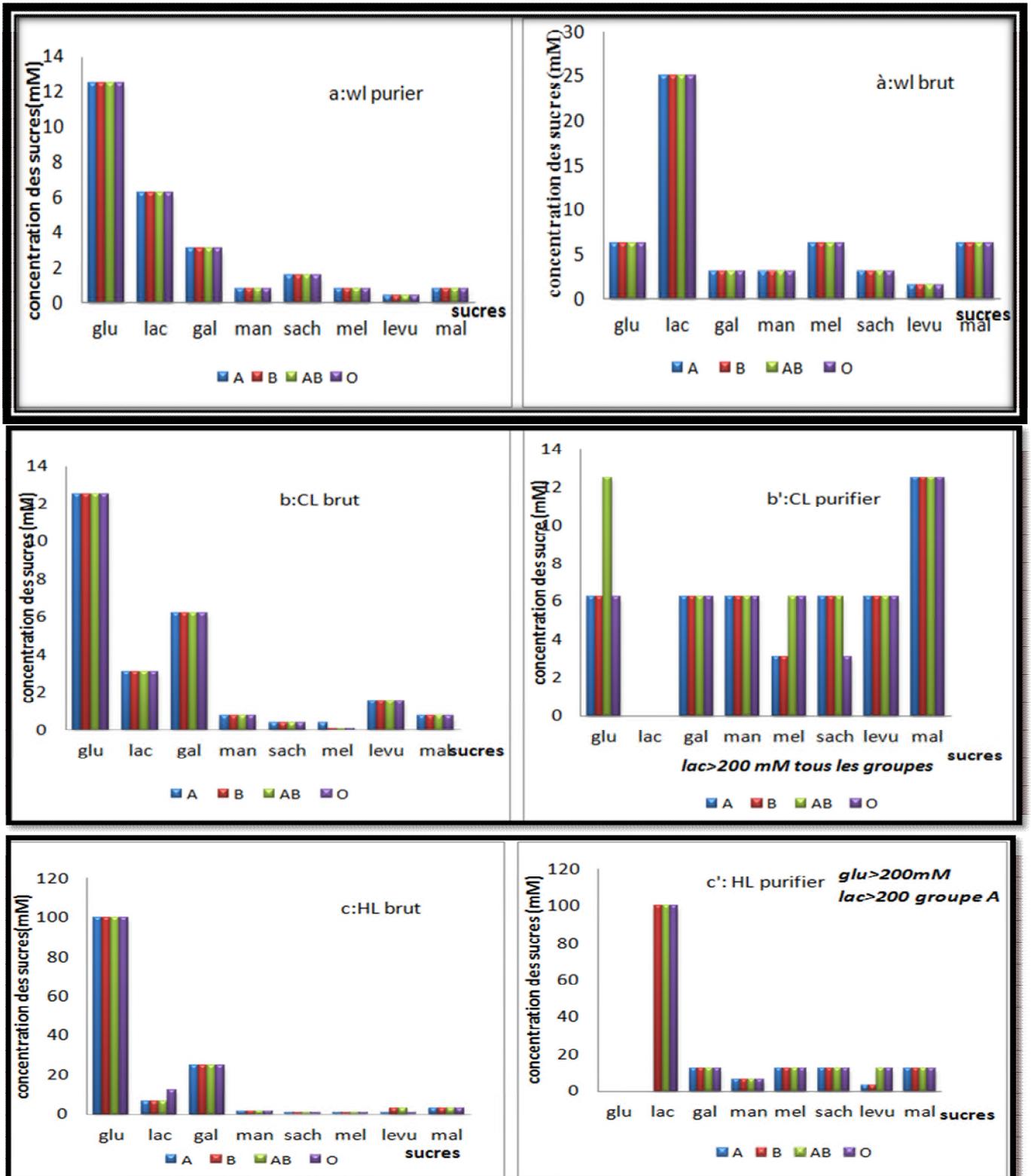


Figure 20 : Concentration minimales des sucres utilisés pour inhiber l'AH de différents extraits bruts et purifiés de lentilles

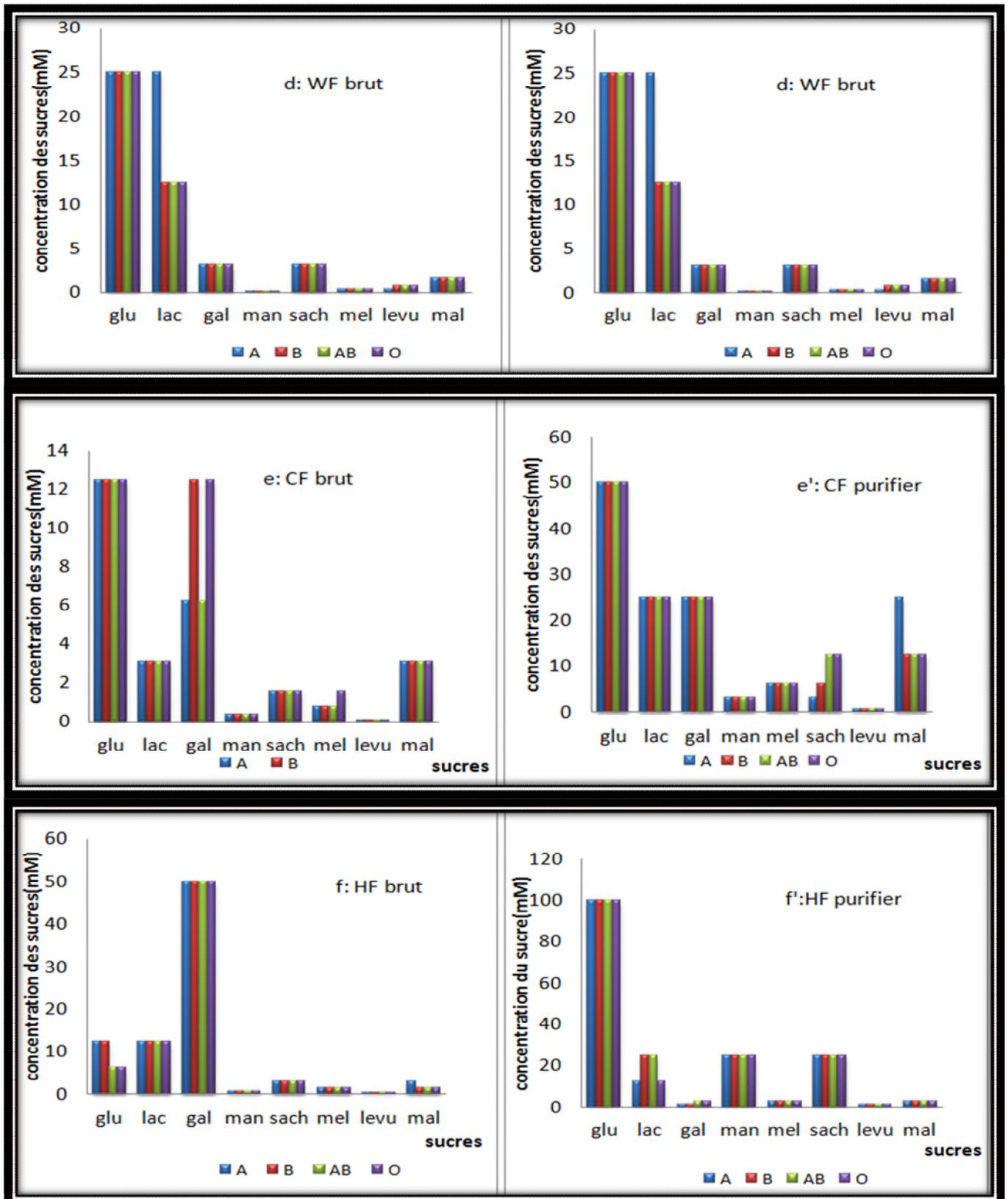


Figure 21: Concentration minimales des sucres utilisés pour inhiber l’AH de différent extraits bruts et purifiés de féve

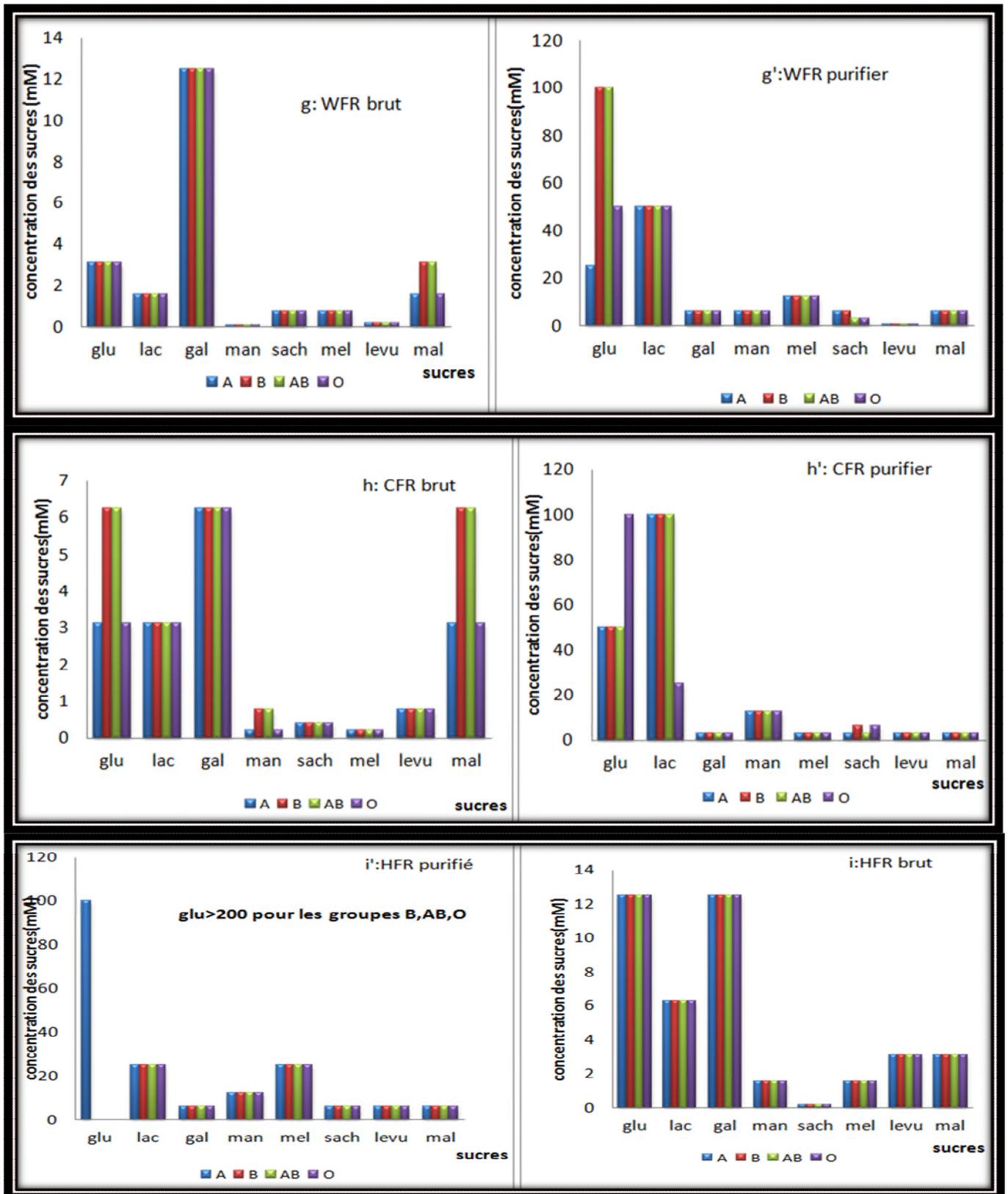


Figure 22 : Concentration minimales des sucres utilisés pour inhiber l'AH de différents extraits bruts et purifiés de féverole.

VI-1-9-Mesure de l'activité hémagglutinante par la méthode spectrale

Nos données analytiques montrent que la concanavaleine A prise comme standard manifeste une activité hémagglutinante variable selon le groupe sanguin considéré, la plus faible valeur est notée pour le groupe B (179.5 unité/ml) alors que l'activité la plus élevée est enregistrée pour le groupe O

(1794.7 U/ml) et le groupe A (1516.2 U/ml).

Seuls les extraits bruts des cotylédons des lentilles et fève ainsi que ceux de féverole graine entière affichent une activité supérieure à celle du standard (190.7 ;271 et 274 Unité/ml respectivement). Ces augmentations varient de 6.27 % (cotylédon lentilles) à 52.65% (féverole entière).

Après purification, l'activité des extraits de graines entière varient respectivement pour le groupe B 2.8 à 4.12 celle de la concanavaleine A. pour le groupe AB, l'activité des lectines purifiés de fève (entière et cotylédon) représente 1.6 à 1.9 fois celle du standard.

Pour le groupe O, l'activité des lectines de féverole entière et cotyledon fève equivaut à 1.09 et 1.56 fois celle de la concanavaleine A.

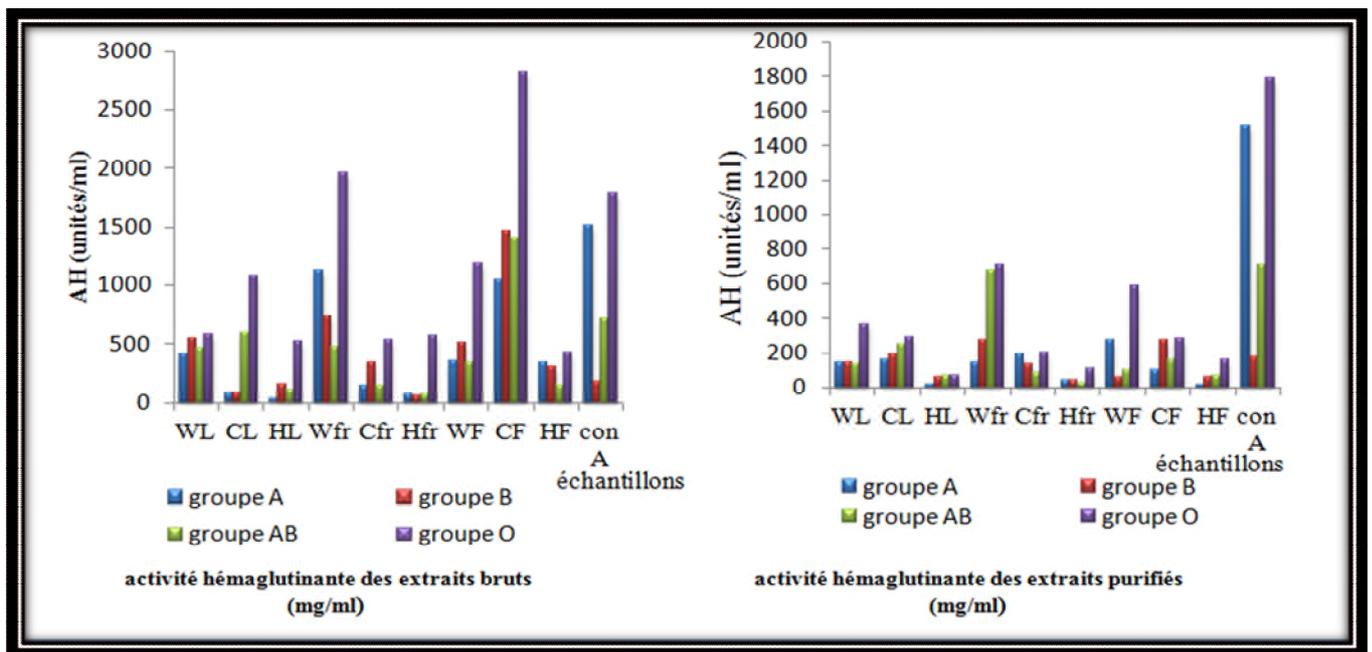


Figure 23: Activité hémagglutinante des extraits bruts et purifiés

Discussion générale

Les lectines sont tenues pour responsable de la toxicité de légumes consommés crus ou mal cuite, et elles sont citées au rang des facteurs antinutritionnels. Dans la perspective d'une exploitation rationnelle de nos graine de légumineuses locales (*Lens culinaris*, *Vicia faba major et minor*), il nous paraît judicieux d'entreprendre et d'approfondir les études antinutritionnelles et notamment leurs lectines et l'évaluation de différents traitements sur leur activité hémagglutinante.

Quand aux techniques d'agglutination que nous avons employées, elles ont été élaborées par Beth Vincent et permettent d'identifier des antigènes à la surface des hématies à l'aide de phytoagglutinines (Letonturier, 1996).

Les extraits bruts et purifiés de ces trois graines de légumineuses ont le pouvoir d'agglutiner les érythrocytes des différents groupes sanguins (A, B, AB, O), nous avons mis en évidence la présence de lectines dans les différents extraits. Comme le signifient **Teixina-sa et al (2009)**, ce genre de test est utilisé pour la détection de la présence de lectines dans un échantillon.

Cette activité survient lorsque la lectine se lie à des glucides qui se trouvent à la surface des érythrocytes formant un réseau entre elles. L'intensité de l'agglutination varie en fonction de groupe sanguin et de substrat utilisé.

Nous avons remarqué que pour le même extrait brut et purifié, le groupe O affiche une plus grande réactivité alors que le comportement des hématies des autres groupes varie. Une telle variabilité est observée par différents auteurs. **Machuk et al. (1999)** ont montré une très forte agglutination avec les extraits de lectines *Sphenostyles stenocapa* pour le groupe sanguin O ; les lectines de *Talisia esculenta* préfèrent le groupe sanguin humain AB (**Freire et al., 2002**). Les chercheurs **Machuk et al. (1999)** ; **Freire et al. (2002)** ; **Sarkar et al. (2010)** et **Charungchitrak et al. (2011)** attribuent ces différences entre groupes sanguins à la nature des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et qui ne sont pas totalement reconnues par les lectines utilisés, mettant ainsi en évidence la présence de lectine dans les différents extraits. Les tests d'agglutination (**Teixina-sa et al, 2009**) sont en effet utilisées pour détecter ces substances dans un échantillon.

Nous avons relevé que l'intensité de l'agglutination varie en fonction du groupe sanguin et du substrat végétal utilisé.

Notre étude montre que les extraits de *Lens Culinaris* manifestent une activité hémagglutinante supérieure à celle de *Vicia faba* ; le titre varie de 128 à 256 ,pour la lentille entière contre 256 à 1024 ,pour féverole entière et la fève entière . Ces différences interspécifiques sont similaires à celles rapportées par **Pasquet et al. (1987)** ; et **Roy et al, (2010)**.De même **Meite et al. (2008)** notent que l'AH des extraits bruts de courges (4 à 32) est très faible par rapport à celle des extraits de graines d'haricot (512 à 1024) .l'AH des *Phaseolus* est très supérieurs à celles des *Vigna* et celle du pois d'angole (**Jaffe ,1980**).

Lens culinaris manifeste une activité hémagglutinante supérieur à celle de *vicia faba*.le titre varie de 256 à 1024 pour la lentille entre 128 à 256.

Le décortilage des graines s'accompagne d'une élévation du titre des cotylédons de toutes les graines alors que celui des téguments diminue.

Nos donnés analytiques ont révélé en effet des différences de teneurs en protéine et glucides entre extraits bruts de lectine.la graine entière de *vicia faba* affiche une teneur plus élevée que celle de *lens culinaris* alors que nous notons le contraire pour les cotylédons.

Il en est de même pour les glucides plus présents dans les extraits bruts de fève que de lentille et féverole .Nos résultats montrent une baisse de l'activité des extraits après purification et suggèrent la présence dans les extraits bruts d'autre substance capable d'agglutiner les hématies.

Les graines de légumineuses sont connues pour être riches en composés phénoliques ,de tels composés ont été mis en évidence par **Boudjou et al (2012)** travaillant sur les mêmes échantillons utilisés dans le présent travail.les tannins sont localisés essentiellement dans les téguments éliminés par le décortilage(**Grevier,1999 ;Boudjou et al 2012**).En accord avec **Makkar et al (2007)**.ces composés phénoliques solubilisés par le solvant se retrouvent dans les extraits bruts de lectines et manifesteraient une activité hémagglutinante.nos donnés pour les graines entières et les extraits purifiés conforte cette hypothèse.

Chrunghitrak et al (2010) attribuent ces différences d'activité hémagglutinante à la nature des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et qui ne sont pas totalement reconnues par les lectines utilisées.

Le décortilage s'accompagne d'une élévation du titre pour toutes les graines quelque soit le groupe sanguin considéré, mais dans les téguments les titres diminuent dans toutes les graines.

Lens Culinaris et *Vicia Faba* sont connus pour leurs richesses en tannins (**Kayci et Melcion , 1992** ; et **Yadav et al., 2007**). La présence de tels composés a été mis en évidence par **Tazart (2011)** et **Zatouche (2011)** travaillant sur les même échantillons utilisés dans le présent travail. Les tannins sont localisés essentiellement dans les téguments et éliminés par le décortiquage (**Creveu, 1999**). En accord avec **Makkar et al., (2007)**, les tannins de nos substrats seraient solubilisés par le solvant utilisée (eau physiologique) avec pour conséquence une interaction Tannins-lectine .Les faibles activités des extraits de graines entières par rapport aux graines décortiqué correspondantes sont en accord avec cette hypothèse.

Nous avons utilisé la purification par précipitation différentielle qui donne une solution limpide très concentré en agglutinine. Les lectines purifiées sont souvent peu stables et doivent généralement être conservées dans les conditions les protégeant de la dégradation. La conservation à basse température est de rigueur. Les protéines particulière ou lectines sont stables sous forme sèche (en poudre), c'est la meilleure façon de les conserver.(**Doumbia,2004**).

Le traitement par la trypsine et la papaine des hématies augmente l'activité hémagglutinante des extrais c'est pour cela le traitement des hématies par des enzymes protéolytique comme, la trypsine et la papaine, a pour rôle de digérer les protéines qui masquent les glucides membranaires avec pour conséquence une amélioration de la réactivité des hématies traitées (**jaffe ,1980**).

Le traitement thermique modifie l'activité des extraits (bruts et purifiés) de lectines , en accord avec celle de **Henderson et al (1986)** et laissent donc suggéré que les pratique alimentaire traditionnels ou modernes des populations contribuent à éliminer les lectines de nos graines étudié et par conséquent à améliorer leur valeur nutritionnelle.

Nous avons noté une thermoresistance des lectines jusqu'à 45 °C et une thermosensibilité à partir de 60 °C. des observations similaires sont rapportées par différents auteurs (**Sampaio et al. 1998 ;et Adenike et Ertan , 2003**) travaillant sur divers sources de lectines (lectines de *Hevea brasiliensis* , lectine *Filicina*) Des baisses d'activités de 20% à 80% sont rapportés par **Dhuna et al. (2005)** ; **Wong et al. (2006)**, et **Sitohy et al ,(2007)**. les lectines sont de nature protéique et la perte de l'activité hémagglutinante par le chauffage suggère une dénaturation des lectines s'accompagne d'un affaiblissement de l'interaction entre lectines et sucres (**Schwarz et al,1993**)

Nous avons observés des diminutions du titre de 256 à 64 et dans les extraits purifiés elle diminue de 64-2 pour un pH 2-ph 6 ,sauf dans le groupe O la diminution du titre de 512-64 pour les extraits bruts. **Tamiza et al. (2007)** rapportent des AH de lectines plus élevés dans la zone a pH neutre que dans la zone de pH acide et basique. **Sitohy et al. (2007)** notent que l'hémagglutination est remarquablement affectée par le pH acide alors qu'elle est maintenue à pH 6 et 9 elle diminue a partir du ph 11 pour tout les extraits bruts et purifiés.

Nous avons enregistré des diminutions des titres des extraits à pH acides (2-5) et maintient de la zone de PH neutre.des résultats similaires sont similaires sont rapportés par **Tamiza et al (2007)** ,(Loris et al,1998)

Les tests d'inhibition par les sucres est utilisé pour montré qu'ils ont une affinité avec les lectines , ce qui as permet leur usage dans la détermination des groupes sanguins (Bird,1974). Et à l'étude des structures osidiques de la membrane cellulaire, importante pour élucider certain comportement de la cellule (**Hebert,2001**).

Le fucose qui appartient à l'antigène de base des groupes sanguins ou groupe O ; Le galactose caractérise le groupe B (**Nathan,1972**) ,dans la plupart de nos résultats nous avons constaté que levulose qui est l'isomère de fructose qui as une forte inhibition des lectines par apport au autre sucre. L'inhibition des extraits par le fructose peut indiquer leur pouvoir à agglutiner les hématies de tous les groupes du système ABO, puisque le fucose est la composante de l'antigène de base des groupes sanguins.

Les différences de comportement des extraits en présence des divers sucres utilisés traduisent les différentes affinités.

Dans des conditions expérimentales, nos donnés par la méthode spectrales montrent que certains extraits ont une activité hémagglutinante plus élevée que le standard (Con A),comme pour la concavaline ,nous avons enregistré une variabilité des facteurs de groupes sanguins.

Conclusion

CONCLUSION

Nous avons extrait des substances à effet agglutinant sur les hématies que nous appellerons lectines et notre travail montre que les trois graines de légumineuse produite localement (lentille, fève, féverole) renferment des lectines (des protéines à pouvoir hémagglutinant sur les différentes hématies du système ABO humain).les extraits brut et purifié de la lentille affiche une activité hémagglutinante supérieur à celle de *vicia faba* (entières ou décortiqués)

La purification diminue le degré d'agglutination dans tous les groupes sanguins .

nous avons constaté que les température allant jusqu'à 105°C, élimine l'effet hémagglutinante de lectine.

Le traitement de nos extraits par différents PH, joue un rôle dans le mentient,la diminution ou l'augmentation de l'activité hémagglutinante dans les différents milieu utilisé acide ,base ou milieu neutre.

Nous avons supposé que la réaction d'hémagglutination par les extraits de graines observée et leur inhibition par un sucre simple, témoignent de la présence de lectine dans l'extrait concerné, vus l'inhibition par des oligosaccharides, les lectines de *Lens culinaris* et *Vicia faba*, présenteraient des sites de fixation pour les différents sucres simple utilisés.

Perspective :

Pour bien approfondir cette étude, il sera probable d'élargir le spectre de recherche ,en faisant une études sur les hématies des animaux domestique.

Pour avoir des échantillons de lectine pur, il faut procéder à d'autre technique de purification comme les techniques de chromatographie.

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

A

Adresse électronique

ABOVIE sur www.abovie.com

Adenike K , Eretan O.(2003). Purification and partial characterization of a lectin from the fresh Leaves of kalanchoe crenata (Andr.) Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 37, p. 229-233.

Alencar, N.M., Cavalcante, C.F., Vasconcelos, M.P., Leite, K.B., Aragao, K.S., Assreuy,A.M., Nogueira, N.A., Cavada, B.S. and Vale, M.R. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. J Pharm Pharmacol, 57, 919-922.

Aragao A K (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. Université Grenoble I – Joseph fourier.pp40

B

Bird G.(1974).plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte Anomalies. Ann.N.Y.Acard.Sci,234-129

Bonneil, E., Young, N. M., Lis, H., Sharon, N., Thibault, P. (2004); Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the Erythrina genus by mass spectrometry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426, 241-249

Botos I., O'Keefe B. R., Shenoy S. R., Cartner L. K., Ratner D. M., Seeberger P. H., Boyd M. R. et Wlodawer A. (2002). Structures of the complexes of a potent anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 277: 34336-34432.

Boudjou S, Dave Oomah B.,Hosseinian F.,Zaidi.,F (2012) phenolic content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food chemistry* 138:1543-1550

Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954), Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.

Bradford M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding , *Analysis Biochemistry* .Volume 72 .p 248-254.

Bruneton J (1993), Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, édition Technique et documentation Lavoisier, Paris, P1889, 1992

©

Charungchitrak S., Petsom A. , Sangvanich P., Karnchanatat A.(2011) . Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of Archidendron jiringa Nielsen .*Food. Chem* .126: 1025–1032.

Creveiu G. (1999) Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois INRA Production Animale, 12 (2), 147-161

©

DhunaV ,Bains J ., Kamboj S ., Singh J ., Shanmugavel B.(2005). Purification and Characterization of a Lectin from *Arisaema tortuosum* Schott Having in-vitro Anticancer Activity against Human Cancer Cell Lines. *Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 5, pp. 526-532

Doumbia M (2004), Etude de l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne, thèse de pharmacie, FMPOS, Bamako, 85P.

©

Edelman G.M. ,Cunningham B.A.,Reeke G.N.,Becher J.W. ,Waxdal M.J.et Wang J.L.(1972).The covalent and three-dimentional structure of concanavalin A.*proc .Nat.Acad.Sci.69* :2580-2584.

Etzler M E (1994), Isolement et caractérisation des sous-unités de D B 58, d'une lectine des et feuilles de *Dolichos biflorus*, *Biochimie* 33 : 9778-9783

F

Freire M. G. M., Gomes V. M., Corsini R. E., Machado O. L. T., De Simone S. G.,Novello J. C., et al. (2002). Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physi. Bioch.* 40: 61–68

G

Gallego del Sol F., Nagano C., Cavada B.S. et Calvete J.J. (2005). The first crystal structure of a mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *J. Mol. Biol.* 353:574-583

Guignard J L, Cosson L, Henri M (1985), Abrégé de phytochimie, édition Masson, Paris, P 66

Guillot, J., Guerry, M., Kanska, G., Caldefie-Chezet, F., De Latour, M. and Penault-Llorca, F. (2004) ; Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, 91, 141-158.

H

Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M.H., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L.,Loris, R (1996), The crystallographic structure of phytohemagglutinin L.; *J. Biol.Chem.*, **271**, 20479-20485.

Hardman, K.D. and Ainsworth, C.F. (1972) Structure of concanavalin A at 2.4 A resolution. *Biochemistry*, 11, 4910-4919

Hebert E (2001), Lectines membranaires et transduction du signal, médecine/sciences, 17: 486-9.

Hester G., Kaku H., Goldstein I.J. et Wright C.S. (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nature Struct, Biol.* 2 :472-479

Henderson C.W., Scheerens J.C. & Berry J.W.,1986. Antinutritional factors in *Cucurbita* seed meals. *J. Agric. Food Chem.* 34: 434-436.

§

Jaffe W.G., 1980. Hemagglutinins (Lectins). In Liener I.E., Eds. *Toxic constituents of plant foodstuffs (second edition)*. New York and London : Academic Press. pp.73-102.

κ

Kaysi Y. Melcion J.P.(1992). Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique :exemples d'application à la graine de féverole.*INRA.Prod.Anim.5(1) :3-17*

ℒ

Letonturier (1996), Immunologie générale 5ème édition Masson, Paris, P100

Lis ,H et Sharon,N.(1998).Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition *chem..Rev.98:637-674*

Loris R., HamelryckT ., Bouckaert J, Wyns J (1998).Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*.Vol: 138. p 9-36.

ℳ

Machuka J. S., Okeola O. G., Van Damme E. J. M., Chrispeels M. J., Van Leuven F.et Peumans W. J. (1999). Isolation and partial characterisation of galactose specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochem.* 51 : 721–728 .

Makela O (1957), Studies in hemagglutinins of *leguminosae* seeds, *Ann Med Exp.Biol.Suppl*, P 11-35

Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P et Becker, K. (2007). Plant Secondary Metabolites.*Humana Press*.17-26pp.

Meite A., Koffi G. K et Offoumou A. M.(2008).Evaluation de l'activité hémagglutinante des lectines des graines de trois espèces de Cucurbitaceae couramment consommées en Côte d'Ivoire. *Scie. Nat* 5 (2) :199 – 204

Michael D. Swanson ; Harry C. Winter ; Irwin J. Goldstein ; David M. Markovitz (2010): *A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication*; *Journal of Biological Chemistry* , vol. 285, n° 12, 8646-8655

Muduuli, D.S., Marquardt, R.R., Guenter, W. (1981). Effect of dietary vicine on the productive performance of laying chickens. *Can. J. Anim. Sci.* **61**. 757-764pp.

Muduuli, D.S., Marquardt, R.R., Guenter, W. (1982). Effect of dietary vicine and vitamin E supplementation on the productive performance of growing and laying chickens. *Br. J. Nutr.* **47**:53-60.

P

Pasquet R,Fosto ,M , Noubi L (1987). Comparaison de la valeur nutritionnel de quelques légumineuses locales a celle des légumineuses introduites ou en voie d'introduction au Cameroun.*revue science technique* .Tome IV. P 57

Peumans W.J.et Damme .V.J.M. (1995).Lectins as plant defense proteins.*Plant physiology*,109, 347-352.

Pusztai A, Ewen S W B (1999), Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine , *Lancet* 354(9187) : 1353-1354

Pusztai A. (1991). *Plant Lectins*, Cambridge University Press, New York.

R

Renkonen K O (1948), Studies on hemagglutinins present in seeds of some representative of the family of leguminosae, *Ann Med.Exp. Biol. Fenn*, p 26

Roy F.,Boye J.I., Simpson B.K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43, 432–442.

Rutenber, E., Katzin, B.J., Ernst, S., Collins, E.J., Mlsna, D., Ready, M.P. and Robertus J.D. (1991). Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins*. 10: 240-250.

§

Saboia Aragao, K. (2008). Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. universite grenobleI joseph fourier.18p

Sampaio, A. H., Rogers, D. S. J. And Barwell, C. J. (1998) Agalactose-specific lectin from red marine alga, *Ptilota filicina*. *Phytochem.* 48, 765-769

Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. and Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a -prism fold. *Nature Struct. Biol.*, 3, 596-603.

Sarkar M. Kawsar A, Rahman Md , Yasumitsu H ,O zeki (2010). Biological Effects of a Carbohydrate-Binding Protein from an Annelid, *Perinereis nuntia* Against Human and Phytopathogenic Microorganisms. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6:1.

Schwarz F., Deep K ., Rama G., Bhat S ., Avadhessa S .(1993). Thermodynamics of Monosaccharide Binding to ConcanavalinA , Pea (*Pisum sativum*) Lectin, and Lentil (*Lens culinaris*) Lectin .*Bio Chy.* p. 7668-7677

Serge D.(1995). Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres ,introduction chimique aux glycosciences,CNRS,Paris,

Sharon N, Lis M (1972), Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins science, P177-949.

Sharon N. (2003) .Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: An atomic view. *Trends Biochem Sci* . 18: 221-226

Sharon, N. and Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.

Sitohy M, Doheim M, Badr H (2007). Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chem.* 104: 971-979

Ⓙ

Tamiza Y., Tang A., Hossain A., Nurul A .(2007). Effet of Physico-chemical Agent on the Biological activities of the Mulberry Seed lectins .*Biochemistry* 2(2): 111-117.

Tazart K.(2011).Composés phénoliques et activité antioxydante des extraits de fèves ,feveroles et lentilles.

Teixeira-Sa D., Reicher F., Braga RC., Beltramini LM.et Moreira RA. (2009) . Isolation of a lectin and galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei*. *Phytochem* .70:1965-1972

Ⓚ

Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rougé, P. (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.ith diverse biological roles. *Critical Rev. Plant Sci.*, 17, 575-692.

Ⓛ

Yadav S.S., McNeil D.L., Stevenson P.C. (2007).in History. Lentil an Ancient Crop for Modern Times. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

Ⓜ

Wang N ., Daun J .K. (2006) .Effects of variety and crude protein content on nutrients and

anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chem* .95 : 493–502.

Wright C.S. (1980). Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* 141: 267-291.

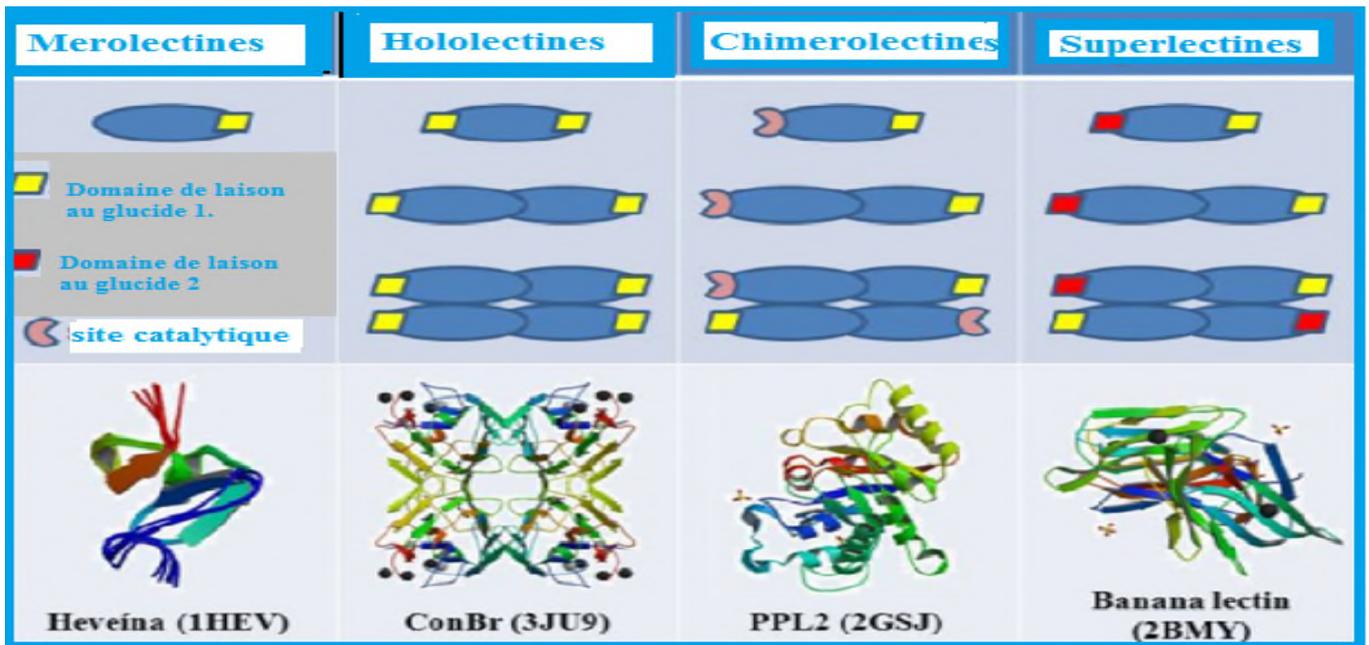


Zatouche A.(2011) *Vicia faba (minor, major), Lens culinaris*. Approche de quelques métabolites secondaires .mémoire de fin de cycle.Béjaia.

Annexes

Annexe

Annexe N°I: Classification structure des lectines des plantes (Van Damme *et al* 1998).



Eau physiologique

0.9g NaCl	}	Stérilisé à l'autoclave.
1000ml d'eau distillée		

Réactif du Bradford

50 mg de bleu de Coomassie.

25ml d'éthanol absolu à 95%

50 ml d'acide phosphorique.

Ajuster jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

Remarque : Dissoudre le bleu de Coomassie dans l'éthanol, agiter pendant 1 heure puis ajouter l'acide phosphorique et enfin ajuster avec de l'eau distillée.

Préparation de la BSA dans le tampon acétate :

➤ Préparation du tampon :

11,55 ml d'acide acétique dans un litre d'eau distillée.

27,2 g d'acétate de sodium dans un litre d'eau distillée

Une fois préparé on prend :

14,8 ml de la solution acide acétique	}	Ajuster jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.

Annexe

35,2 ml de l'acétate de sodium

Tampon phosphate-citrate

Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M (soit 105,06 g de $C_6H_7O_8$, H_2O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na_2HPO_4 sec par litre).

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml.

pH	Na_2HPO_4 à 0,50M	Acide citrique à 0,50M
3,0	16,44 ml	31,78 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml
7,0	65,88 ml	7,06 ml

Tampon Borate

Préparer une solution d'acide borique et de chlorure de potassium 0,20 M (soit 12,41 g de H_3BO_3 sec et 14,91 g de KCl sec par litre) et une solution décarbonatée de soude 0,20 M (8,00 g de soude par litre). Ne pas chauffer l'acide borique au-dessus de 50 °C.

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml

pH	KCl, H_2BO_3 à 0,20 M	NaOH à 0,20 M
9,0	50 ml	21,40 ml

Matériels techniques et produits chimiques utilisés

Matériels technique

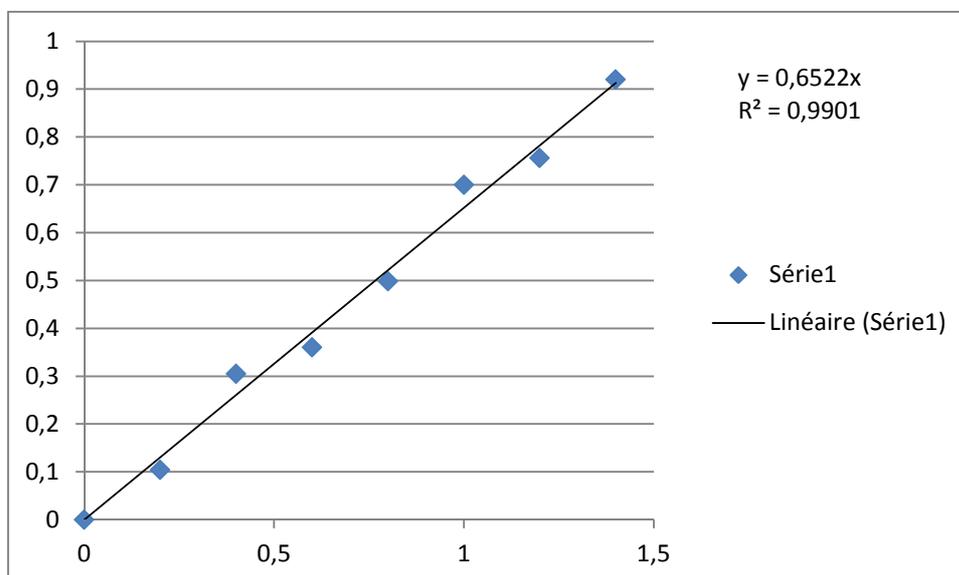
Annexe

Balance électronique,	Autoclave.	Agitateur de microplaque,
Eprouvettes graduées,	Etuve,	Lame et lamelle,
Compresse à gaze, Coton hydrophile,	Flacons, récupérées, lavées, stérilisées à l'étuve à 100degre pendant 24 h,	Micropipette, Embouts , Pissette en plastique, Vortex.
Entonnoir,	Plaque de groupage,	
Erlenmeyers,	Compte gouttes,	
Moulin électrique,	Porte-tubes,	
Plaque agitatrice, Papier aluminium, Bécher,	Centrifugeuse, Réfrigérateur,	
Spatule,	Seringue, marqueur, Etiquette,	
Tamis,		
Tubes à essais.	Tube à hémolyse,	

Préparation de l'anthron :

0.1 g de l'anthron dans 100 ml de l'acide sulfurique.

Courbe BSA :



Résumé

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, et la famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèce contenant des lectines végétales. ces dernières possèdent une affinité aux monosaccharides, d'où leur capacité d'agglutiner les érythrocytes avec une spécificité de groupe, ainsi le traitement des hématies avec les enzymes augmente l'activité hémagglutinante.

Ce travail a porté sur la mise en évidence de lectine dans les graines de trois légumineuses produites localement : les lentilles, fève, féverole et d'évaluer leur réactivité vis-à-vis des différents groupes sanguins du système ABO.

Nos résultats confirment la présence de lectines dans les trois légumineuses, par les tests d'agglutination réalisés. De plus tous les extraits de lectines manifestent une activité hémagglutinante, variable en fonction du substrat. et le groupe sanguin O apparaît le plus réactif vis-à-vis des extraits utilisés avec un titre 2048.

Mot clés :

Légumineuses, lectines, activité hémagglutinante ; les différents traitements.

Abstract:

Lectins are ubiquitous molecules, and the legume family offers the largest number of species containing plant lectins, they have an affinity for monosaccharide, their ability to agglutinate erythrocytes, with a specific blood group.

In this work we focused on the identification of lectins in the seeds of three locally produced legumes : lentils, beans and evaluate their reactivity against the different ABO blood group system.

Our results affirm the presence of lectin in our three legumes, by agglutination tests performed, and all the extracts exhibit a lectin hemagglutinating activity, which varies depending on the substrate, the blood type O is the most reactive against the extracts used, with a title 2048.

Keywords:

Legumes, lectin, haemagglutinating activity, different treatment used.