

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

**Université Frères Mentouri Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département De Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**



N° d'ordre :

N° de série :

**Thèse de Doctorat**

**Présentée pour obtenir le diplôme de doctorat en sciences**

**Domaine : Science de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Spécialité : Biochimie**

Présentée et soutenue par : **MESSAI Alima**

**Intitulé :**

**Extraction, purification des lectines à partir des plantes  
médicinales : *Ruta montana*, *Peganum harmala* et leurs études  
biologiques**

**Membres de jury :**

<b>Président :</b> NOUADRI Tahar	MCA.	Université Frères Mentouri- Constantine 1
<b>Directeur de thèse :</b> NECIB Youcef	Professeur	Université Frères Mentouri- Constantine 1
<b>Examinatrice :</b> BAHY Ahlem	MCA	Université Frères Mentouri- Constantine 1
<b>Examineur :</b> OULDJAOUY Abdallah	Professeur	Université Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi
<b>Examinatrice :</b> KADI Kenza	Professeur	Université Abbes Laghrour Khenchela
<b>Examinatrice :</b> Hamli Sofia	MCA	Université Abbes Laghrour Khenchela

**Année universitaire : 2022-2023**

## Remerciements

Mes remerciements sont d'abord au Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour achever cette thèse.

Je remercie très sincèrement à mon directeur de thèse Monsieur Necib Youcef, professeur à l'université frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir guidé constamment vers la lumière pendant toutes les années de thèse (durant mon projet de thèse), pour m'avoir appris à aiguiser ma rigueur scientifique et aussi pour leur qualité humaine inestimable.

Un grand merci à Monsieur le Professeur Javier Vioque le directeur de laboratoire phytochimie alimentaire (Institut de la Grasa) pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, qui a toujours été présent lorsque j'avais des questions ou pour m'aider à me former à de nouvelles techniques.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes de l'équipe phytochimie alimentaire Youssef Elamine, Julio Girón-Calle et Manuel Alaiz pour leurs sympathies et leurs amitiés.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie :

Mr NOUADRI Tahar (Université Frères Mentouri Constantine 1), d'avoir accepté d'être président du jury.

M<sup>me</sup> BAHY Ahlem (Université Frères Mentouri Constantine 1), Mr OULDJAOUY Abdallah (Université Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi), M<sup>me</sup> KADI Kenza (Université Abbes Laghrour Khenchela) et M<sup>me</sup> Hamli Sofia (Université Abbes Laghrour Khenchela) pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je remercie ma mère et mes sœurs pour leur soutien et leurs encouragements.

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur mon cher et tendre mari, El khoudir, Je te remercie pour ta présence tendre et apaisante au quotidien, pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme, pour avoir cru en moi et pour tout ton amour. Un grand merci plein d'amour et de tendresse, pour mes deux anges Cheith et Illine que Dieu les protège.

## Dédicaces

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père que ton âme repose en paix.

Ma chère mère L'exemple de la force qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir en permanence durant toutes les années de mes études.

Mes sœurs, mon épouse mon fils et ma fille.

**Extraction, purification des lectines à partir des plantes médicinales : *Ruta montana*,  
*Peganum harmala* et leurs études biologiques**

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, d'origine non immunitaire, présentant plusieurs propriétés biologiques, L'objectif de ce travail était de purifier et caractériser la lectine des racines de *Ruta montana* et des grains de *Peganum harmala* et d'étudier leurs activité antiproliférative. Les lectines de deux plantes ont été extraites par trois méthodes différentes, eau distillée à pH 4, chlorure de sodium (NaCl) et une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). La lectine de *Ruta montana* a été purifiée par ultrafiltration et précipitation au sulfate d'ammonium, suivies d'une chromatographie par filtration sur gel. Tandis que la lectine de *Peganum harmala* a été purifié par ultrafiltration et chromatographie par filtration sur gel. La caractérisation de la lectine de *Ruta montana* montre qu'elle possède une structure monomérique avec un poids moléculaire de 28.8 kDa, elle a perdu son activité à 70°C pendant 30 min et plus stable à pH neutre, et montre une spécificité aux érythrocytes humains de type B, son activité est inhibée par le galactose et le glucose. La lectine de *Peganum harmala* était composée de trois sous-unités identiques, chacune avec une masse moléculaire de 70.53 kDa. Elle était stable entre pH 4.2 et pH 9, leur incubation à 80 °C pendant 10 min a conduit à une dénaturation irréversible. Elle a agglutiné tous les érythrocytes humain ABO, son activité n'a pas été inhibée par la présence de monosaccharides, tels que galactose, mannose, fructose, saccharose et glucose. La lectine de *Ruta montana* a une activité antiproliférative sur les cellules de la lignée Caco-2 et stimulent la prolifération cellulaire des de la lignée THP-1. La lectine de *Peganum harmala* montre un effet inhibiteur élevé de manière dose-dépendante sur les cellules de la lignée Caco-2 et aucun effet sur les cellules de la lignée THP-1.

**Mots-Clés** : Lectine, *Ruta montana*, *Peganum harmala*, Activité agglutinante, Activité antiproliférative.

**Extraction, purification of lectins from medicinal plants *Ruta montana*,  
*Peganum harmala* and their biological studies**

Lectins are ubiquitous proteins, non-immune origin, with several biological properties. The purpose of this work was to purify and characterize the lectin from *Ruta montana* roots and *Peganum harmala* seeds and to study their antiproliferative activity. Lectins from two plants were extracted by three different methods, distilled water at pH 4, sodium chloride (NaCl), phosphate buffered saline (PBS). *Ruta montana* lectin was purified by ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation, followed by gel filtration chromatography. While *Peganum harmala* lectin was purified by ultrafiltration and gel filtration chromatography. The characterization of *Ruta montana* lectin shows that it have a monomeric structure with a molecular weight of 28.8 kDa, it lost its activity at 70°C for 30 min and stable in neutral pH, and shows specificity to human erythrocytes type B, Its activity is inhibited by galactose and glucose. *Peganum harmala* lectin was composed of three identical subunits, each with a molecular mass of 70.53 kDa. The activity of this lectin was stable between pH 4.2 and pH 9, their incubation at 80°C for 10 min led to irreversible denaturation. It agglutinated all human erythrocyte ABO, its activity was not inhibited by the presence of monosaccharides, such as galactose, mannose, fructose, sucrose, and glucose. *Ruta montana* lectin has antiproliferative activity on Caco-2 cell lines and stimulates cell proliferation of THP-1 cell lines. *Peganum harmala* lectin has a dose-dependently high inhibitory effect on Caco-2 cell lines and no effect on THP-1 cell lines.

**Key words:** Lectin, *Ruta montana*, *Peganum harmala*, agglutinating activity, Antiproliferative activity.

استخلاص، تنقية الليكتينات من النباتات الطبية: *Ruta montana* ، *Peganum harmala* ودراستها بيولوجيا

الليكتينات النباتية هي بروتينات واسعة الانتشار ، من أصل غير مناعي، اظهرت مجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية. الغرض من هذه الدراسة هو تنقية ودراسة خصائص الليكتينات من جذور *Ruta montana* و بذور *Peganum harmala* ودراسة نشاطها كمضاد لتكاثر الخلايا السرطانية. تم استخلاص الليكتين من النباتين بثلاث طرق مختلفة: الماء المقطر عند درجة الحموضة 4، PBS و NaCl. تمت تنقية الليكتين من *Ruta montana* عن طريق الترشيح الفائق وترسيب بكتريبات الأمونيوم ، ثم يليه الكروماتوجرافيا بالترشيح الهلامي. بينما تمت تنقية الليكتين من *Peganum harmala* عن طريق الترشيح الفائق وكروماتوجرافيا. اظهرت دراسة خصائص لكتين *Ruta montana* أنه يحتوي على بنية أحادية بوزن جزيئي يبلغ 28.8 كيلو دالتون، وقد فقد نشاطه عند 70 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، كان أكثر استقرارًا في نطاق الأس الهيدروجيني المتعادل. وأظهر خصوصية مع فصيلة الدم البشري B. يتكون لكتين *Peganum harmala* من ثلاث وحدات متساوية، كتلة كل منها 70.53 كيلو دالتون، كان نشاط هذا الليكتين مستقرًا بين pH 4.2 و pH 9، وقد فقد نشاطه عند 80 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، ذو الفعالية على التلازن مع جميع كريات الدم الحمراء البشرية. وجود السكريات الأحادية، مثل الجالاكتوز والمانوز والفركتوز والسكريوز والجلوكوز لم يثبط نشاطها. لكتين *Ruta montana* له القدرة على تثبيط تكاثر على خلايا Caco-2 ويحفز تكاثر خلايا THP-1، بينما لكتين *Peganum harmala* له تأثير مثبط مرتفع على خلايا Caco-2 وليس له تأثير على خلايا THP-1.

**الكلمات المفتاحية:** لكتين، *Ruta montana* ، *Peganum harmala* ، فعالية التلازن ، مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية.

**A375** : Une lignée cellulaire de mélanome humain

**AEL**: *Aspidistra elatior* lectin

**Akt1**: serine/threonine kinase 1 ou « protéine kinase B » (PKB)

**ANOVA**: Analysis of variance

**ATG**: Autophagy related genes

**Bcl-2**: B-Cell Lymphoma Protein, apoptosis regulator protein

**BIM**: BCL-2-interacting mediator of cell death, proapoptotic member of the Bcl-2 family

**BmoRoL** : *Bauhinia monandra* secondary roots

**Bre-04** : Lignée cellulaire humaine de cancer du sein

**ConA**: La concanavaline A

**COX-2**: La cyclooxygénase 2 ou coxibs

**CRD** : Carbohydrate-recognition domains

**Fas** : Apoptosis Stimulating Fragment ou « fragment inducteur d'apoptose »

**FimH** : Adhésine spécifique du mannose située à la pointe des fimbriae de type 1 de *Escherichia coli*

**FIPV** : Feline Infectious Peritonitis Virus

**FOXO1a**: forkhead box O1a , Forkhead transcription factors

**FPLC**: Fast Protein Liquid Chromatography

**Gal**: Galactose

**GalNAc**: N-acetylgalactosamine

**GlcNAc**: N-acetylglucosamine

**GNA**: *Galanthus nivalis* lectin

**HeLa**: Cervical cancer

**Helja:** Helianthus annuus jacalin

**Hep G2:** human liver cancer cell line

**HT29 :** Dérivée d'un adénocarcinome colique humain

**IFN:** interféron

**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma

**IKK:** I kappaB kinase

**IL:** Interleukine

**Lu-04:** Cellules tumorales pulmonaires humaines

**MDAH041:** Cellosaurus cell line, immortalized fibroblasts derived from a patient with Li-Fraumeni syndrome

**ML:** Mistletoe Lectin

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-kappaB.

**NK :** La cellule natural killer

**NO :** Le monoxyde d'azote

**PBS :** Phosphate-buffered saline

**PCL :** Polygonatum cyrtonema lectin

**PNA:** Peanut agglutinin

**Pro-01 :** Lignées cellulaires de cancers de prostate humains

**RIP :** Ribosome-inactivating proteins

**SDS-PAGE :** L'électrophorèse pour le polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium

**SKOV3:** The ovarian cancer cell line.

**SRAS-CoV :** Le coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère.

**TCR:** T cell receptor

**Th:** Lymphocyte T helper

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TxLCI:** First Tulipa hybrid lectin with complex specificity

**U87 :** Les cellules d'une lignée cellulaire humaine cancéreuse de glioblastomes

**UDA :** Agglutinine monomère d'*Urtica dioica*

**VIH-1 :** Virus de l'immunodéficience humaine 1

**WGA :** Agglutinine de germe de blé

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique de l'interaction lectines-glucides).....	4
<b>Figure 2 :</b> Schéma représente des mérolectines, hololectines, chimérolectines et superlectines.....	11
<b>Figure 3 :</b> Mécanismes d'apoptose et d'autophagie induits dans les cellules tumorales par les lectines .....	22
<b>Figure 4 :</b> Structure de heraclenol (a) et isopimpinellin (b).....	25
<b>Figure 5 :</b> Structure de harmaline (a) et harmine (b).....	28
<b>Figure 6 :</b> Localisation géographique de la zone de récolte (Les montagnes de Babar, wilaya de Khenchela).....	30
<b>Figure 7 :</b> Photographie de <i>Ruta montana L.</i> récoltée dans les montagnes de Babar, la ville de Khenchela, au mois de septembre.....	31
<b>Figure 8 :</b> les racines de <i>Ruta montana</i> sous forme de poudre.....	31
<b>Figure 9 :</b> Photographie de <i>Peganum harmala</i> . Récoltée dans les montagnes de Babar, wilaya de Khenchela.....	32
<b>Figure 10 :</b> les graines de <i>Peganum harmala</i> (A), les graines de <i>Peganum harmala</i> sous forme de poudre (B).....	32
<b>Figure 11 :</b> Test d'agglutination pour la détection des lectines. (a) Formation du réseau érythrocytaire due à la présence de lectines ; (b) Absence d'activité hémagglutinante sédimentation des érythrocytes au fond du puits.....	35
<b>Figure 12 :</b> Ultrafiltration.....	36
<b>Figure 13 :</b> Schéma illustrant les étapes de purification de la lectine de <i>Ruta montana</i> .....	39
<b>Figure 14 :</b> Schéma illustrant les étapes de purification de la lectine de <i>Peganum harmala</i> .....	41
<b>Figure 15 :</b> Réduction du MTT par la réductase mitochondriale en un produit de formazan....	48
<b>Figure 16 :</b> Concentration en protéines de différents extraits de <i>Ruta montana</i> .....	50

**Figure 17 :** Chromatographie par filtration sur gel Superose 12 de l'extrait de *Ruta montana*. (A) Extrait après concentration par ultrafiltration (seuil de coupure de 3 kDa), (B) Lectine partiellement purifiée (précipité de sulfate d'ammonium à 50-100 %). .....51

**Figure 18 :** Analyse SDS-PAGE de *Ruta montana*. Les étalons de poids moléculaire sont indiqués sur le côté (kDa). (A) Piste 1, Ultrétenat ; Piste M, marques de poids moléculaire (en kDa). (B) piste 2, précipitation au sulfate d'ammonium (70-100 %) ; piste 3, précipitation au sulfate d'ammonium (50-70 %) ;(C) lectine purifiée.....52

**Figure 19 :** Stabilité thermique (A) et stabilité du pH (B) de la lectine de *Ruta montana*.....54

**Figure 20 :** Effet de lectine de *Ruta montana* sur la prolifération des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (caco-2), la viabilité cellulaire a été déterminé à l'aide du test de viabilité au rouge neutre. Les données représentent la moyenne  $\pm$  écart type pour n= 6. \* 0,05>p>0,01 par rapport aux témoins qui ont été cultivés sans l'extrait, les barres indiquent l'écart type.....57

**Figure 21 :** Effet de la lectine de *Ruta montana* sur la prolifération des cellules THP-1 leucémiques humaines. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD pour n = 6. Les barres indiquent l'écart type.....58

**Figure 22 :** Concentration en protéines de différents extraits de *Peganum harmala*.....59

**Figure 23.** Chromatographie par filtration sur gel Superose 12 d'extraits de *Peganum harmala* et de fractions de lectine purifiées re-chromatographiées. (A) extrait aqueux pH 4, (B) extrait après concentration par ultrafiltration (seuil 3 kDa), (C) lectine partiellement purifiée, et (D) fractions de lectine regroupées montrant une activité agglutinante.....60

**Figure 24 :** Analyse SDS-PAGE de *Peganum harmal*. Les étalons de poids moléculaire sont indiqués sur le côté (kDa). Piste 1, Ultrarétenat ; piste 2, la fraction active de la première chromatgraphie ; piste 3, lectine purifiée.....63

**Figure 25 :** Stabilité thermique (A) et stabilité du pH (B) de la lectines de *Peganum harmala*65

**Figure 26 :** Effet de la lectine de *Peganum harmala* sur la prolifération des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (caco-2), la viabilité cellulaire a été déterminé à l'aide du test de viabilité au rouge neutre. Les données représentent la moyenne  $\pm$  écart type pour n= 6.

\*\*\*p < 0,001 par rapport aux témoins qui ont été cultivés sans l'extrait, les barres indiquent l'écart type.....68

**Figure 27** : Effet de la lectine de *Peganum harmala* sur la prolifération des cellules THP-1 leucémiques humaines. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT. Les données représentent la moyenne ± écart type pour n = 6. Les barres indiquent l'écart type.....69

<b>Tableau 1 :</b> Classification systématique de <i>Ruta montana</i> .....	24
<b>Tableau 2 :</b> Classification systématique de <i>Peganum harmala</i> .....	27
<b>Tableau 3.</b> Minimum concentration protéique des différents extraits de <i>Ruta montana</i> nécessaire pour agglutiner l'érythrocyte .....	49
<b>Tableau 4 :</b> L'effet de trypsine sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Ruta montana</i> .....	53
<b>Tableau 5 :</b> L'activité hémagglutinante des différentes fractions de <i>Ruta montana</i> résultant de la précipitation du sulfate d'ammonium et de FPLC.....	53
<b>Tableau 6 :</b> Effet de différents sucres sur l'activité hémagglutinante de la lectine de <i>Ruta montana</i> .....	56
<b>Tableau 7 :</b> Minimum concentration de la lectine de <i>Ruta montana</i> nécessaire pour agglutiner les érythrocytes.....	56
<b>Tableau 8 :</b> Minimum concentration protéique des différents extraits de <i>Peganum harmala</i> nécessaire pour agglutiner l'érythrocyte.....	59
<b>Tableau 9 :</b> L'effet de trypsine sur l'activité hémagglutinante de l'extrait de <i>Peganum harmala</i> .....	64
<b>Tableau 10 :</b> L'activité hémagglutinante des fractions de <i>Peganum harmala</i> résultant de la Première et seconde FPLC.....	64
<b>Tableau 11 :</b> Effet de différents sucres sur l'activité hémagglutinante de la lectine de <i>Peganum harmala</i> .....	67
<b>Tableau 12 :</b> Minimum concentration de la lectine de <i>Peganeum harmala</i> nécessaire pour agglutiner les érythrocytes.....	67

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tables et tableaux

Introduction.....1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les lectines

1. Généralité.....	3
2. Les types des lectines.....	5
2.1. Lectine animal.....	5
2.2. Lectine bactérienne.....	6
2.3. Les lectines des champignons.....	8
2.4. Les lectines végétales.....	9
3. Classification des lectines végétales.....	10
3.1. Classification selon spécificités aux saccharides.....	10
3.2. Classification selon leur structure quaternaire.....	10
3.2.1. Merolectine.....	10
3.2.2. Hololectines.....	10
3.2.3. Superlectines.....	11
3.2.4. Chimerolectins.....	11
3.3. Classification selon la phylogénie et la similarité des structures .....	12
3.3.1. Amaranthine .....	12
3.3.2. Lectines liant la chitine .....	12
3.3.3. Lectines du phloème des cucurbitacées.....	13
3.3.4. Les lectines apparentées à la Jacaline.....	13

3.3.5. Lectines de légumineuses.....	13
3.3.6. Lectines de liaison de mannose monocotylédones .....	14
3.3.7. Protéines d'inactivation des ribosomes (RIP).....	14
4. Fonction biologiques des lectines végétal.....	14
4.1. Activité antibactérienne.....	15
4.2. Activité antifongique.....	16
4.3. Activité anti-insecte.....	17
4.4. Activité antivirale.....	18
4.5. Activités immunomodulatrices.....	19
4.6. Activité anticancereuses.....	20

## Chapitre 2 : Les plantes médicinales

1. <i>Ruta montana</i> .....	23
1.1. Description botanique.....	23
1.2. Position dans la systématique.....	23
1.3. Composition chimique.....	24
1.4. Utilisation.....	25
2. <i>Peganum harmala</i> .....	26
2.1. Description botanique.....	26
2.2. Position systématique.....	26
2.3. Composition chimique.....	27
2.4. Utilisation.....	28

## Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	29
1.1. Matériel végétal.....	29
1.2. Les lignées cellulaires.....	33
2. Méthodes.....	33
2.1. Extraction.....	33
2.1.1. Extraction par tampon phosphate salin (PBS).....	33
2.1.2. Extraction par l'eau distillée (H <sub>2</sub> O).....	33
2.1.3. Extraction par chlorure de sodium (NaCl).....	33
2.2. Dosage des protéines.....	33
2.3. Test d'agglutination.....	34

<b>2.4. Purification.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.1. <i>Ruta montana</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.1.1. Ultrafiltration.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.1.3. Dialyse.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.1.4. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....</b>	<b>36</b>

## Résultats

<b>Partie 1 : <i>Ruta montana</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>1.1. Extraction.....</b>	<b>49</b>
<b>1.2. Purification.....</b>	<b>50</b>
<b>2.3. Caractérisation de la lectine.....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.1. SDS-PAGE.....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.2. Activité agglutinante.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.3. Effet de la température et du pH.....</b>	<b>54</b>
<b>2.3.4. Test d'inhibition.....</b>	<b>55</b>
<b>2.3.5. Spécificité aux différentes espèces érythrocytes.....</b>	<b>56</b>
<b>Partie 2 : <i>Peganum harmala</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>1.1. Extraction.....</b>	<b>58</b>
<b>1.2. Purification.....</b>	<b>59</b>
<b>1.3. Caractérisation de lectine.....</b>	<b>62</b>
<b>1.3.1. SDS PAGE.....</b>	<b>62</b>
<b>1.3.2. Activité agglutinante.....</b>	<b>63</b>
<b>1.3.3. Effet de la température et du pH.....</b>	<b>64</b>
<b>1.3.4. Test inhibition.....</b>	<b>66</b>
<b>1.3.5. Spécificité aux différentes espèces érythrocytes.....</b>	<b>67</b>
<b>1.3.6. Activité antiproliférative.....</b>	<b>68</b>

## Discussion

<b>1. Extraction.....</b>	<b>71</b>
<b>2. Purification.....</b>	<b>72</b>
<b>3. Caractérisation des lectines.....</b>	<b>73</b>

3.1. Détermination du poids moléculaire et de la pureté des lectines.....	73
3.2. Activité agglutinante.....	74
3.3. Spécificité.....	75
3.4. Effet de la température et du pH.....	76
4. Activité antiproliférative.....	79
Conclusion et Perspectives.....	82
Références bibliographiques.....	84
Annexes	
Résumé	

# *Introduction*

## **Introduction**

Les plantes sont une source de médicaments pour l'homme depuis la préhistoire et il est à noter qu'au cours des quatre dernières décennies, il y a eu un regain d'intérêt pour l'étude et l'utilisation des plantes médicinales. Les produits naturels dérivés des plantes ont été caractérisés et identifiés comme de nouveaux composés chimiques d'importance thérapeutique. (**Araújo et al., 2011**). Une attention particulière est donnée aux lectines végétales en raison de la spécificité de son interaction avec les glucides, cette propriété mène à leur implication dans de nombreuses activités.

Les lectines végétales sont des protéines de liaison aux glucides d'origine non immunitaire avec une capacité d'agglutination cellulaire (**Van Damme et al., 1988 ; Van Damme et al., 2008**). Les lectines végétales sont divisées en différents groupes en fonction de leur spécificité de liaison aux glucides et en douze familles différentes en fonction de leurs structures moléculaires et de leur relation évolutive (**Silva et al., 2012**)

Les lectines sont omniprésentes et sont largement distribuées dans la nature. Plusieurs centaines de ces lectines ont été isolées de sources variées comme les plantes, les virus, les bactéries, les invertébrés et les vertébrés, mais dans l'ensemble, les lectines de différentes sources présentent peu de similitudes. Les lectines sont des outils précieux pour la détection, l'isolement et la caractérisation des glycoconjugués, principalement des glycoprotéines, pour l'histochimie des cellules et des tissus et pour l'examen des changements qui se produisent à la surface des cellules au cours des processus physiologiques et pathologiques, de la différenciation cellulaire au cancer (**Sharon et Lis, 2004**)

La découverte des lectines a été faite à partir des plantes il y a plus de 100 ans. Mais, elles sont retrouvées aussi largement chez les animaux, les microbes tels que les virus et les bactéries (**Barondes, 1988**). L'abondance des lectines végétales, leur solubilité et leur large gamme de reconnaissance font d'eux de bons modèles d'étude et de précieux outils dans les applications biomédicales et biotechnologiques (**Ambrosi et al., 2005**). Les rendements élevés de lectines de différentes sources peuvent faciliter la production de masse. L'application de lectines est possible en fonction de leurs propriétés. Les activités antifongiques et anti-insectes des lectines peuvent être utilisés dans le contrôle des agents pathogènes. La production de médicaments anti-tumoraux et antiviraux à base de lectines peut également être réalisable (**Lam et Ng, 2011**)

Au cours des dernières années, plusieurs centaines de ces protéines ont été purifiées et caractérisées en détail, en tenant compte de leurs propriétés biochimiques, des spécificités de liaison au sucre et de plusieurs activités biologiques. À l'heure actuelle, près d'un millier d'espèces de lectines végétales ont été trouvées, parmi lesquelles les lectines de légumineuses sont les plus abondantes, représentant plus de 600 espèces, dont plus de 70 espèces ont été isolées et purifiées (**Sharon et Lis, 1990**). Plus de 100 lectines ont été isolées et caractérisées structurellement à partir des graines des plantes dans lesquelles elles sont présentes. La concanavaline A (Con A) est le premier membre de cette famille depuis sa découverte en 1919. La Con A est la lectine végétale la plus populaire et la moins chère (**Pieters, 2009**).

La base du lancement de cette recherche était en raison des nombreuses utilisations des lectines et de la nécessité de les produire à moindre coût à partir de sources locales. Notre objectif principal est de :

- Choisir parmi les méthodes d'extraction réalisées, la méthode la plus optimale pour extraire les lectines des plantes endémique *Ruta montana* et *Peganum harmala*.
- Purifier les lectines des deux plantes en utilisant deux protocoles expérimentales différents.
- Détermination des caractéristiques biochimiques des deux lectines purifiées : la structure, le poids moléculaire, la spécificité et les propriétés physico-chimiques (pH, T °C).
- Evaluation de l'activité antiproliférative de deux lectines purifiées.

Une partie importante de cette thèse a été porté sur la purification et la caractérisation des lectines d'origine végétale par différents techniques, dans l'autre partie a été consacrée à l'évaluation de leur activité antiproliférative. Après avoir présenté l'objectif de notre étude et la méthodologie utilisée, l'ensemble des résultats des différentes études sera présenté. Ces résultats seront discutés plus en détails dans la partie de discussion. Enfin, une conclusion générale nous permettra de dresser le bilan des travaux effectués et de discuter des différentes perspectives qui en découlent.

*Revue  
bibliographique*

*Chapitre 1 :*  
*Les lectines*

## 1. Généralité

«Lectine» vient du mot latin «legere», qui signifie «sélectionner», les protéines qui peuvent agglutiner les globules rouges avec une spécificité de sucre connue sont appelées «lectines». Les lectines sont des protéines / glycoprotéines, qui ont au moins un domaine non catalytique qui présente une liaison réversible à des monosaccharides ou oligosaccharides spécifiques (**Lam et Ng, 2011**). Selon cette définition, toutes les protéines végétales possédant au moins un domaine non catalytique qui se lie de manière réversible à un mono- ou oligosaccharide spécifique sont considérées comme des lectines (**Figure 1**). Les protéines, qui sont structurellement et évolutivement apparentée aux lectines mais ils ne possèdent pas de sites actifs de liaison aux glucides ne répondent pas à ce critère et ne sont donc pas considérées comme des lectines (**Peumans et al., 2001**).

Les lectines diffèrent des enzymes car elles ne modifient jamais les propriétés des glucides liés. Ils sont également différents des anticorps car ils ne sont pas produits par le système immunitaire. Les lectines peuvent provoquer une agglutination cellulaire et une précipitation des glycoprotéines ou des glucides (**Sharon et Lis, 2001**). Les lectines ayant une spécificité spécifique pour les glucides ont été purifiées à partir de divers tissus végétaux et d'autres organismes. Ils peuvent être classés en fonction de leur spécificité glucidique (**Lam et Ng, 2011**).

Ce sont des macromolécules omniprésentes répandues dans la nature, non seulement chez les plantes, mais aussi chez les animaux et les micro-organismes (**Esko et Sharon, 2009**), Elles possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment : l'agglutination des cellules, l'activité mitogène (stimulation lymphocytaire), les effets mimétiques des hormones, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, les actions antivirales et les effets immunologiques. Ces diverses propriétés sont à la base de l'utilisation des lectines dans les domaines biomédical (hématologie, immunologie, oncologie, biologie cellulaire) et agronomique (défense des plantes contre les agents pathogènes) (**Meite et al., 2006**). Beaucoup des lectines sont résistantes à la dégradation par le chauffage et les enzymes digestives, et elles peuvent se lier à la surface des cellules épithéliales du système digestif en raison de leur forte affinité pour les glucides, et peuvent entraîner des réactions toxiques avec des changements de perméabilité intestinale (**Miyake et al., 2007; Menard et al., 2010**).

Les lectines sont classées parmi les substances antinutritionnelles naturelles, les lectines ont des effets sur les organes internes, l'activité de certains enzymes et partant sur l'organisme entier. Concernant les organes internes, les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et du thymus. Par ailleurs les lectines réduisent l'activité des enzymes de la bordure en brosse de l'intestin grêle telles que l'entérokinase, l'aminopeptidase, la maltase et la sucrase. Les lectines peuvent également affecter de façon relative l'activité des enzymes sériques telles que l'alkaline phosphatase. Au niveau de l'organisme entier, les lectines causent une réduction voire un arrêt de croissance conduisant à la mort des animaux expérimentaux. Cependant, les effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est fonction de la température et de la durée du traitement. Ces propriétés des lectines ont néanmoins favorisé l'énoncé de théories en faveur d'un lien de causalité entre les caractéristiques biologiques (système ABO) et les régimes alimentaires individuels. (Meite *et al.*, 2006).

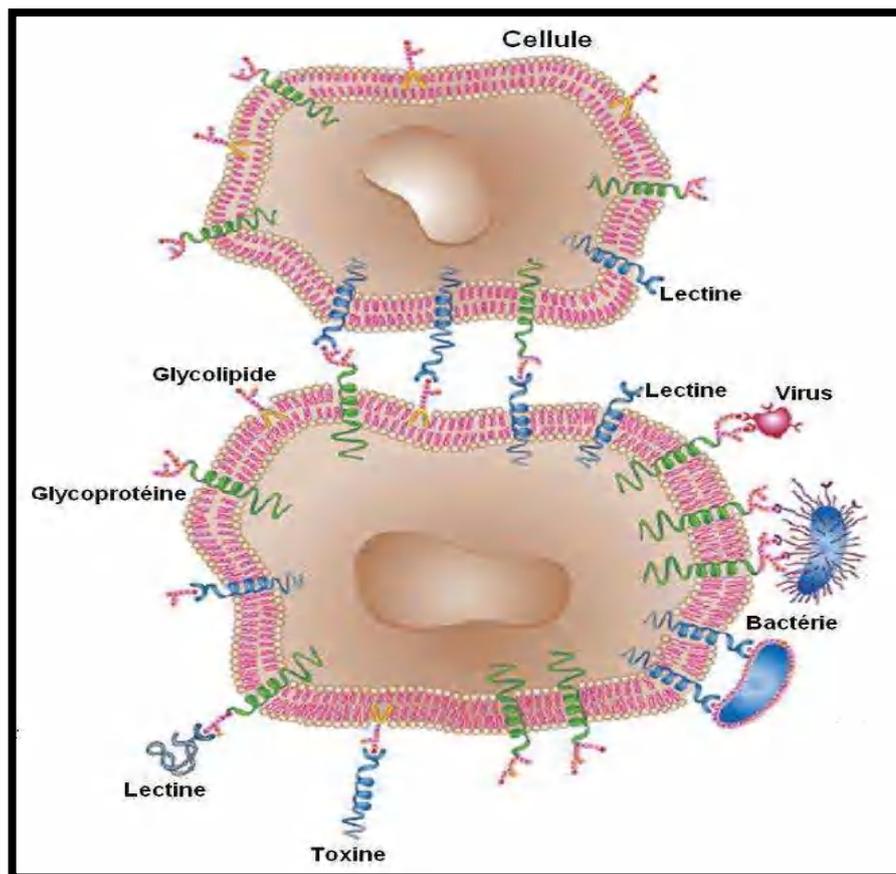


Figure 1 : Représentation schématique de l'interaction lectines-glycides (Sharon et Lis, 2004).

## **2. Les types des lectines**

La découverte des lectines a été faite à partir des plantes il y a plus de 100 ans. Mais, elles sont retrouvées aussi largement dans la nature chez les animaux, sur les microbes tels que les virus et les bactéries.

### **2.1. Lectine animal**

Les lectines animales présentes dans différents tissus d'insectes, de poissons et de mammifères. Sont des protéines de liaison aux glucides avec des séquences d'acides aminés très variables qui sont capables de se lier aux structures complexes des glucides via CRD. Chaque lectine animale possède son propre CRD avec un motif de séquence identique de 115 à 130 résidus d'acides aminés (**Kilpatrick, 2002**). En 1988, Kurt Drickamer a lancé cette initiative en identifiant des motifs de séquence caractéristiques dans les domaines de liaison aux glucides des lectines qui nécessitaient soit du calcium soit un environnement réducteur pour lier leurs ligands, ce qui a conduit à proposer que ces lectines soient classées en types C et S, respectivement (**Kilpatrick, 2002 ; Gerardo et al., 2008**). Les lectines type C tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin d'ions calcium pour leur activité. De plus, ils sont tous extracellulaires, bien qu'ils lient une diversité de sucres. En revanche, bien que les lectines de type S (actuellement appelées galectines) se trouvent à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, elles dépendent souvent d'agents réducteurs (thiols) pour une pleine activité. Ils ne présentent aucune exigence pour les cations divalents et ils se lient tous aux  $\beta$ -galactosides (**Drickamer, 1993**). Cependant, avec l'augmentation du nombre de séquences décrites, cette classification a changé et a inclus plusieurs nouveaux groupes (**Dias et al., 2015**). La classification est basée sur les données de séquence et la fonction biologique. Un grand nombre de lectines animales n'ont été identifiées qu'en termes d'activité et de spécificité glucidique. Dans la plupart des cas, on en sait peu sur leur fonction biologique ou leur classification évolutive. Récemment, un nombre croissant d'études ont étudié le rôle des lectines chez les animaux en utilisant des techniques biologiques immunologiques et moléculaires (Drickamer et Taylor, 1993). Il existe plusieurs familles en fonction des motifs de la séquence CRD et des besoins en cations, qui sont des lectines de type C, I, P, S, des pentraxines, des lectines de truite, des discoïdines, de la calnexine et de la calréticuline, ERGIC-53 et VIP-36, des fucolectines, des lectines d'annexine et lectine du type fibrinogène (**Kilpatrick, 2002**). Malgré une connaissance accrue de leurs structures et fonctionnalités, les lectines animales sont encore plus compliquées que les lectines végétales. La grande famille des lectines de type C comprend les collectines, les sélectines, les récepteurs

endocytiques et les protéoglycanes. Ils diffèrent considérablement dans les types de glycanes qu'ils reconnaissent avec des affinités élevées en raison de leurs domaines de reconnaissance des glucides. (Yilmaz et Becer, 2015).

Chez les animaux, les lectines remplissent diverses fonctions biologiques, de l'adhésion cellulaire à la synthèse des glycoprotéines, en plus de contrôler le niveau de protéines dans le sang. Certains récepteurs de lectine de cellules hépatiques de mammifères seraient responsables de l'élimination de certaines glycoprotéines du système circulatoire. Les lectines animales régulent également la différenciation et la formation d'organes. Jouent un rôle vital dans la migration des lymphocytes de la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes, ainsi que dans les métastases des cellules cancéreuses, et le ciblage des médicaments (Hassan *et al.*, 2015). Les lectines animales ont des rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. Lors du processus de fertilisation, le premier contact entre les cellules reproductrices fait intervenir une reconnaissance spécifique entre une lectine du spermatozoïde (spermadhésine) et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). Ils participent au développement, à la réponse immunitaire, à l'opsonisation, à la phagocytose et à l'activation de la voie du complément (Gabius, 1997).

## **2.2. Lectine bactérienne**

L'existence de lectines exprimées par des bactéries est connue depuis la première moitié du 20<sup>e</sup> siècle. Beaucoup de ces lectines bactériennes ont été initialement détectées sur la base de leur capacité à agglutiner les globules rouges. Cependant, leur fonction principale est de faciliter l'adhésion des bactéries aux cellules hôtes ou de contribuer aux interactions entre les bactéries, ce qui est crucial pour la formation de superstructures bien organisées telles que les biofilms (Kolbe *et al.*, 2019). L'adhésion bactérienne, qui est un mécanisme important pour la fixation des bactéries sur les cellules, est basée sur les interactions moléculaires entre les glucides de surface cellulaire de l'hôte et les lectines bactériennes spécialisées spécifiques aux glucides (Yilmaza et Becer, 2015). Chez les bactéries, elles sont utilisées pour la reconnaissance et l'adhésion du pathogène à la cellule hôte. Elles sont classées en trois familles : les adhésines (lectines associées aux organelles telles les pili ou les flagelles), les lectines associées à des toxines et les lectines solubles (Imberty *et al.*, 2005). Contrairement aux lectines eucaryotes, les lectines bactériennes se présentent généralement sous la forme d'appendices protéiques filamenteux se projetant à

leur surface, appelés fimbriae et pili (**Esko et Sharon, 2009**). Les fimbriae sont présentes en grand nombre (100–400) sur les surfaces bactériennes, ont un diamètre de 5–7 nm et peuvent s'étendre sur des centaines de nanomètres de longueur. Le pili, en revanche, est plus épais, plus long et moins abondant. La plupart des bactéries codent pour plusieurs lectines, chacune ayant des spécificités glucidiques différentes (**Esko et Sharon, 2009**). Les Fimbriae sont une lectine semblable à des cheveux qui est présente sur les bactéries. L'adhésion bactérienne médiée par les Fimbriae est si importante parce que les  $\alpha$ -D-mannosides avec un fragment aglycone aromatique présentent une affinité améliorée pour la lectine bactérienne et une puissance accrue en tant qu'inhibiteurs de l'adhésion bactérienne médiée par les Fimbriae de type 1 aux surfaces (**Sperling et al., 2006**). La pathogénicité des microorganismes (virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes) fait intervenir la reconnaissance moléculaire spécifique entre des lectines du pathogène, et des sucres présents sur la surface des cellules hôtes. A titre d'exemple, les interactions sucre-lectine interviennent dans l'adhésion de pathogènes sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Sharon, 1996**). Ce processus d'adhésion doit être accompli par des bactéries pour l'arrangement sur surfaces cellulaires de l'hôte en raison de la résistance aux mécanismes de défense naturels. Une adhérence stable peut conduire à la formation de biofilms bactériens, ce qui s'accompagne d'avantages vitaux pour les colonies microbiennes mais d'inconvénients pour l'hôte. Les Fimbriae sont des outils d'adhésion des bactéries particulièrement efficaces pour jouer le rôle de médiateur de la colonisation de diverses surfaces biotiques et abiotiques (**Sperling et al., 2006**). Les protéines de liaison aux glucides provenant de bactéries pathogènes, telles que les lectines, les adhésines ou les toxines, sont des modèles intéressants car, elles ont la capacité de reconnaître spécifiquement les oligosaccharides complexes présents sur les tissus hôtes (**Topin et al., 2013**).

Parmi les glycoconjugués humains qui peuvent être ciblés par les lectines bactériennes, les antigènes A, B et H sont des oligosaccharides fucosylés complexes présents sur les cellules endothéliales et les érythrocytes de tous les individus du groupe sanguin A, B ou O, respectivement (**Watkins et Morgan, 1952**). Certaines lectines bactériennes sont également connues pour agir comme des toxines. La toxine coquelucheuse sécrétée, par exemple, est une lectine et un facteur de virulence important de *Bordetella pertussis*, l'agent pathogène bactérien responsable de la coqueluche (maladie respiratoire) (**Witvliet et al., 1989 ; Sandros et al., 1994**).

### **2.3. Les lectines des champignons**

Les champignons expriment des niveaux élevés de lectines en tant que protéines de stockage, qui auraient un rôle potentiel dans la défense, similaires aux lectines végétales (Peumans, et van Damme, 1995 ; Singh *et al.*, 2010 ). La première lectine de champignon «phalline» a été décrite dans *Amanita phalloides*, un agent hémolytique. Environ 105 lectines ont été identifiées dans diverses espèces de champignons (Hassan *et al.*, 2015). Le plus grand nombre de lectines a été identifié à partir de *Lactarius* suivi de *Pleurotus*, *Agaricus*, *Amanita* et *Boletus*. Il est intéressant de noter qu'il existe un certain nombre d'espèces de champignons dont plus d'une lectine a été isolée, par exemple *Coprinus cinereus*, *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe cylindracea*, *Laccaria amethystina* et *Schizophyllum commune* (Hassan *et al.*, 2015). De plus, ils jouent un rôle important dans les associations symbiotiques entre les champignons et d'autres organismes, comme dans les mycorhizes et les lichens, et dans les interactions cellulaires en ce qui concerne la floculation, l'agrégation mycélienne et l'accouplement (Swamy *et al.*, 2004 ; Varrot *et al.*, 2013). Les lectines de champignons isolées de différentes espèces varient en masse moléculaire, en nombre de sous-unités et en spécificité glucidique (Singh *et al.*, 2010), mais des lectines aux propriétés biochimiques très différentes ont également été isolées d'une seule espèce (Wang *et al.*, 1995 ; Kawagishi *et al.*, 1997). Les lectines ont été purifiées à partir de différentes parties du champignon, y compris les chapeaux, les tiges et les mycéliums, et les niveaux d'expression peuvent varier en fonction de l'âge du corps du fruit (Mikiashvili *et al.*, 2006) et de la saison (Guillot et Kanska, 1997). Par exemple, la quantité de lectine de *Laccaria laccata* est plus élevée dans les champignons adultes alors que l'expression de la lectine d'*Amanita muscaria*, *Tricholomopsis rutilans* et *Lactarius rufus* est plus élevée dans les jeunes champignons. De même, nous avons signalé des champignons collectés en Australie, dans lesquels l'expression de la lectine varie en fonction des influences environnementales, telles que la saison, le lieu et l'année, ainsi qu'en fonction des propriétés macroscopiques, telles que l'âge et la croissance du mycélium (Rouf *et al.*, 2011). Les lectines présentes dans les extraits des espèces fongiques *Penicillium corylophilum*, *Penicillium expansum* et *Penicillium purpurogenum* ont montré une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les lectines ont également démontré une activité antibactérienne, inhibant la croissance d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Singh *et al.*, 2013). Une lectine fongique provenant de fructifications du champignon *Sparassis latifolia* a démontré une activité antibactérienne contre *Escherichia*

*coli* et des souches résistantes de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi qu'une activité antifongique sur des espèces de *Candida* et de *Fusarium* (**Chandrasekaran et al., 2016**).

#### **2.4. Les lectines végétales**

Les lectines végétales se trouvent principalement dans les graines (**Cavada et al., 1998**) et, dans une moindre mesure, dans d'autres tissus tels que les feuilles, l'écorce, les baies, les racines et les fleurs (**Martínez et Córdoba, 2000; Naeem et al., 2001; Mishra et al., 2004**). Certains d'entre eux sont vacuolaires tandis que d'autres tels que la lectine de graine *Datura* se liant à la chitine sont extracellulaires (**Chrispeels et Raikhelb, 1991**). A l'intérieur des cellules, ils sont présents dans les corps protéiques produits dans le réticulum endoplasmique, transportés via le complexe de Golgi et issus de la subdivision vacuole. Plusieurs lectines (par exemple, de haricot, de soja, de pois et de fèves) s'accumulent à des taux élevés dans les vacuoles de leurs cotylédons (8% à 10% de la protéine totale) mais à des taux faibles dans d'autres tissus embryonnaires (**De Hoff et al., 2009**). Ces lectines sont synthétisées au cours du développement des graines avec les protéines de stockage des graines les plus abondantes. Pendant la germination et la croissance des semis, les protéines de stockage et les lectines sont décomposées pour fournir des acides aminés aux semis en croissance (**Chrispeels et Raikhelb, 1991**). Les lectines peuvent également être trouvées dans le cytoplasme et l'espace intercellulaire de certaines cellules. La quantité de lectines produites varie d'un individu à l'autre (**Chrispeels, 1984; Etzer, 1985; Rüdiger et Gabius, 2001**).

Des nombreuses fonctions biologiques différentes des lectines dans les plantes n'ont pas encore été étudiées en détail, il est connu qu'elles jouent un rôle important dans les activités biologiques externes et internes des plantes telles que la protection de la plante contre les attaques fongiques et les animaux herbivores, le stockage des protéines (**Sharon N , 1993**). Les lectines végétales peuvent également jouer le rôle de médiateurs de la symbiose plante-microorganisme (**Limpens et Bisseling, 2003**). D'autres fonctions ont été démontrées pour les lectines, comme dans les phénomènes liés à la défense et / ou la régulation et la signalisation cellulaire , les molécules impliquées dans l'organisation cellulaire, l'embryomorphogenèse, la phagocytose, la protection cellulaire, les mécanismes de croissance de la paroi cellulaire, la mitose induite, la reconnaissance pollinique et, en

particulier, sont considérés comme participant activement au transport des glucides et à leur établissement dans les tissus végétaux (**Santos *et al.*, 2014**).

### **3. Classification des lectines végétales**

#### **3.1. Classification selon spécificités aux saccharides**

Les lectines sont souvent classées en fonction de leurs spécificités aux saccharides en cinq groupes : i) le glucose / mannose ; (ii) le galactose et la N-acétyl-D-galactosamine; (iii) N-acétylglucosamine; (iv) L-fucose, et (v) Acide sialique (**Himansha et Sarathi, 2012**)

Bien que les lectines de la même catégorie (par exemple, les lectines spécifiques au galactose) montrent des préférences de liaison au sucre considérablement différentes. De plus, un nombre croissant de lectines qui ne présentent jamais d'affinité élevée pour les saccharides simples ont été trouvées.

#### **3.2. Classification selon leur structure quaternaire**

Lectines sont classé sur la base de la structure globale (**Figure 2**). Selon ce mode de classification, les lectines végétales sont largement divisées en quatre catégories.

##### **3.2.1. Merolectine**

Protéines qui consistent exclusivement en un seul domaine de liaison aux glucides. Ce sont de petites protéines avec polypeptide unique qui sont incapables de précipiter les glyco-conjugués ou d'agglutiner les cellules en raison de leur nature monovalente. Par exemple, la petite protéine de liaison à la chitine du latex de l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est une mérolectine. L'hévéine est un seul domaine de liaison aux glucides dans cette protéine (**Van Parijs *et al.*, 1991**).

##### **3.2.2. Hololectines**

Les hololectines ont au moins deux domaines de liaison glucidiques identiques ou très similaires. Cette classe comprend toutes les lectines qui ont plusieurs sites de liaison et elles provoquent l'agglutination des cellules et la précipitation des glycoconjugués. (**Mishra *et al.*, 2019**).

### 3.2.3. Superlectines

Les superlectines sont une classe distincte d'hololectines et sont également considérées comme un groupe spécial de chimérolectines. Ils possèdent deux domaines de liaison aux glucides non identiques qui reconnaissent des sucres structurellement différents. Par exemple, la lectine de bulbe de tulipe TxLCI, qui contient deux domaines de liaison aux glucides différents, qui se lie spécifiquement au mannose et aux résidus de sucre GalNAc (Van Damme *et al.*, 1997).

### 3.2.4. Chimerolectins

Ce sont des protéines composées d'un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides et d'un domaine ayant une activité enzymatique. Le domaine enzymatique fonctionne indépendamment du domaine de liaison aux glucides. Sur la base du nombre de sites de liaison au sucre présents, la chimérolectine peut agir soit comme des mérolectines, soit comme des hololectines. Par exemple, comme les protéines d'inactivation des ribosomes de type 2 (RIP) sont multivalentes, elles agglutinent facilement les cellules alors que les chitinases végétales de classe I comme les monovalentes n'ont pas cette activité (Barbieri *et al.*, 1993; Collinge *et al.*, 1993).

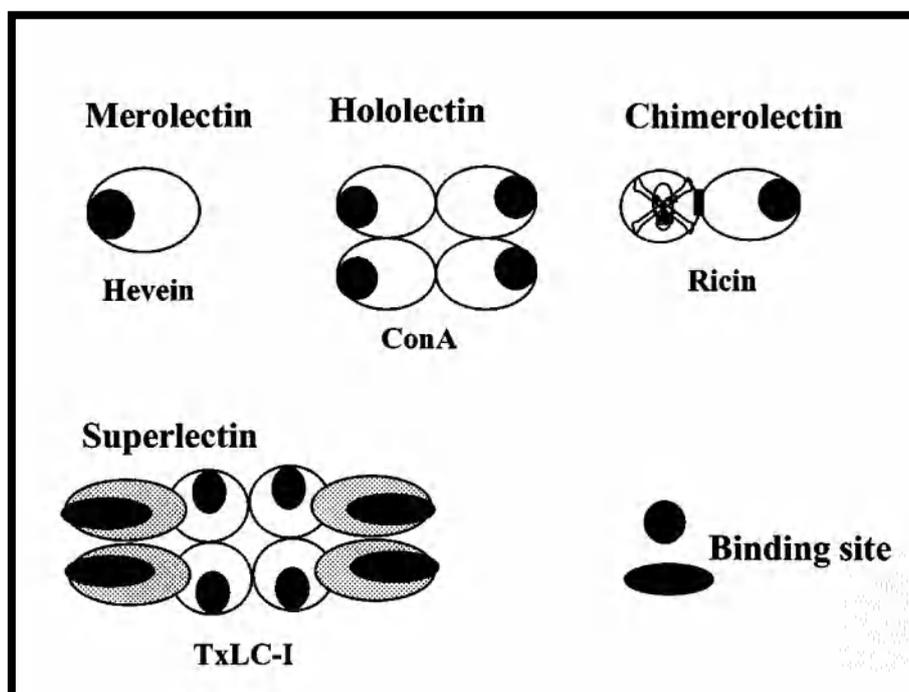


Figure 2 : Schéma représente des mérolectines, hololectines, chimérolectines et superlectines (Van Damme *et al.*, 1998)

### **3.3. Classification selon la phylogénie et la similarité des structures**

Ils peuvent également être regroupés en différentes familles selon certaines caractéristiques communes, (lectines de légumineuses, protéines d'inactivation des ribosomes de type II, lectines de liaison au mannose des monocotylédones et autres lectines).

#### **3.3.1. Amaranthine**

Les lectines appartenant à cette famille sont exclusivement dérivées de graines du genre *Amaranthus*. Le membre le plus important de cette famille a été sélectionné à partir de graines d'*Amaranthus caudatus*, d'où le nom d'amarante. Les lectines de cette famille se composent de deux sous-unités d'environ 33 kDa qui se ressemblent complètement. (Rinderle *et al.*, 1989). L'amaranthine est considérée comme une lectine spécifique de GalNAc présentant une affinité plus élevée pour le disaccharide antigène T Gal  $\beta$  (1,3) GalNAc (Rinderle *et al.*, 1989 ; Rinderle *et al.*, 1990).

#### **3.3.2. Lectines liant la chitine**

Toutes les protéines contenant au moins un domaine de l'hévéine sont classées comme lectines de liaison à la chitine. Les groupes Nagata et Levine ont été les premiers à isoler et caractériser la lectine se liant à la chitine, l'agglutinine de germe de blé (WGA) (Nagata et Burger, 1972 ; Levine *et al.*, 1972). Cette famille de lectines comprend des mérolectines et différents types de chiméroléctines en plus des hololéctines. La lectine de chitine la plus simple est composée d'un seul domaine d'hévéine. Un domaine d'hévéine complet contient 43 résidus d'acides aminés avec 4 ponts disulfures intrachaîne. Des lectines de liaison à la chitine avec deux protomères de domaine sont observées dans l'agglutinine monomère d'*Urtica dioica* (UDA) tandis que des lectines de liaison à la chitine dimérique se trouvent dans *Viscum album* (Itakura *et al.*, 2017). Trois protomères de domaine ont été trouvés exclusivement dans les lectines de racine de *Phytolacca americana* (Yamaguchi *et al.*, 1995). De plus, les lectines des espèces de graminées contiennent quatre protomères du domaine de l'hévéine. (Raikhel et lee, 1993). Les sites de liaison aux glucides de la lectine de liaison à la chitine sont complexes et se lient de préférence aux trimères ou tétramères de GlcNAc (N-acétylglucosamine). (Itakura *et al* ; 2017).

### **3.3.3. Lectines du phloème des cucurbitacées**

Les lectines du phloème des cucurbitacées sont la sous-famille des lectines liant la chitine. Ces lectines se trouvent dans le phloème de la famille des cucurbitacées. La première lectine de cette famille a été isolée de la citrouille (*Cucurbita maxima*) d'où le nom de lectine de citrouille (**Hossaini, 1968; Liu et al., 1996**). Généralement les lectines du phloème des cucurbitacées forment un dimère de masse moléculaire relative similaire et une (25 kDa chacune) ils étaient tous spécifiques des oligomères de N-acétyl-glucosamine (**Read et Northcote, 1983**).

### **3.3.4. Les lectines apparentées à la Jacaline**

Les protéines de jacaline ont été isolées pour la première fois à partir de graines de fruit du jack (*Artocarpus integrifolia*). Les lectines apparentées structurellement et évolutivement aux lectines de fruit du jack sont appelées Jacalin related lectins (**Han et al., 2018**). Jacalin related lectins sont maintenant subdivisés en deux sous-familles, les JRL spécifiques au galactose et au mannose (gJRL et mJRL, respectivement) Les lectines spécifique au galactose se composent de quatre protomères identiques. Ils sont isolées exclusivement de la famille des Moracées (**Van Damme et al., 2002 ; Azarkan et al., 2018**). Les lectines spécifiques au mannose se lient spécifiquement au mannose et au maltose et montrent une affinité élevée pour les oligomannoside, ils sont constitués de deux, quatre ou huit protomères (**Azarkan et al., 2018**)

### **3.3.5. Lectines de légumineuses**

Les lectines de légumineuses sont une famille de lectines isolées de la famille des fabacées. La famille des lectines de légumineuses est la plus grande famille de lectines végétales, et leurs propriétés physicochimiques et biologiques ont été largement étudiées. Robin, a été la première lectine de légumineuse à être isolée de l'écorce du criquet noir (*Robinia pseudoacacia*) par Power et Cambier en 1890 (**Makarim et al., 2017**). La plupart des lectines de légumineuses s'assemblent en homodimères ou homo-tétramères. Toutes les lectines de légumineuses sont constituées de protomères de 25 à 35 kDa (**Lagarda-Diaz et al., 2017**). Lectines de légumineuses se lient spécifiquement aux résidus de mannose, de glucose et de fucose (**Mishra et al., 2019**).

### **3.3.6. Lectines de liaison de mannose monocotylédones**

La lectine de liaison au mannose monocotylédone est une famille de lectines spécifiques pour le mannose. On les trouve exclusivement dans les plantes monocotylédone (**Chandra et al., 1999**). La première lectine de liaison au mannose de monocotylédone a été isolée sous forme de bulbe de perce-neige (*Galanthus nivalis*), d'où le nom de GNA (**Van Damme et al., 1987**). Il est composé de quatre protomères identiques. (**Van Damme et al., 1987**). Mannose-binding lectins ont été trouvées dans seulement cinq familles : Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Orchidaceae et Liliaceae (**Barre et al., 1996**).

### **3.3.7. Protéines d'inactivation des ribosomes (RIP)**

Les RIP pourraient inactiver catalytiquement les ribosomes eucaryotes qui inhibent la synthèse des protéines lors de la traduction (**De Virgilio et al., 2010**). Les RIP des plantes ont été divisés en trois types principaux en fonction de leurs propriétés physiques, y compris le type I, le type II et le type III (**De Virgilio et al., 2010**).

Les RIP de type I sont les RIP les plus largement distribués, et ils sont composés d'une protéine à chaîne polypeptidique (chaîne A) unique d'environ 30 kDa avec une activité N-glycosidase (**Zhu et al., 2018**). Les RIP de type II sont des protéines polypeptidiques à deux chaînes, qui incluent un domaine enzymatiquement actif (chaîne A) d'environ 30 kDa, il est structurellement similaire aux RIP de type I, il possède une activité N-glycosidase qui coupe les résidus adénine des ARN ribosomiques et cause l'inhibition de la synthèse protéique, et un domaine de liaison légèrement plus grand (chaîne B) d'environ 35 kDa, il contient les propriétés des lectines, il a une forte affinité pour les fragments de sucre affichés à la surface des cellules. La chaîne B participe à l'internalisation et à l'adressage de la chaîne A vers le système endosomal. La chaîne A est ensuite transloquée dans le cytoplasme. (**Hartley et Lord, 2004 ; Zhu et al., 2018**). Les RIP de type III contiennent un domaine N-terminal qui est corrélatif au domaine A des RIP et fusionné à un domaine C-terminal fonctionnel inconnu (**Zhu et al., 2018**). Un grand nombre des RIP de type II ont montré une spécificité vis-à-vis du galactose, GalNAc ou Gal / Résidus de GalNAc (**Mishra et al., 2019**).

## **4. Fonction biologiques des lectines végétal**

Depuis les années 1960, les lectines végétales ont été largement utilisées comme outils précieux dans la recherche biomédicale, car leurs interactions avec les glycanes liés

aux récepteurs à la surface des cellules joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques et pathologiques (Souza *et al.*, 2013).

#### 4.1. Activité antibactérienne

Erzler en 1986 a rapporté que les lectines des plantes supérieures se défendent contre les bactéries et les champignons pathogènes en reconnaissant et en immobilisant les micro-organismes infectieux par liaison, empêchant ainsi leur croissance et leur multiplication ultérieures. Le rôle des lectines comme celles des Amarante herbacées dans l'inhibition des bactéries et des champignons est connu depuis longtemps (Islam et Khan, 2016). L'interaction de la lectine avec les acides téichoïque et téichuronique, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides présents dans les parois cellulaires bactériennes sont responsables de son activité antibactérienne (Ratanapo *et al.*, 2001). De nos jours, les produits naturels qui font partie de notre alimentation quotidienne sont les meilleurs candidats pour découvrir de nouveaux médicaments antibactériens (Patel *et al.*, 2012). À cet égard, les lectines sont devenues l'un des intérêts les plus ciblés des biologistes dans leurs recherches et leurs applications en agriculture et en médecine (hamed *et al.*, 2017).

Lectines végétales telles que celles de *Datura stramonium*, *Robinia pseudoacacia* et *Dolichos biflorus* agglutinent les cellules bactériennes streptococciques (Kellens *et al.*, 1994) qui les empêchent d'adhérer à la surface des cellules humaines. L'inhibition des interactions glucides-lectines par les médicaments antiadhésifs est une nouvelle approche thérapeutique anti-infectieuse, en particulier à la lumière de l'augmentation des taux de résistance bactérienne aux antibiotiques traditionnels (Kolbe *et al.*, 2019). Les  $\alpha$ -D-mannosides contenant des aglycons aromatiques, qui agissent comme des antagonistes de la FimH, par exemple, ont été utilisés avec succès pour réduire de manière significative la gravité des infections à *E. coli* des voies urinaires chez la souris (Mydock-McGrane *et al.*, 2016). De plus, des essais cliniques préliminaires avec le D-mannose indiquent des effets prometteurs de ce monosaccharide sur le contrôle des infections des voies urinaires chez l'homme, vraisemblablement par l'interférence avec l'adhésion pathogène-hôte associée à la lectine (Kranjčec *et al.*, 2014). Une lectine de liaison à la chitine isolée d'un cultivar bangladais de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) a montré une activité antibactérienne chez *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Shigella boydii*, et a empêché la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Hasan *et al.*, 2014). La lectine de graines d'*Apuleia leiocarpa* (ApulSL) a démontré des effets bactériostatiques sur

les bactéries Gram-positives *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Bacille cereus*, et sur les bactéries Gram-négatives *Xanthomonas campestris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enteritidis*. ApulSL était également bactéricide contre trois variétés de *Xanthomonas campestris* (Carvalho *et al.*, 2015)

#### **4.2. Activité antifongique**

Malgré le grand nombre de lectines qui ont été purifiées, seules quelques-unes d'entre elles ont manifesté une activité antifongique. Les lectines végétales ne peuvent pas se lier aux glycoconjugués sur les membranes fongiques ou pénétrer le cytoplasme des cellules en raison de la présence d'une paroi cellulaire épaisse et rigide. Il est peu probable que les lectines inhibent directement la croissance fongique en modifiant la structure et / ou la perméabilité de la membrane fongique. Cependant, il peut y avoir des effets indirects produits par la liaison des lectines aux glucides sur la surface de la paroi cellulaire fongique (Islam et Khan, 2016). En raison de leur spécificité, les lectines se liant à la chitine semblaient susceptibles d'avoir un rôle dans la défense de la plante contre les champignons (Peumans et Van Damme, 1995).

Des études *in vitro*, démontrant que le WGA a inhibé la germination des spores et la croissance des hyphes de *Trichoderma viride*, ont fortement soutenu l'hypothèse de le rôle antifongique des lectines végétales se liant à la chitine, jusqu'à ce qu'il soit démontré que l'inhibition de la croissance fongique était due à la contamination de chitinases dans la préparation de lectine (Schlumbaum *et al.*, 1986). Une preuve plus définitive a suivi lorsqu'il a été démontré que la lectine de L'ortie piquante sans chitinase se liant à la chitine (lectine *Urtica dioica*) a entravé la croissance fongique. La synthèse de la paroi cellulaire a été interrompue en raison de la synthèse et / ou du dépôt de chitine atténués (Van Parijs *et al.*, 1991). Plusieurs d'autres lectines végétales inhibent la croissance fongique. Le premier groupe comprend de petites mérolectines se liant à la chitine avec un domaine de liaison à la chitine, par exemple l'hévéine du latex d'hévéa (Van Parijs *et al.*, 1991). Une lectine spécifique au galactose des racines secondaires de légumineuses *Bauhinia monandra* (BmoRoL) a montré une activité antifongique sur les espèces phytopathogènes de *Fusarium*, avec un effet maximal contre *Fusarium solani* (Souza *et al.* 2011). Helja est une lectine liée au jacalin, spécifique au mannose, obtenue à partir de semis de tournesol qui peuvent

agglutiner les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et inhiber la croissance pathogène de *Candida tropicalis* et de genres *Pichia* (**Regente et al., 2014**).

### **4.3. Activité anti-insecte**

Les lectines ont été suggérées comme l'un des agents prometteurs contre les insectes ravageurs et ont été transformées avec succès dans une variété de cultures, notamment le blé, le riz, le tabac et les pommes de terre. En général, il semble que la mise en œuvre à grande échelle de plantes transgéniques tolérantes aux insecticides et aux herbicides ne présente pas d'effets négatifs considérables sur l'environnement. De plus, au moins certaines plantes transgéniques peuvent améliorer les environnements correspondants et la santé humaine car leur production réduit considérablement la charge d'insecticides et d'herbicides chimiques (**Velkov et al., 2005**). Les lectines démontrent une activité anti-insecte. Ils augmentent la mortalité ou retardent le développement des insectes. Lorsqu'elle est incorporée dans un régime artificiel, la lectine *Arisaema jacquemontii* a nui au développement des larves de *Bactrocera cucurbitae* (**Kaur et al., 2006a**). La lectine d'*Arisaema helleborifolium* a montré une activité anti-insecte envers les larves du deuxième stade larvaire de *Bactrocera cucurbitae* (**Kaur et al., 2006b**). La propriété insecticide des lectines peut être due à l'orchestration de l'activité enzymatique des larves. Après traitement avec différentes lectines, l'activité des estérases chez les larves a augmenté tandis que l'activité de la phosphatase acide et de la phosphatase alcaline a diminué. La lectine de *Dioscorea batatas* a inhibé l'émergence des larves d'*Helicoverpa armigera* chez les adultes en se liant avidement à la bordure des brosses larvaires et à la membrane péritrophe (**Ohizumi et al., 2009**). La lectine d'*Arum maculatum* a fait succomber *Lipaphis erysimi* et *Aphis craccivora*, en se liant aux protéines des vésicules de la membrane de la bordure de la brosse intestinale (**Majumder et al., 2005**). Lectine d'*Olnya tesota* a liée aux glycoconjugués de l'intestin moyen et aux microvilles des larves de *Zabrotes subfasciatus*. Une diminution de la ponte et un échec d'émergence des coléoptères adultes ont été observés (**Lagarda-Diaz et al., 2009**). La lectine d'*Annona coriacea* a montré une toxicité chez *Anagasta kuehniella* qui résultait apparemment d'un changement dans l'environnement de la membrane intestinale et d'une perturbation conséquente des mécanismes de recyclage des enzymes digestives en se liant aux protéines de l'intestin moyen (**Coelho et al., 2007**). La lectine de feuille de *Bauhinia monandra* a entraîné une mortalité chez *Zabrotes subfasciatus* et *Callosobruchus maculatus* lorsqu'elle a été incorporée dans un régime artificiel. La lectine de feuille de *Bauhinia monandra* a produit 40% diminution du poids des larves d'*Anagasta kuehniella*. Lectine de

feuille de *Bauhinia monandra* a liée aux protéines de l'intestin moyen de l'insecte *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2007). Les feuilles détachées des plants de tabac transgéniques exprimant les lectines d'*Allium sativum* ont réduit le gain de poids, le développement et la métamorphose des larves de *Spodoptera littoralis*. De plus, les larves ont nui au stade nymphal, entraînant une perte de poids et des anomalies létales (Sadeghi *et al.*, 2008). La production de nymphes *Rhopalosiphum maidis* a été significativement réduite sur les plantes exprimant l'agglutinine *Galanthus nivalis* (Wang *et al.*, 2005). L'agglutinine de *Galanthus nivalis* a également été retrouvée liée aux glycoprotéines présentes dans les intestins des larves d'*Adalia bipunctata*, *Chrysoperla carnea* et *Coccinella septempunctata* (Hogervorst *et al.*, 2006).

#### **4.4. Activité antivirale**

Plusieurs lectines de sources naturelles peuvent lier les glycanes aux glycoprotéines d'enveloppe des virus jouant un rôle important dans la prévention de la transmission et de la pénétration dans les cellules hôtes (Barton *et al.*, 2014 ; Akkouch *et al.*, 2015). L'activité antivirale des lectines semble dépendre de leur capacité à se lier aux oligosaccharides contenant du mannose présents à la surface des glycoprotéines d'enveloppe virale. Les agents qui interagissent spécifiquement et fortement avec les glycanes peuvent perturber les interactions entre les protéines de l'enveloppe virale et les cellules de l'hôte (Balzarini, 2006). Les protéines de liaison au sucre peuvent réticuler des glycanes sur la surface virale (Sacchetti *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2002) et empêcher d'autres interactions avec les corécepteurs. Contrairement à la majorité des thérapies antivirales actuelles qui agissent par inhibition du cycle de vie viral, les lectines peuvent empêcher la pénétration des cellules hôtes par les virus. Les lectines antivirales sont les mieux adaptées aux applications topiques et peuvent présenter une toxicité plus faible que de nombreuses thérapies antivirales actuellement utilisées. De plus, ces protéines sont souvent résistantes aux températures élevées et au pH bas, tout en étant inodores, qui sont des propriétés favorables pour les microbicides potentiels (Islam et Khan, 2016). Keyaerts *et al.*, (2007) ont décrit in vitro l'activité antivirale des lectines végétales avec une spécificité pour différentes structures de glycane contre le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV) et le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV). Le SRAS-CoV est apparu en 2002 comme une cause importante d'infection grave des voies respiratoires inférieures chez l'homme, et l'infection par le FIPV provoque une péritonite chronique et souvent mortelle chez les chats. Une collection unique de 33 lectines végétales avec différentes spécificités a été évaluée.

Les lectines végétales possédaient des propriétés antivirales marquées contre les deux coronavirus. L'activité anti-coronavirus la plus forte a été trouvée principalement parmi les lectines liant le mannose. De plus, un certain nombre d'agglutinines végétales spécifiques de galactose, N-acétylgalactosamine, glucose et N-acétylglucosamine présentaient une activité anti-coronavirale. Deux cibles d'une éventuelle intervention antivirale ont été identifiées dans le cycle de réplication du SRAS-CoV. La première cible est située au début du cycle de réplication, très probablement l'attachement viral, et la deuxième cible est située à la fin du cycle du virus infectieux (**Keyaerts et al., 2007**).

Une lectine liée à la jacaline isolée du fruit de la banane (*Musa acuminata*) nommée BanLec reconnaît les glycanes à haute teneur en mannose trouvés sur les enveloppes virales telles que le VIH-1, entraînant l'inhibition de l'entrée virale dans la cellule à des concentrations picomolaires (**Swanson et al., 2010**). D'autres lectines végétales se liant au mannose provenant des rhizomes d'*Aspidistra elatior* (AEL) ont montré une activité inhibitrice in vitro significative contre le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus Coxsackie B4 et le virus respiratoire syncytial (**Xu et al., 2015**).

#### **4.5. Activités immunomodulatrices**

Plusieurs lectines végétales exercent des activités immunomodulatrices qui sont initiées par leur interaction avec les fragments de glycane présents à la surface des cellules immunitaires. Une telle interaction peut déclencher la transduction du signal, produire certaines cytokines et induire des réponses immunitaires efficaces contre les tumeurs ou les infections microbiennes. Par conséquent, les lectines immunomodulatrices ont des applications pharmaceutiques potentielles ou peuvent aider à identifier des cibles de sucre pour de nouvelles stratégies thérapeutiques (**Souza et al., 2012**). Les réponses immunologiques et inflammatoires jouent un rôle dans la protection d'un organisme contre un agent invasif et des cellules transformées. Le système immunitaire agit de deux manières connues sous le nom de réponses immunitaires innées et adaptatives, activées par un groupe de cellules et de molécules qui favorisent l'inactivation ou la destruction d'un agent agressif (**Vitlic et al., 2014**).

Plusieurs lectines de sources distinctes ont montré des effets immunomodulateurs, tels que l'activité mitogène et l'induction de réponses T helper (auxiliaire) de type 1 (Th1), de type 2 (Th2) ou de type 17 (Th17). L'étape cruciale pour démarrer les activités immunomodulatrices des lectines est la liaison des lectines aux cibles glycanes à la surface

des cellules, qui ont le rôle de récepteurs de lectines (**Majee et Biswas, 2013**). La liaison à la lectine peut induire la réponse immunitaire par le biais de médiateurs, tels que les seconds messagers libérés de la membrane. Par exemple, le diacylglycérol et l'inositol 1,4,5-triphosphate générés par l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate; augmentation des niveaux de  $Ca^{2+}$  cytosolique; libération des spécificités des cytokines; se lier à des récepteurs répartis dans des régions ou domaines stimulateurs; cascade commencée par liaison au récepteur TCR; et d'autres mécanismes incomplètement élucidés (**Chilson et Kelly-Chilson, 1989 ; Ashraf et Khan, 2003**). L'agglutinine d'*Abrus precatorius* a été signalée comme un inducteur de la réponse immunitaire Th1 par l'activation des splénocytes et l'induction de la production de cytokines IL-2, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha\beta$ . Les formes natives et dénaturées de l'agglutinine d'*Abrus precatorius* ont également induit l'activation des cellules NK et la prolifération des thymocyte (**de Oliveira et al., 2011**). L'immunothérapie dirigée par l'hôte a été signalée comme une option intéressante pour traiter les infections microbiennes. Elle consiste à améliorer les défenses de l'hôte en augmentant l'expression des médiateurs inflammatoires et / ou en contrôlant les lésions tissulaires induites par l'inflammation. Les lectines ont été utilisées in vivo à la fois prophylactiquement et thérapeutiquement, ce qui a permis d'augmenter la survie des souris soumises à un défi microbien. D'autres études ont démontré avec succès que les lectines pouvaient être utilisées en combinaison avec des antigènes parasites afin d'induire une immunisation plus efficace (**Jandúrt et al., 2017**).

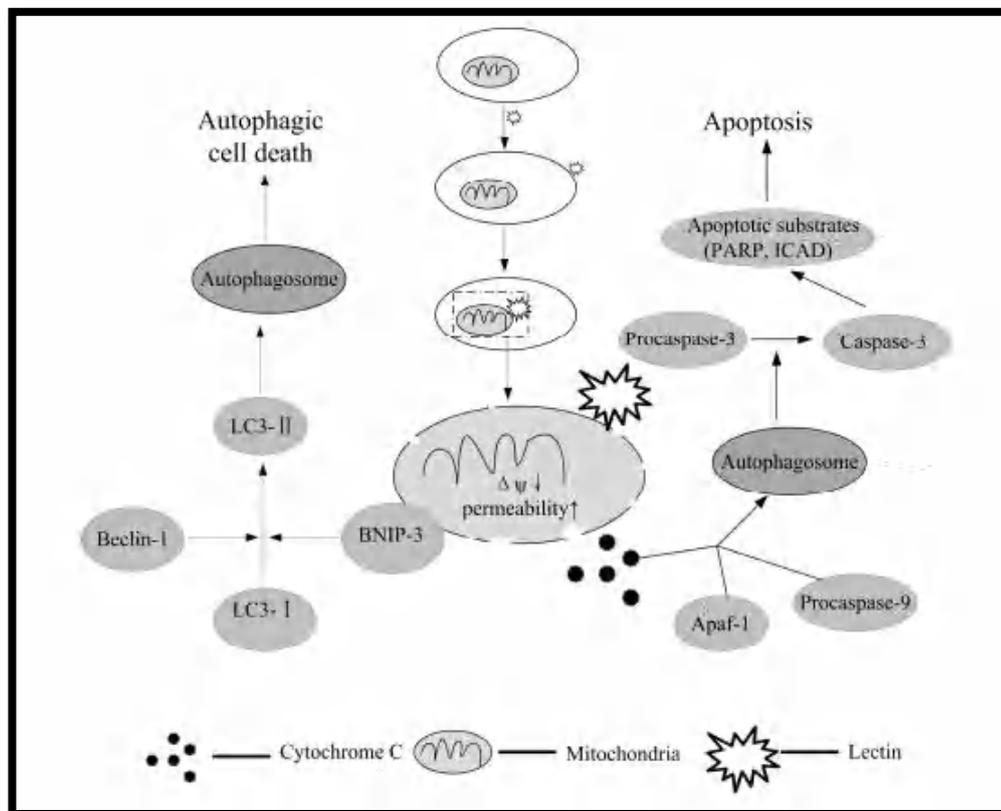
#### **4.6. Activité anticancereuses**

Le cancer est l'une des maladies les plus redoutées du 20<sup>e</sup> siècle et se propage avec une continuation et une incidence croissante au 21<sup>e</sup> siècle. Plus de 9 millions de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués et > 4,5 millions de personnes meurent d'un cancer dans le monde. En raison des effets indésirables et des complications, les agents chimiothérapeutiques actuellement disponibles ont des limites de traitement. Pour surmonter ce problème, les phytoconstituants des plantes présentant des propriétés anticancéreuses sont en train de devenir un outil dans la prévention du développement tumoral. (**Preetha et al., 2008**). À l'ère moderne, plusieurs chercheurs se sont impliqués afin de développer une thérapeutique contre le cancer en utilisant les plantes médicinales. Les lectines végétales ont attiré de plus en plus l'attention des biologistes du cancer en raison de leurs éventuelles propriétés anti-tumorales. Les lectines pourraient se lier aux cellules cancéreuses, ce qui a des effets bénéfiques pour les patients cancéreux (**Abdullaev et de Mejia, 1997**).

Le potentiel anticancéreux des lectines peut être considéré sous deux angles principaux : diagnostique et thérapeutique. Le premier est dû à leur capacité à reconnaître les cellules cancéreuses, principalement par la présence de glycosylations tumorales (**Mody et al., 1995 ; Gorelik et al., 2001**), ce qui permet un meilleur diagnostic et pronostic des tumeurs cancéreuses (**Li et al., 2009 ; Gupta et al., 2010**). Leur potentiel thérapeutique est basé sur leur activité antitumorale et leurs effets cytotoxiques par l'induction d'une mort cellulaire programmée, comme l'apoptose et l'autophagie (**De Mejía et Prisecaru, 2005 ; García-Gasca et al., 2012**) ; cependant, les mécanismes d'induction de la mort cellulaire n'ont pas été entièrement élucidés (**Jiang et al., 2015**). Des études in vitro ont trouvé un attachement préférentiel de certaines lectines aux membranes des cellules cancéreuses, un aspect pertinent car la sélectivité est recherchée comme un outil pour améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Par exemple, les lectines de gui (*Viscum album*) sont utilisées depuis des années sur le continent européen comme agents adjuvants alternatifs dans le traitement du cancer, atténuant les effets indésirables de la chimio et de la radiothérapie et améliorant la qualité de vie des patients. De plus, certaines lectines ont la capacité de se lier aux cellules de l'épithélium gastro-intestinal, présentant une résistance élevée à la protéolyse intestinale et maintenant intactes leur activité biologique et leur affinité glucidique (**Estrada-Martínez et al., 2017**). Certaines lectines végétales ont été utilisées comme outils d'étiquetage pour différencier les tumeurs malignes et bénignes et le degré de glycosylation associé aux métastases cancéreuses (**Mody et al., 1995**).

De nombreux rapports ont indiqué que les lectines végétales telles que la concanavaleine A (ConA), la lectine de *Polygonatum cyrtonema* (PCL) et les lectines de gui (ML) présentent leurs remarquables potentiels anti-tumoraux en ciblant à la fois l'apoptose et la mort cellulaire autophagique (**Zhang et al., 2012**). L'apoptose se produit par deux voies principales, une extrinsèque (déclenchée par les récepteurs de mort de la famille Fas) et la voie intrinsèque dépendante des mitochondries - qui provoque la libération du cytochrome c et active les signaux de mort sous des stimuli appropriés (**Liu et al., 2011**). De nombreuses études ont démontré que ConA peut induire la mort des cellules apoptotiques via la voie mitochondriale dans divers types de cellules cancéreuses, y compris les cellules de mélanome humain (A375) et les cellules HepG2 de carcinome hépatocellulaire humain (**Liu et al., 2009 ; Liu z et al., 2010**), et récemment, il a été signalé que ConA entraînait l'induction de l'expression de COX-2. Cette augmentation de COX-2 était corrélée à une diminution concomitante de l'Akt via la voie dépendante IKK / NF-κB dans les cellules de

glioblastome U87 (Sina *et al.*, 2010). ConA peut également induire l'apoptose en inhibant la voie de survie Akt ainsi qu'en activant la signalisation FoxO1a-Bim, à la fois dans les cellules SKOV3 du cancer de l'ovaire et les cellules MDAH041 du syndrome de Li-Fraumeni (Ruhul *et al.*, 2007). L'autophagie [un terme du grec «auto» (soi) et «phagy» (manger)] fait référence à un processus de dégradation lysosomale en plusieurs étapes conservée de manière évolutive dans laquelle les cellules dégradent les protéines à vie longue et les organites endommagés (Le terme autophagie englobe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome) (Wang *et al.*, 2011). De plus, l'autophagie est fortement régulée par un nombre limité de gènes liés à l'autophagie (Atg) qui peuvent jouer leur rôle clé dans la formation des autophagosomes et la régulation de l'autophagie, avec de nombreux liens avec les cancers. Récemment, l'activité de ConA, PCL et MLs a conduit à la mort des cellules autophagiques (Figure 3) en ciblant certaines voies de signalisation autophagiques clés dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Liu *et al.*, 2013).



**Figure 3** : Mécanismes d'apoptose et d'autophagie induits dans les cellules tumorales par les lectines (Yau *et al.*, 2015)

***Chapitre 2 :***  
***Les plantes médicinales***

## **1. *Ruta montana***

### **1.1. Description botanique**

*Ruta* « La rue » de la famille des *Rutacées*, constitué d'environ 700 espèces spontanées, présentes dans les régions tempérées et chaudes (**Daoudi et al., 2016**). La rue de montagne « *Ruta montana* L. » couramment appelée « L-Fidjel » en arabe local et « Awermî » en berbère, originaire du pourtour méditerranéen et du Moyen Orient (**Masri et al., 2015**). qui a été largement cultivée dans de nombreuses régions du monde en raison de ses propriétés médicinales (**Bouzidi et al., 2012**). *Ruta* est un genre de sous-arbustes à feuilles persistantes fortement parfumées de 20–60 cm de haut (**Hammami et al., 2015**). Caractérisé par des tiges grêles, il possède des feuilles vert glauque à blanchâtre, profondément découpées en segments linéaires, Le terminal étant un peu plus large, ses fleurs, groupées en grappes serrées, sont de petite taille et leurs pétales spatulés sont à peine dentés sur les bords (**Hammiche et al., 2013**). Le fruit, une capsule globuleuse portée par un pédoncule court, ne dépasse pas 4 mm et se termine par 4 ou 5 lobes arrondis, apparents (**Hammiche et al., 2013**).

### **1.2. Position dans la systématique**

La classification systématique de *Ruta montana* est représentée dans le **Tableau 1** (**Bonnier, 1999 ; Wiart, 2006 ; Takhtajan, 2009**).

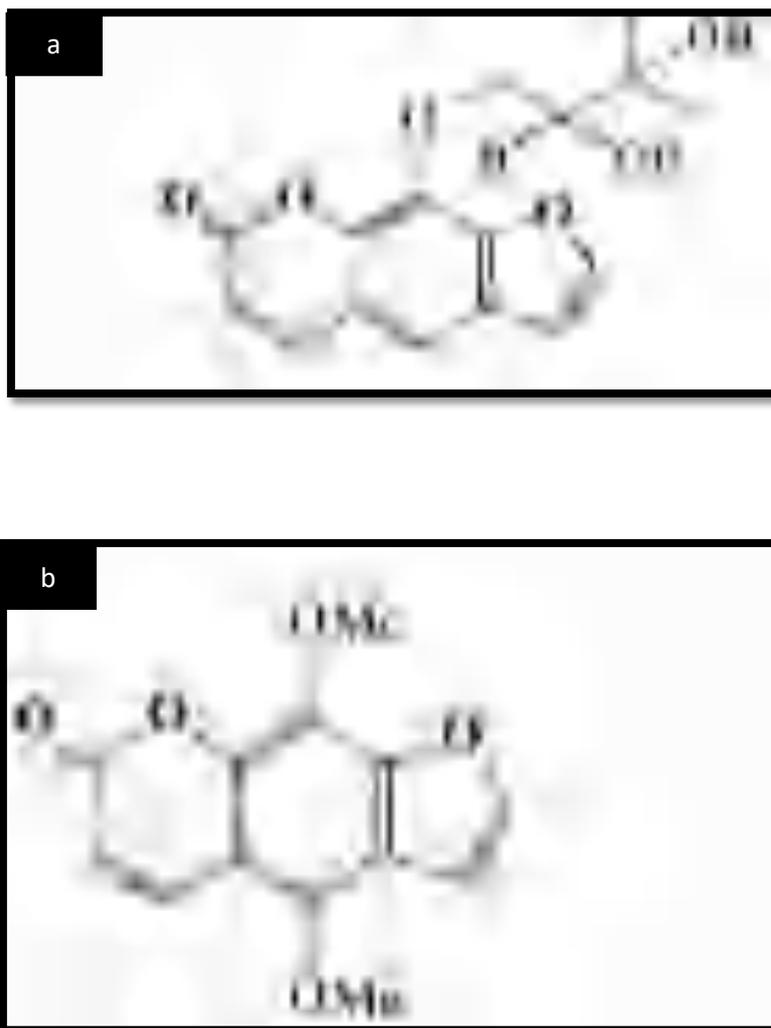
Tableau 1 : Classification systématique de *Ruta montana*.

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous règne</b>	<i>Tracheobionta</i> (plantes vasculaires)
<b>Super division</b>	<i>Spermatophyta</i> (plantes à graine)
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i> (plantes à fleurs)
<b>Sous division</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i> (dicotylédons)
<b>Sous classe</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Famille</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Ruta</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ruta montana</i> L

### 1.3. Composition chimique

Les espèces de *Ruta* (*Rutaceae*) sont des sources de différentes classes de produits naturels tels que, alcaloïdes, anthracéniques combinés, stérols et triterpènes et composés réducteurs (Daoudi *et al.*, 2016) de flavonoïdes, de coumarines, de tanins, d'huile volatile, de glycosides, de stérols et de triterpènes (El Guiche *et al.*, 2015). Kabouche *et al.*, (2003) ont aussi isolés deux furocoumarines , heraclenol et isopimpinellin (Figure 4).

L'étude de Belkassam *et al.*, (2011) a révélé que les principaux composants d'huiles essentielles sont : 2-undécanone, 2-nonanone, phtalate de monoéthylhexyle, décanone, 2-acétoxytridécanone et 2-tridécanol. Plusieurs études montrent les activités de *Ruta montana* telles que les activités antioxydantes, antimicrobiennes (Benali *et al.*, 2020) et l'activité antiacétylcholinestérase (Khadhri *et al.*, 2017).



**Figure 4** : Structure de heraclenol (a) et isopimpinellin (b) (**kabouch *et al.*, 2003**)

#### 1.4. Utilisation

Cette plante est prescrite pour soigner une panoplie de maladies : dermiques, pulmonaires, dentaires, urogénitales, traumatologiques, gastriques, neurologiques et bien d'autres affections. Elle est utilisée contre les affections respiratoires sévères, les gastralgies, les troubles intestinaux, les spasmes, les œdèmes, l'épilepsie et les troubles nerveux (**Forment et Roques, 1941**). *Ruta montana* est utilisé également en médecine populaire comme hypoglycémiant, anti rhumatismal, antihelminthique, antiépileptique et antipyrétique. Elle est également utilisée dans le traitement des maladies intestinales et hépatiques (**Bnouham *et al.*, 2002**). Elle est utilisée aussi contre les fièvres infantiles et comme médicament abortif (**Bellakhdar *et al.*, 1991**).

## **2. *Peganum harmala***

### **2.1. Description botanique**

*Peganum harmala* est une plante endémique des zones semi arides, elle se développe dans les zones sahariennes du Nord du continent africain et se prolonge jusqu'au Nord de l'Inde et au Nord de la Chine (Mandchourie) (**Abbassi et al., 2003**). Cette plante est connue sous le nom de «Harmal» en Afrique du Nord. Il appartient à la famille des Zygophyllaceae. (**Asgarpanah et Ramezanloo, 2012**). C'est une plante herbacée et glabre vivace très ramifiée qui pousse de 30 à 60 cm de haut avec de courtes racines rampantes. Il possède des feuilles étroites disposées alternativement sur des tiges charnues, vert clair et raides. Les fleurs sont solitaires, petites, jaune pâle ou blanches et à 5 pétales. Les fruits sont des capsules à 3 chambres et d'environ 6 à 10 mm de diamètre. Les fruits non mûrs sont verts et deviennent brun orangé à maturité. Les capsules contiennent plus de 50 petites graines triangulaires brun noir. (**Niroumand et al., 2015**).

### **2.2. Position systématique**

La classification systématique de *Peganum harmala* est représentée dans le **Tableau 2** (**Dunster et Dunster, 1996**).

Tableau 2 : Classification systématique de *Peganum harmala*.

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous règne</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapinales</i>
<b>Famille</b>	<i>Zygophyllaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Peganum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Peganum harmala</i> L

### 2.3. Composition chimique

Les composés phytochimiques connus de *Peganum harmala* sont les alcaloïdes, les flavonoïdes et les anthraquinones (Bukhari *et al.*, 2008; Sharaf *et al.*, 1997; Pitre et Srivastava, 1987). Les alcaloïdes les plus importants de *Peganum harmala* sont les dérivés bêta-carbonylés tels que l'harmaline, l'harmalol, la peganine, l'isopéganine, la désoxyisopéganine, ainsi que des dérivés de quinazoline tels que la vasicinone, la vasicine et la désoxyvasicinone (Motamedifar *et al.*, 2016). Les graines et les racines contiennent les niveaux les plus élevés d'alcaloïdes avec de faibles niveaux dans les tiges et les feuilles et absents dans les fleurs. L'harmine et l'harmaline (Figure 5) s'accumulent dans les graines sèches à 4,3 et 5,6% (p / p), respectivement, l'harmalol à 0,6% et la tétrahydroharmine à 0,1% (p / p) (Herraiz *et al.*, 2010). Elle a également des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, antioxydantes, antidiabétiques, antitumorales, antileishmaniales, insecticides et cytotoxiques et des effets hépatoprotecteurs et antinociceptifs (Jinous et Ramezanloo, 2012).

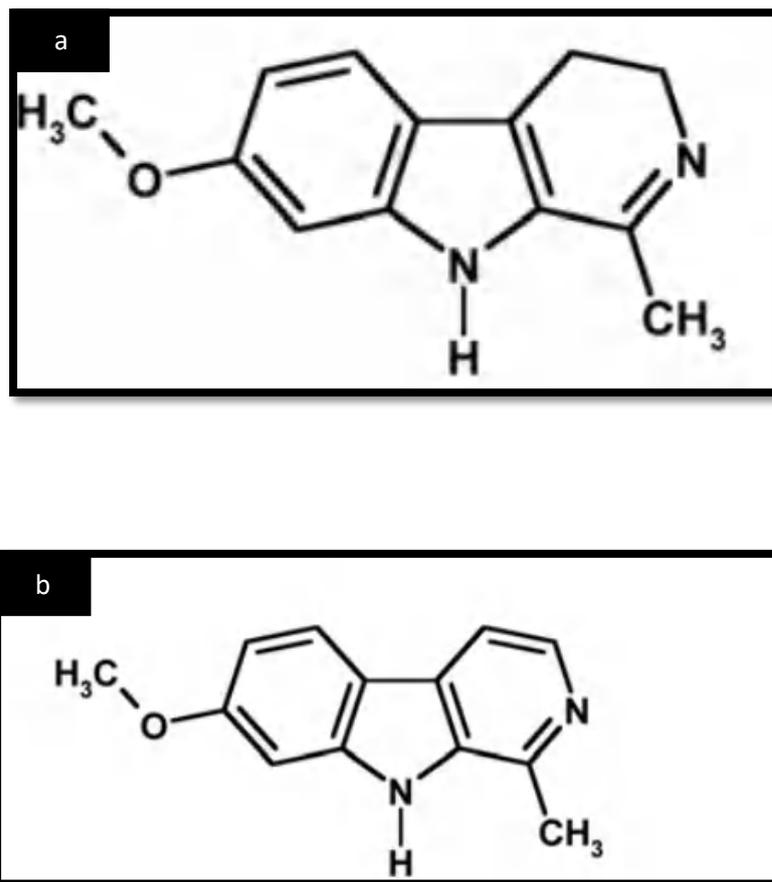


Figure 5 : Structure de harmaline (a) et harmine (b) (Hamliche *et al.*, 2013)

#### 2.4. Utilisation

*Peganum harmala* est considérée parmi l'une des plantes médicinales les plus célèbres dans la médecine traditionnelle, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle et en pharmacologie. *Peganum harmala* est utilisé depuis longtemps dans les médecines traditionnelles pour le soulagement de la douleur et comme agent antiseptique (Jinous et Ramezanloo, 2012). Ses graines sont depuis longtemps utilisées comme narcotiques, antihelminthiques, antispasmodiques et dans certains cas contre les rhumatismes et l'asthme (Hassani et Hermas, 2008).

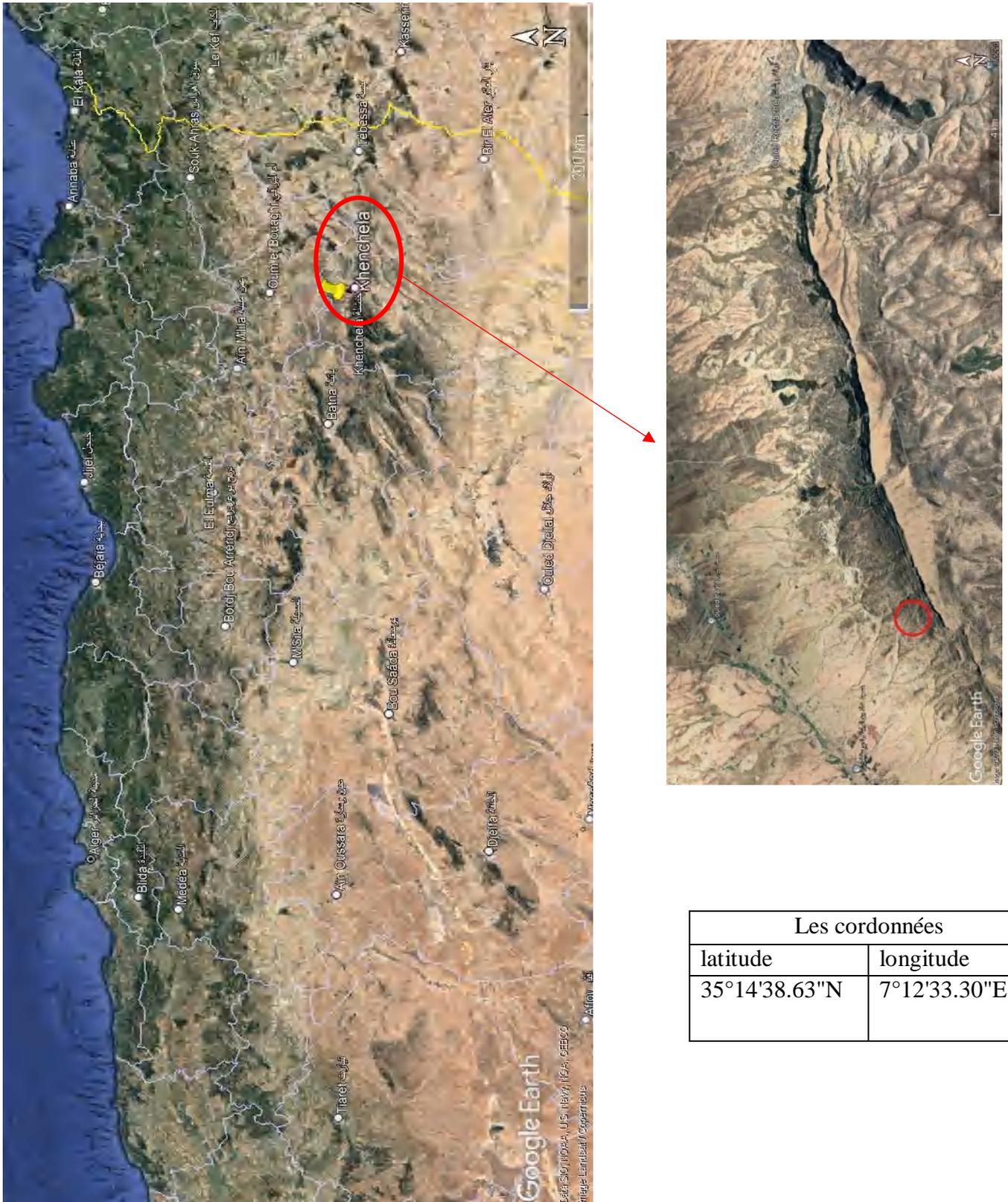
*Matériel et  
Méthodes*

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

Les racines de *Ruta montana* et les graines de *Peganum harmala* ont été récoltées au mois de septembre 2017-2019, période de maturation, dans les montagnes de Babar wilaya de Khenchela (35° 14' 38.63" Nord 7° 12' 33.30" Est), située au Nord-est de l'Algérie qui se caractérise par un climat semi- aride sec et froid (**Figure 6**). Les deux plantes ont été identifiées par Mr Zeraib A MCA à l'université Abbes Laghrour -Khenchela

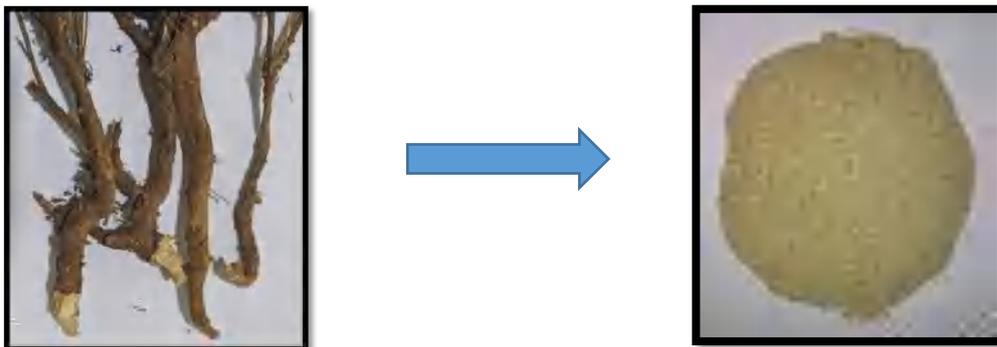
Les racines de *Ruta montana* (**Figure 7, 8**) et les graines de *Peganum harmala* (**Figure 9, 10**) ont été coupées et séchées à l'abri de la lumière puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique.



**Figure 6 :** Localisation géographique de la zone de récolte (Les montagnes de Babar, wilaya de Khenchela)



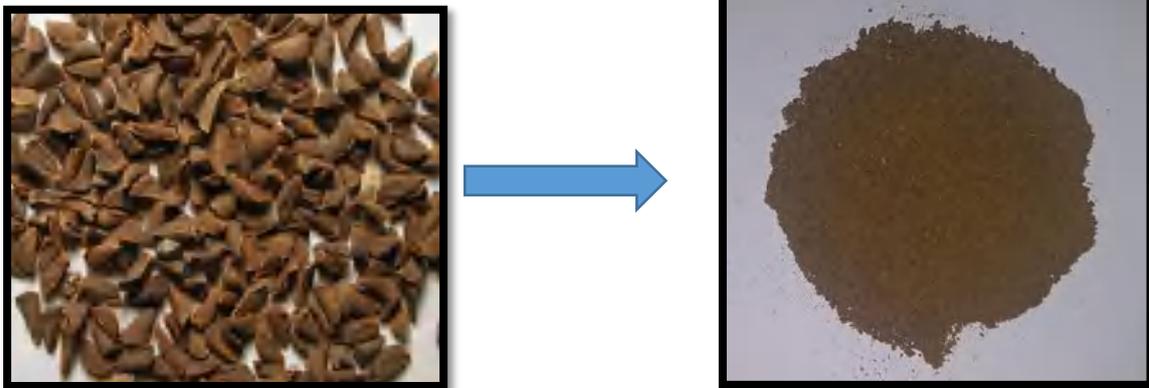
**Figure 7 :** Photographie de *Ruta montana L.* récoltée dans les montagnes de Babar, wilaya de Khenchela, au mois de septembre.



**Figure 8 :** les racines de *Ruta montana* sous forme de poudre.



**Figure 9** : Photographie de *Peganum harmala*. Récoltée dans les montagnes de Babar, wilaya de Khenchela.



**Figure 10** : les graines de *Peganum harmala* (A), les graines de *Peganum harmala* sous forme de poudre (B)

## **1.2. Les lignées cellulaires**

L'étude de l'activité antiprolifératives de deux lectines (de *Ruta montana* et de *Peganum harmala*) a été réalisée sur deux lignées cellulaires : les cellules immunitaires monocytaires (THP-1) et les cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2).

Les deux lignées cellulaires ont été obtenues auprès de laboratoire phytochimie alimentaire (Institut de la Grasa), Séville. Espagne.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Extraction**

L'extraction de lectines de deux plantes a été faite par trois méthodes différentes.

#### **2.1.1. Extraction par tampon phosphate salin (PBS) :**

5 grammes de poudre de chaque plante a été mélangé avec 30 ml du tampon phosphate (0.14M NaCl 10 m M Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, ajusté à pH 7.4). Après l'incubation à 4°C pendant 24h, le mélange a été centrifugée à 10,000 trs/min pendant 20 minutes (**Yan et al., 2010**).

#### **2.1.2. Extraction par l'eau distillée (H<sub>2</sub>O)**

5 grammes de chaque plante a été mise en suspension dans 50 ml de l'eau, l'ensemble a été agité pendant une heure à température ambiante tandis que le pH a été ajusté à pH<sub>i</sub> = 4 par HCL 0.75N. Le mélange a été centrifugé à 14000 trs/min pendant 20 min à 4°C (**Megias et al., 2013**).

#### **2.1.3. Extraction par chlorure de sodium (NaCl)**

La poudre (5 g) a été mélangée avec NaCl 0,15 M (1: 8, p / v) pendant 48 h à 4 ° C, et filtrée. Ensuite, le filtrat a été centrifugé à 9168 x g pendant 30 minutes (**Yufang et al., 2010**)

Les surnageants de chaque extraction ont été recueilli et testé sur les hématies. La méthode d'extraction qui donne la meilleure agglutination pour chaque plante a été retenue pour la poursuite des expériences.

### **2.2. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines totales de deux extraits a été réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette technique est fondée sur le changement de coloration à 595 nm du

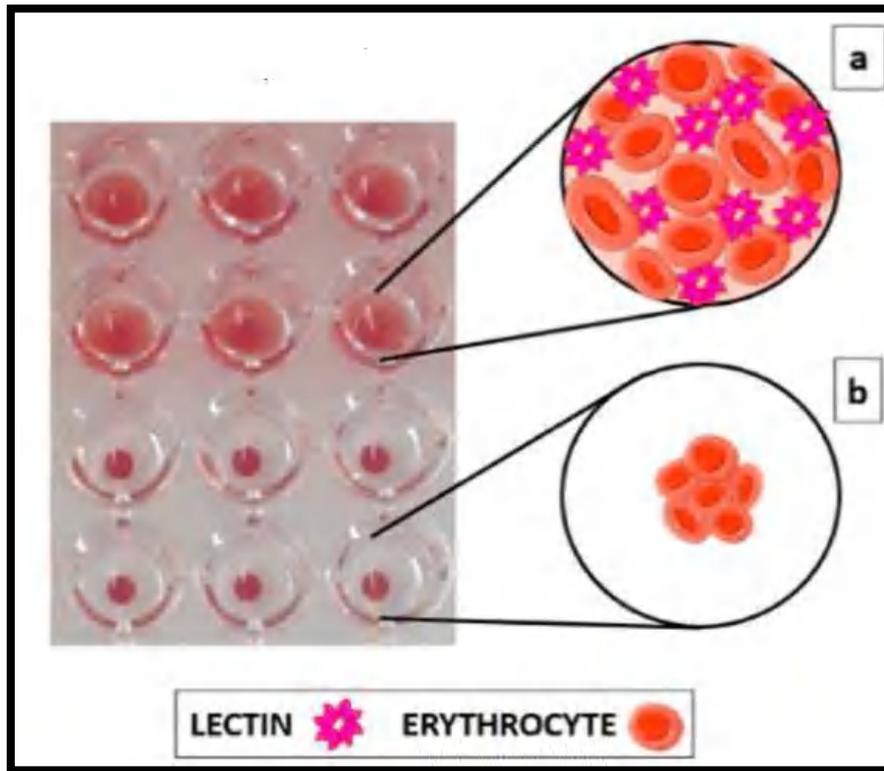
bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant aux protéines. La concentration d'un échantillon est donc déterminée par simple lecture de l'absorbance à 595 nm dont la valeur obtenue est proportionnelle à la concentration de protéines présentes dans la solution, qui sera calculée grâce à une gamme étalon effectuée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), dans les mêmes conditions expérimentales. Les concentrations protéiques des extraits sont déduites à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 2**).

### **2.3. Test d'agglutination**

L'activité agglutinante a été mesurée en utilisant des érythrocytes de rat, lapin et humain ABO fixés au glutaraldéhyde.

Le sang a été centrifugé à température ambiante à 500 g pendant 10 min. Ensuite, le surnageant a été rejeté et le culot résultant de la centrifugation du sang a été lavé trois fois par remise en suspension dans du PBS et centrifugation (500 g 10 min). Le culot résultant a été remis en suspension 1/10 (v / v) dans du PBS contenant 0.5% (v / v) de glutaraldéhyde et incubé dans un agitateur pendant 1 h à température ambiante. Les érythrocytes ont été récupérés par centrifugation et lavés avec du PBS trois fois comme décrit précédemment, et ont été remis en suspension dans du PBS (20% v / v) contenant de l'azide de sodium (0,1% p / v). Les érythrocytes de rat fixés (2 ml) ont été trypsinisés par incubation avec de la trypsine (2 mg) pendant 30 min à 37 ° C, et lavés avec du PBS trois fois comme décrit ci-dessus.

Les tests d'agglutination ont été effectués en incubant ces érythrocytes fixés au glutaraldéhyde trypsinés ou non trypsinés (40 µL, 4% dans du tampon PBS) en présence de concentrations croissantes de lectine dans des microplaques de 96 puits (à fond rond) pendant 30 minutes à 4°C. L'activité d'agglutination a été classée comme négative ou positive pour chaque puits (**Figure 11**) et la minimum concentration protéique nécessaire pour agglutiner l'érythrocyte a été enregistré. L'incubation d'érythrocytes sans ajout de lectine a été utilisée comme contrôle négatif.



**Figure 11** : Test d'agglutination pour la détection des lectines. (a) Formation du réseau érythrocytaire due à la présence de lectines ; (b) Absence d'activité hémagglutinante sédimentation des érythrocytes au fond du puits (Moura *et al.*, 2020).

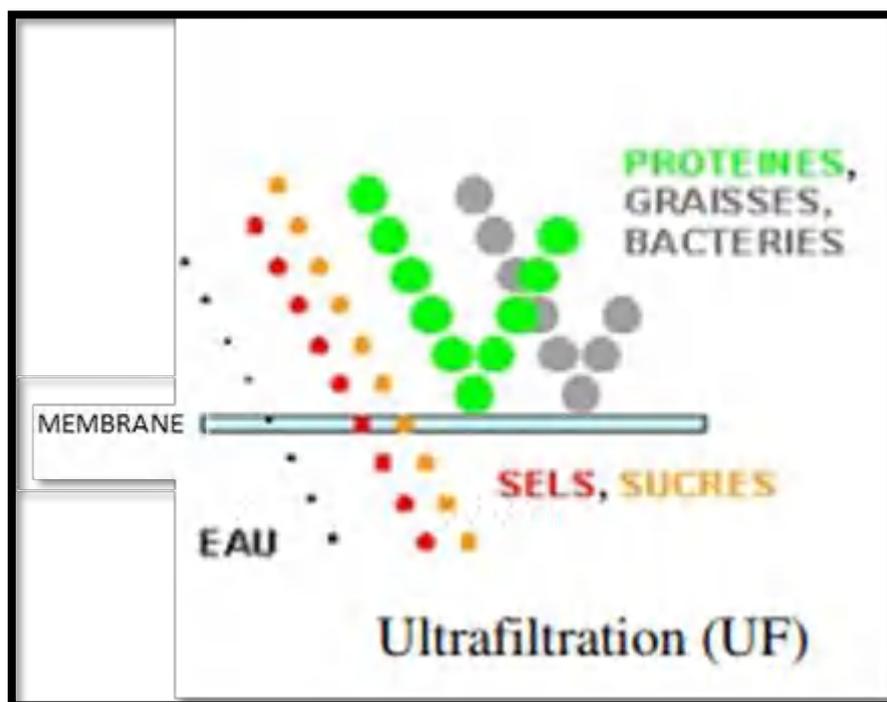
## 2.4. Purification

### 2.4.1. *Ruta montana*

#### 2.4.1.1. Ultrafiltration

L'ultrafiltration à l'aide d'une membrane de 3 KDa permet de concentrer les macromolécules à haut poids moléculaire (rétentat) Seules l'eau et les petites molécules de faible poids moléculaire transitent par la membrane (perméat) (**Figure 12**).

Le surnageant obtenu a été concentrées à la moitié de leur volume en utilisant une unité de filtration sur cellules Amicon (Millipore, MA, USA) équipée d'une membrane d'ultrafiltration de 3 kDa, (Regenerated Cellulose, MA, USA). Le rétunat résulte représente notre extrait.



**Figure 12 :** Ultrafiltration

#### 2.4.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le fractionnement protéique est effectué sur l'extrait de *Ruta montana* avec une saturation à différents paliers (0-30%, 30-50%, 50-70%, 70-100%) afin de séparer les protéines en différentes fractions (**Annexe 3**).

Une saturation initiale à 30% a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d'ammonium à l'extrait placé dans un bécher. Le tout est soumis à une agitation magnétique à froid. Après un repos de 5 à 10 minutes, la solution est centrifugée à 12000 trs /mn pendant 15 minutes. Les protéines précipitées sont récupérées dans l'eau distillée.

#### 2.4.1.3. Dialyse

Une dialyse a été effectuée afin d'éliminer le maximum de petites molécules et le sel contenu dans les fractions. Le sulfate d'ammonium a été retiré de la protéine car il peut provoquer une agglutination faussement positive.

La dialyse a été réalisée avec des sacs de dialyse en utilisant une membrane semi-perméable (SIGMA-ALDRICH ; 25 mm ; limite d'exclusion : 14 kDa) qui a été prélavée dans de l'eau distillée courante pendant 30 minutes.

Les protéines précipitées ont été déversées dans un boudin de dialyse, ceux-ci ont été scellés avec des clips, et ont été mises en suspension dans un récipient rempli d'eau distillée. Le tout est soumis à une faible agitation pendant 48 h à froid (4 °C) pour éviter la dénaturation de la protéine. Le liquide de contre dialyse est renouvelé 2 fois par jour.

La concentration en protéine et l'activité hémagglutinante de chaque fraction ont été déterminées, et les meilleures fractions actives seront utilisées pour la prochaine étape.

#### **2.4.1.4. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

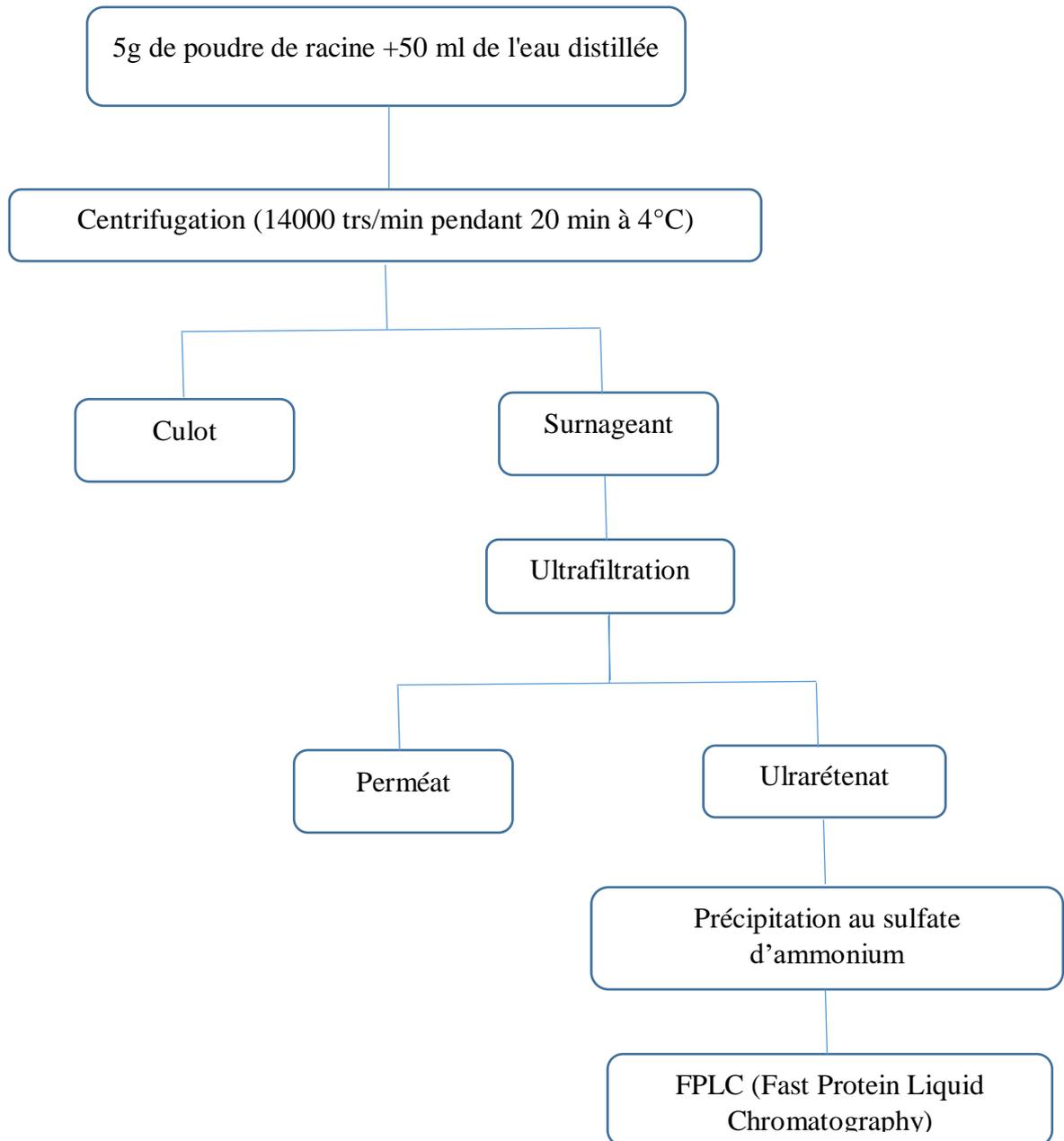
Afin de purifier les lectines contenues dans l'extrait de racine de *Ruta montana*. Une chromatographie en phase liquide rapide des protéines a été réalisée (FPLC, fast protein liquid chromatography)

FPLC signifie chromatographie liquide rapide des protéines. FPLC est une technique de purification qui est utilisée pour purifier de grosses biomolécules telles que des protéines, des nucléotides et des peptides avec une résolution et une reproductibilité élevées. Sa particularité est que la phase stationnaire est composée de billes de petit diamètre (généralement de l'agarose réticulé) qui sont conditionnées dans des colonnes en verre ou en plastique et ont une capacité de charge élevée. Les résines pour FPLC sont disponibles dans une large gamme de tailles de particules et de surfaces de ligand, qui sont sélectionnées sur la base de leur application. . En général, la phase mobile est un tampon salin, dont le débit à travers la phase stationnaire est contrôlé par une pompe (normalement maintenue constante). La FPLC utilise plusieurs méthodes de purification, notamment l'échange d'ions, la filtration sur gel et l'affinité, Cependant, la chromatographie par échange d'anions et la chromatographie par filtration sur gel sont les modes les plus couramment utilisés. Le logiciel FPLC contrôle les modules et intègre la collecte des échantillons purifiés dans le collecteur de fractions. En plus de surveiller l'absorption UV, les systèmes FPLC surveillent également le pH et la conductivité.

Les extraits concentrés par ultrafiltration sont appliqués dans la chromatographie de filtration sur gel Superose 12 10/300 (GE Life Sciences) montée sur un système de

purification AKTA (GE Life Sciences). Le volume d'injection était de 1ml et du tampon  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 0.5 M pH 7 a été utilisé comme éluant.

L'élution des lectines a été suivie par la dialyse pour l'élimination des sels contenu dans le tampon ayant servi pour l'élution des extraits, puis concentré par concentrateur sous vide (SpeedVac). L'activité hémagglutinante de chaque fraction obtenue est testée contre des hématies de rat, et la fraction active a été caractérisée (**Figure 13**).



**Figure 13** : Schéma illustrant les étapes de purification de la lectine de *Ruta montana*

## **2.4.2. *Peganum harmala***

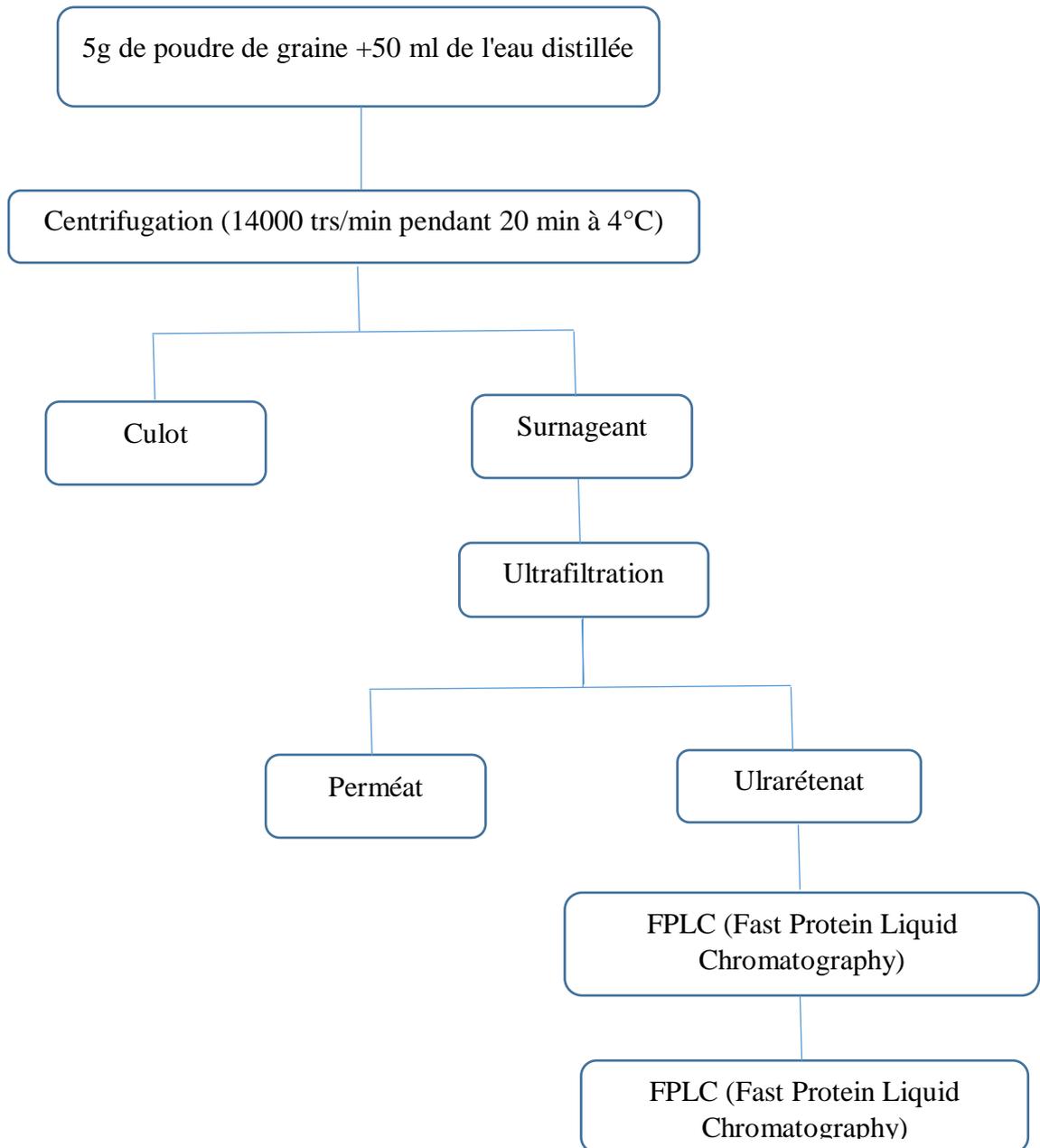
### **2.4.2.1. Ultrafiltration**

Le surnageant obtenu a été concentrées à la moitié de leur volume en utilisant une unité de filtration sur cellules Amicon (Millipore, MA, USA) équipée d'une membrane d'ultrafiltration de 3 kDa, (Regenerated Cellulose, MA, USA)

### **2.4.2.2. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

Le extraits des grains de *Peganum harmala* ont été purifiés par chromatographie de filtration sur gel en utilisant une colonne Superose 12 HR 10/30 de GE a été réalisée comme décrit précédemment.

L'extrait brut concentré (le rétentat) a été a injecté dans une colonne de superose 12 HR 10/30 connectée à un système AKTA Purifier (GE Life Sciences) équipé par un détecteur UV). Le fractionnement a été effectué à un débit constant de 1 ml min<sup>-1</sup> à température ambiante, puis les protéines ont été éluées avec tampon Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.5 M pH 7. Les différentes fractions ont été dialysées, concentrées puis testées ; les fractions présentant une activité hémagglutinante ont été analysées par SDS-PAGE puis regroupées et ensuite purifiées en utilisant la même procédure de filtration sur gel. Les fractions obtenues de la deuxième chromatographie ont été dialysé et concentré, puis l'activité hémagglutinante de chaque fraction obtenue a été testée contre des hématies de rat. Les fractions actives ont été caractérisées (**Figure 14**).



**Figure 14** : Schéma illustrant les étapes de purification de la lectine de *Peganum harmala*

## **2.5. Caractérisation des lectines**

### **2.5.1. Détermination du poids moléculaire et de la pureté**

La masse moléculaire des protéines présentes dans les échantillons a été déterminée par électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions réductrices et FPLC

#### **SDS-PAGE**

L'électrophorèse pour le polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) a été réalisée pour déterminer la pureté et la masse moléculaire de la lectine. Les différentes étapes de la purification des lectines sont suivies par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique de Schägger et von Jagow (1987) à une tension constante de 60 V pour le gel de concentration et de 120 V pour le gel de séparation.

#### **Préparation des échantillons**

L'échantillons ont été mélangés (1: 1 v / v) avec un tampon de dénaturation (Tris 80 mM, 0.57% EDTA, 0.26% DTT, 3.3% SDS, 0.008% bleu de bromophénol, 20% sucrose, pH 6.8), et chauffé à 100 ° C pendant 10 min. Les échantillons protéiques sont tout d'abord suspendus (1: 1 v / v) dans le tampon de dénaturation contenant du Tris 80 mM pH 6.8, 0.57% EDTA, 0.26% DTT, 3.3% SDS, 20% sucrose, 0.008% bleu de bromophénol. Ce dernier est un colorant ionisé qui permet de suivre l'avancement de l'électrophorèse, puis chauffé à 100°C pendant 10 min. Le DTT réduit les ponts disulfure, ôtant ainsi la structure tridimensionnelle native aux protéines, alors que le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent qui rompt les interactions inter et intraprotéiques et qui se fixe sur les protéines en les chargeant négativement. La charge propre de chaque protéine devient ainsi négligeable. Les protéines migrent donc selon leur poids moléculaire et non leur charge.

#### **Technique**

L'électrophorèse pour le polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) a été préparée en utilisant le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de séparation (15%) surmonté d'un gel de concentration (15%). Ce dernier permet une migration homogène des protéines qui vont donc se tasser au sommet du gel de séparation, afin de garantir la pénétration simultanée de toutes les protéines de l'échantillon dans ce gel.

L'opération électrophorétique a été réalisée à température ambiante, avec Tris 25 mM, 190 mM glycine, SDS 0.1% pH 8 comme tampon électrophorétique (tampon utilisé pour la migration électrophorétique). Après la migration, le gel a été retiré des plaques et placé dans une solution contenant du bleu de coomassie R-250 à 0.25% dans de l'acide

acétique, du méthanol et de l'eau (10:45:45) pour la coloration des protéines pendant une heure. L'excès de colorant a été ensuite éliminé par une solution de (100 ml méthanol, 37 ml acide acétique et 360 mL H<sub>2</sub>O) jusqu'à la transparence du gel (les bandes des protéines soient clairement visibles). Le gel est finalement lavé abondamment à l'eau. Ce processus de lavage aide à la visualisation des bandes de protéines. Enfin, la masse moléculaire des lectines est calculée par comparaison de leurs mobilités relatives dans le gel de polyacrylamide avec celle de protéines de masse moléculaire connue. Nous avons utilisé le mélange témoin de protéines de la firme Pharmacia contenant de la phosphorylase b ( 94.000 Da ) ; de l'albumine ( 67.000) de l'ovalbumine ( 45.000); de l'anhydrase carbonique ( 30.000 ) ; de l'inhibiteur tryptique du soja ( 20.100) et du lysozyme ( 14.400).

### **Gel de filtration**

Afin d'estimer le nombre de sous-unité de lectine nous avons déterminé leur masse moléculaire par FPLC.

Est une méthode largement utilisée pour caractériser la distribution des masses moléculaires des macromolécules. La solution protéique est amenée à traverser une colonne chromatographique remplie d'un gel poreux de type « tamis moléculaire ». Le diamètre des pores est choisi afin de sélectionner les macromolécules selon leur taille. En effet, plus les macromolécules sont grosses, plus le volume poreux auquel elles ont accès est faible, c'est-à-dire que leur temps de séjour dans le gel est d'autant plus court. Les solutions protéiques ont été injectées à température ambiante dans une colonne de filtration sur gel montée sur un système AKTA Purifier (GE Life Sciences). La colonne utilisée est la Superose 12 HR 10/30. L'éluant est un tampon phosphate à pH 7 avec 0.5 M de NaCl qui circule dans la colonne au débit de 0,5 mL/min. Afin de déterminer les poids moléculaires de ces protéines, nous avons élué un mélange de protéines de poids moléculaires connus (Albumine 67 kDa, Ovalbumine 43 kDa, Chymotrypsinogène 25 kDa, Ribonucléase 13.7 kDa) dans les mêmes conditions de température et de débit d'éluant. Les protéines éluées ont été détectées par mesure de l'absorbance à 214 nm. Une courbe d'étalonnage a été obtenue en traçant les volumes élués pour chaque marqueur protéique en fonction du logarithme de sa masse moléculaire. Lors des mesures, la masse moléculaire de chaque fraction protéique a été déterminée en combinant le volume d'éluant de chaque pic du chromatogramme à la courbe d'étalonnage. Avec cet étalon, la courbe d'étalonnage résultante est  $V/V_0 = -0.825 \text{ Log (PM)} + 4.1104$ .

### **2.5.2. Effet de la température**

Pour déterminer la stabilité thermique de lectine de *Ruta montana*, la solution d'hémagglutinine a été incubée pendant 30 min à différentes températures en allant de 4 °C à et 100 °C . Après 30 min, la solution d'hémagglutinine a été immédiatement refroidie sur la glace pour terminer l'incubation. L'activité hémagglutinante a ensuite été testée comme décrit ci-dessus. Les résultats ont été exprimés en calculant le pourcentage d'activité d'hémagglutination restant indiqué par l'activité des aliquotes chauffées par rapport à l'activité de l'échantillon témoin à 4 °C représentant 100 % d'activité.

Afin de déterminer la thermostabilité de la lectine de *Peganum harmala* , La lectine a été incubé à différentes températures de 50°C à 100°C et pendant différentes périodes de temps de 2.5 à 60 min, puis les aliquotes ont été rapidement refroidies sur de la glace et l'activité hémagglutinante résiduelle a été vérifiée comme décrit ci-dessus. Les résultats ont été exprimés en calculant le pourcentage d'activité d'hémagglutination restant indiqué par l'activité des aliquotes chauffées par rapport à l'activité de l'échantillon témoin à 4 °C représentant 100 % d'activité.

### **2.5.3. Effet de pH**

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité de la lectine de *Ruta montana* et *Peganum harmala*, les échantillons ont été incubées à température ambiante avec différents tampons de pH allant de 2 à 10.6 : soit HCl- KCl (1-2), citrate-phosphate (2.6-7), Tris HCl (7.2 -9) ou glucide-bicarbonate (9.2-10.6) pendant 1 h. Le test d'hémagglutination a été effectué comme décrit ci-dessus. Les résultats étaient exprimés par le pourcentage d'activité hémagglutinante restant. Ceci a été montré en calculant l'activité de la solution d'hémagglutinine traitée par rapport à l'activité de l'échantillon témoin à l'eau distillé représentant 100% d'activité.

### **2.5.4. Test d'inhibition**

Le test d'inhibition glucidique vise à identifier la spécificité glucidique de la lectine isolée. Ce dosage était basé sur le dosage de l'activité hémagglutinante

La concentration minimale de lectine de *Ruta montana* et *Peganum harmala* qui donne l'agglutination a été utilisée pour déterminer l'inhibition de l'agglutination par les sucres (galactose, mannose, fructose, saccharose, glucose, n-acétylglucosamine), (galactose, mannose, fructose, saccharose et glucose) respectivement. La plus faible concentration de

lectine provoque l'agglutination a été mélangée avec une concentration décroissante de sucre. Après incubation à 4°C pendant 30 min, le mélange a été incubé avec des érythrocytes de rat pendant 30 min. La formation de boutons en présence de glucides indiquait une interaction spécifique, tandis que la formation de tapis indiquait une absence d'interaction entre la lectine et le glucide.

Tous les inhibiteurs à tester ont été dissous dans l'eau distillée à une concentration initiale de 500 mM des saccharides testés.

La quantité décroissante de sucre qui a inhibé l'agglutination a été utilisée pour déterminer La concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI a été définie comme la plus faible concentration de glucides capable d'induire une inhibition complète de l'hémagglutination médiée par la lectine.

## **2.6. Activité antiproliférative**

Nous avons étudié l'effet antiprolifératif de deux lectines sur le taux de croissance globale de deux lignées cellulaires cancéreuses THP-1 et caco-2 par le test colorimétrique MTT et rouge neutre respectivement.

La lignée cellulaire THP-1 a été isolée à partir du sang périphérique d'un patient de 1 an souffrant de leucémie monocyttaire aiguë et caractérisée en tant que lignée cellulaire monocyttaire. THP-1, une lignée cellulaire de type monocytes, dérivée d'une leucémie monocyttaire aiguë (sous-type M5) (**Tsuchiya *et al.*, 1980**).

La lignée de cellules épithéliales humaines Caco-2 a été la lignée cellulaire la plus utilisée comme modèle intestinal pour les études d'absorption, de transport et de biodisponibilité. Cette lignée cellulaire a été isolée d'un adénocarcinome colorectal humain (**Sambuy *et al.*, 2005**).

### **2.6.1. Culture cellulaire**

Les deux lignées cellulaires ont été cultivées durant deux à trois semaines avant le début des tests dans des conditions de culture cellulaire standard (5 % CO<sub>2</sub> à 37°C) en milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (1000 mg/mL de glucose, 110 mg/mL de pyruvate et 580 mg/mL de glutamine) additionné de 10 % de sérum bovin fœtal, 1 % d'acides aminés non essentiels, 100 µg/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine.

Caco-2 (dérivées d'un carcinome du côlon) : sont considérées comme des cellules adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant. Le milieu est changé une fois par semaine. Les cellules Caco-2 ont été repiquées une fois par semaine et le milieu a été remplacé une fois entre les repiquages. Le repiquage des cellules nécessite leur décollement du support et leur séparation les unes des autres, ce qui est obtenu par action d'une enzyme protéolytique, la trypsine, son action est inhibée par les ions calcium et par le sérum de bovin fœtal.

Afin de détacher les cellules de leur support, Le milieu de culture a été éliminé et une solution de trypsine (0.05 % m/v) a été ajoutée aux boîtes de culture pour individualiser les cellules du support car les cellules Caco-2 adhèrent naturellement aux parois du support plastique, après l'incubation pendant 3 min dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), le milieu de culture a été rajoutée pour stopper l'action de trypsine (arrêter la trypsination) avant que les cellules ne soient abîmées. .

Les cellules THP-1 (une lignée cellulaire de type monocytes) ont été repiquées trois fois par semaine par dilution en milieu frais.

La croissance des cellules est mesurée quotidiennement à l'aide d'un microscope. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence où une concentration de  $0.8 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> au moins est atteinte. La suspension cellulaire est diluée afin d'ensemencer une microplaque à raison de  $4 \cdot 10^3$  cellules/puits.

### **2.6.2. Dosage de l'activité antiproliférative**

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 50 µL de lectine à des concentrations de 0.5, 1 et 2 mg/mL (diluées avec le milieu de culture) ont été mis en contact avec 50 µL des cellules à  $4 \cdot 10^3$  cellules/puits, et remises en incubation pendant 48 et 72 h (Caco-2) et 24, 48 et 72 h (THP-1) dans des conditions de culture cellulaire standard. Chaque condition expérimentale avec 6 répétitions.

Les puits en bordure de microplaque ont été utilisés comme blanc et pour ce fait ne contenait que le milieu de culture (100 µL). Le control contient 50 µL de milieu sans échantillons avec 50 µL des cellules (ne contenaient donc que des cellules vivantes).

La prolifération des cellules THP-1 a été mesurée à l'aide du test de bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce test fait partie des méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité des cellules et utilise le sel de tétrazolium

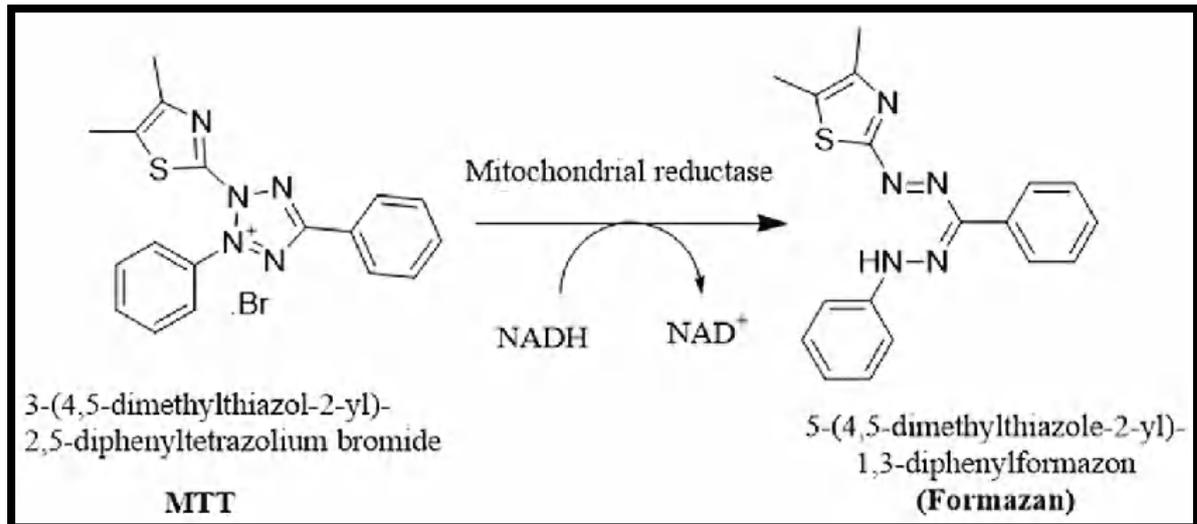
MTT qui est un colorant nécessitant une étape de métabolisation une fois avoir pénétré dans les cellules vivantes. Le test colorimétrique MTT a été décrit par **Mosmann (1983)**. Il est basé sur la mesure du nombre de cellules vivantes métaboliquement actives et capables de réduire l'anneau de tétrazolium contenu dans le sel de tétrazolium par leur succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de Formazan violets (**Figure 15**). L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test.

Après les traitements, les cellules ont été exposées au MTT pendant 1 h par addition de milieu frais contenant le réactif de sorte que la concentration finale de MTT était de 0.5 mg/mL. Le MTT réduit a été solubilisé par l'ajout de 150  $\mu$ L de HCl (0.1 M) dans de l'isopropanol (**Girón-Calle et al., 2010**). L'absorbance a été mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur de plaque Fluoroskan à double longueur d'onde (Thermo Fisher).

La prolifération des cellules Caco-2 a été déterminée à l'aide du test de viabilité rouge neutre (**Borenfreund et Puerner, 1985**). Les tests de prolifération cellulaire au rouge neutre est l'une des méthodes couramment utilisées pour détecter la viabilité cellulaire. Le principe de ce test est basé sur la détection de cellules viables via l'absorption du colorant rouge neutre. Le rouge neutre est un colorant eurhodin qui colore les lysosomes dans les cellules viables. Les cellules viables peuvent absorber le rouge neutre via un transport actif et incorporer le colorant dans leurs lysosomes, mais les cellules non viables ne peuvent pas absorber ce chromophore. Par conséquent, après le lavage, les cellules viables peuvent libérer le colorant incorporé dans des conditions d'extraction acidifiée.

La quantité de colorant libérée peut être utilisée pour déterminer le nombre total de cellules viables. Le test d'absorption du rouge neutre fournit une mesure quantitative du nombre de cellules viables.

Après l'incubation, le milieu a été retiré et les cellules ont été incubées dans un milieu de culture frais contenant du rouge neutre (50  $\mu$ g/mL) pendant 30 min. Après lavage au PBS, Le rouge neutre a ensuite été extrait à l'aide d'une solution d'acide acétique - éthanol (49% H<sub>2</sub>O, acide acétique 1 % et 50 % d'éthanol) et l'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide d'une plaque Multiskan lecteur (Thermo Fisher, Madrid, Espagne). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables.



**Figure 15** : Réduction du MTT par la réductase mitochondriale en un produit de formazan.

### 2.7. Analyse statistique

Les comparaisons statistiques ont été faites par l'analyse de la variance à un facteur suivi d'un test de Tukey post-hoc. Les données d'activité antiproliférative ont été calculées en utilisant les statistiques IBM SPSS 21. Les données ont été enregistrées sous forme de moyennes  $\pm$  l'écart types de  $n = 6$ . Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées comme significatives.

# *Résultats*

**Partie 1 : *Ruta montana***

**1.1. Extraction**

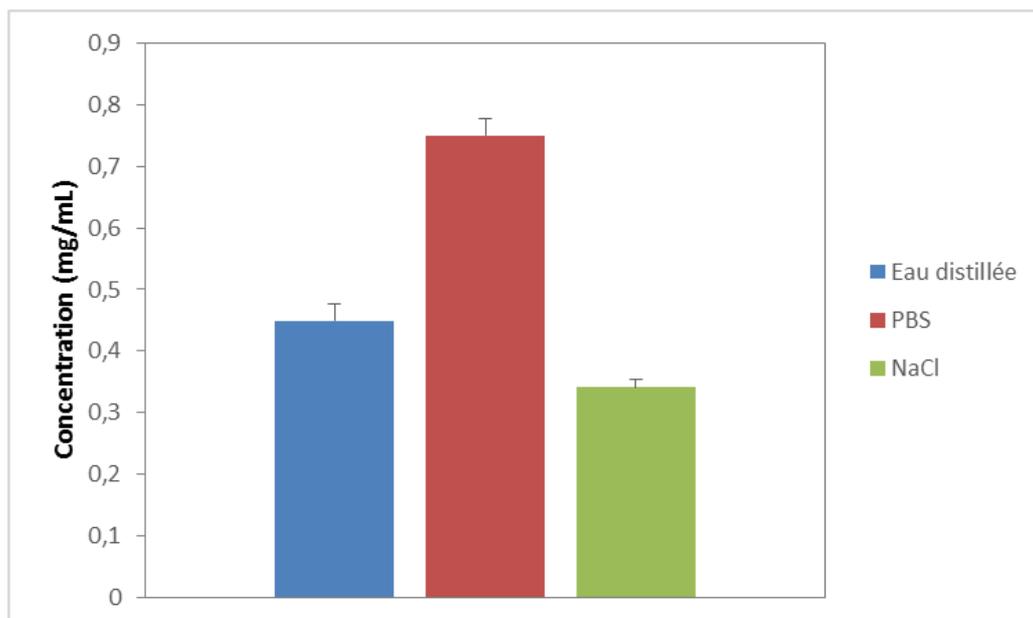
Trois méthodes Différentes ont été effectuées pour extraire les lectines de *Ruta montana* (Chlorure de sodium (NaCl) 0.15M, eau distillée à pHi et Tampon phosphate salin (PBS)).

L'extrait de NaCl n'a montré aucune agglutination contre les érythrocytes de rat, alors que les autres extraits (PBS et eau distillée) ont agglutiné les érythrocytes de rat (**Tableau 3**).

Le dosage des protéines a montré que l'extrait de PBS avait une concentration en protéines plus élevée que l'extrait d'eau distillée (**Figure 16**). Cependant, l'extrait d'eau distillée possédait l'activité hémagglutinante la plus élevée (0.45 mg/mL) (**tableau 3**).

**Tableau 3.** Minimum concentration protéique des différents extraits de *Ruta montana* nécessaire pour agglutiner l'érythrocyte

	Extrait de PBS	Extrait d'H <sub>2</sub> O	Extrait de NaCl
La plus faible concentration provoque l'hémagglutination (mg/mL)	0.794	0.45	Pas d'agglutination



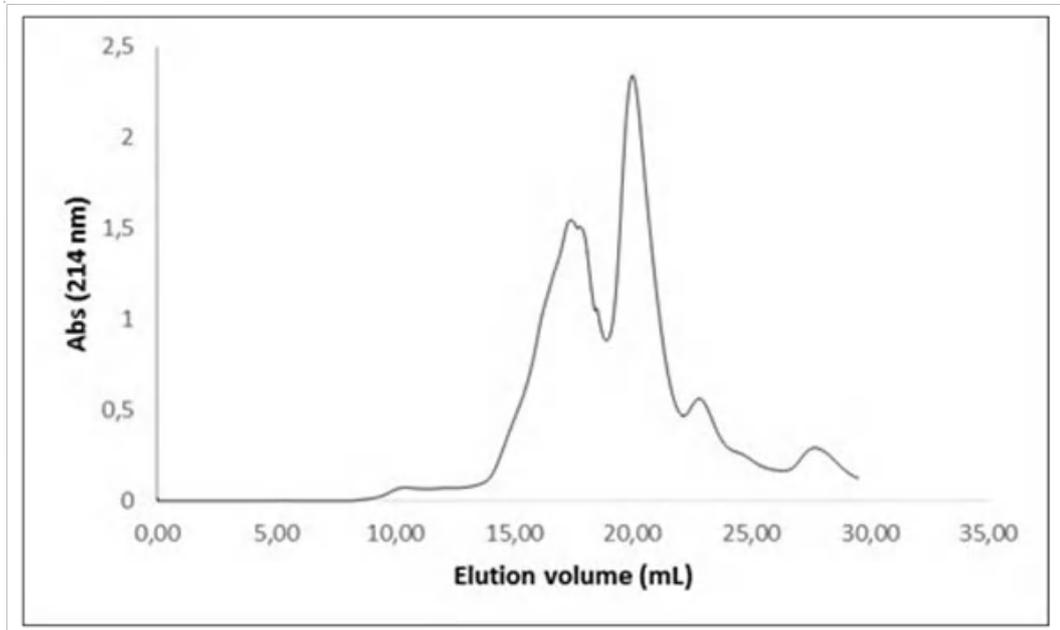
**Figure 16 :** Concentration en protéines de différents extraits de *Ruta montana*.

## 1.2. Purification

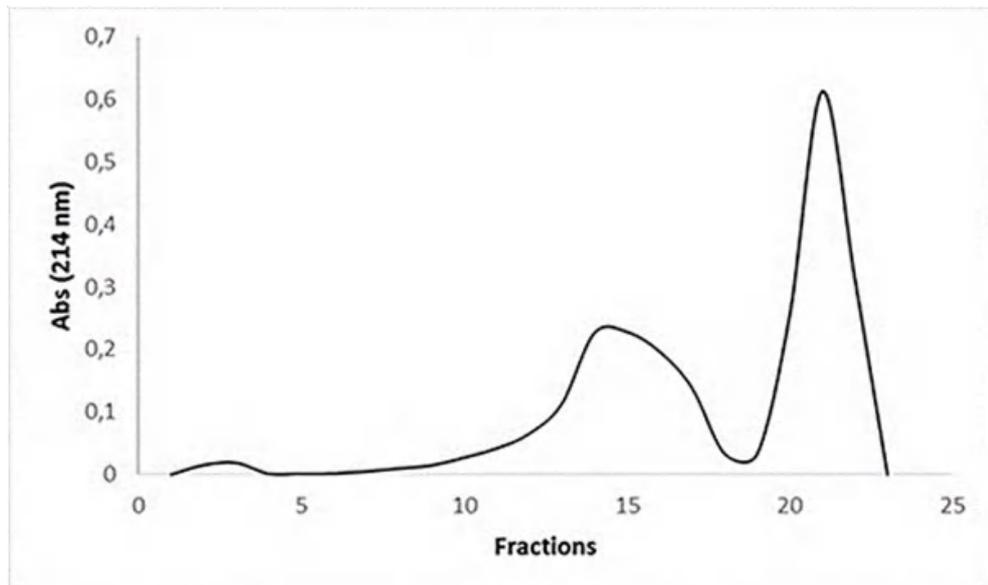
L'extrait d'eau distillée de racines de *Ruta montana* a été soumis à une ultrafiltration suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium et l'activité agglutinante de chaque fraction a été testée. L'activité agglutinante a été détectée dans la fraction 50-70 % et 70-100 %. Alors que les fractions 0-30 % et 30-50 % n'ont montré aucune agglutination contre les érythrocytes de rat. De plus, la fraction 50-70% a présenté une activité agglutinante significativement plus élevée que celle de la fraction 70-100% (**Tableau 5**).

La chromatographie par filtration sur gel sur colonne Superose 12 d'un précipité de sulfate d'ammonium à 50-100 % de racines de *Ruta montana* a révélé deux pics, le pic I (fractions 14 à 18) et le pic II (fractions 20 à 23) (**Figure 17B**). Les fractions correspondant au premier pic (16-18 ml) ont montré une activité agglutinante (**Tableau 2**) avec un poids moléculaire d'environ 28.8 kDa. Alors que la chromatographie par filtration sur gel de l'ultrarétenat a montré deux pics résolus majeurs non complets (**Figure 17A**).

(A)



(B)



**Figure 17 :** Chromatographie par filtration sur gel Superose 12 de l'extrait de *Ruta montana*. (A) Extrait après concentration par ultrafiltration (seuil de coupure de 3 kDa), (B) Lectine partiellement purifiée (précipité de sulfate d'ammonium à 50-100 %).

## 2.3. Caractérisation de la lectine

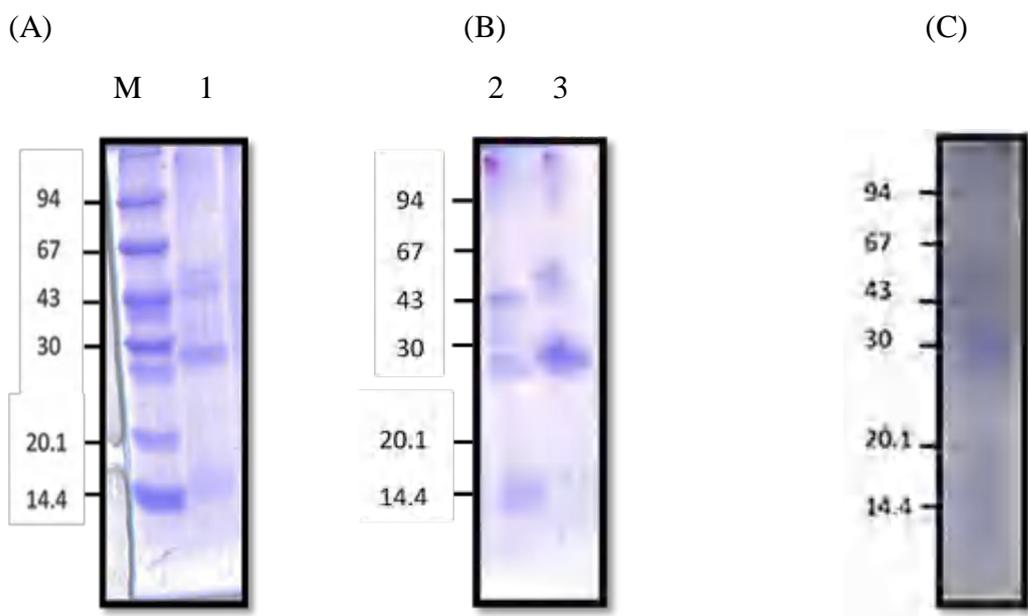
### 2.3.1. SDS-PAGE

Une SDS-PAGE a été réalisée pour analyser la pureté et déterminer la masse moléculaire de lectine de *Ruta montana*.

Comme le montre la **figure 18**, le nombre de bandes protéiques des fractions 70-100 % (piste 2) et 50-70 % (piste 3) de sulfate d'ammonium précipité a été réduit par rapport à l'échantillon brut (piste 1).

Alors que la fraction de FPLC qui a montré une activité agglutinante présentait une seule bande avec une masse moléculaire de 28.26 kDa (**figure 18C**).

En chromatographie par filtration sur gel Superose 12, la masse moléculaire de la lectine de *Ruta montana* isolée a été estimée à environ 28.8 kDa.



**Figure 18** : Analyse SDS-PAGE de *Ruta montana*. Les étalons de poids moléculaire sont indiqués sur le côté (kDa). (A) Piste 1, Ultrénetat ; Piste M, marques de poids moléculaire (en kDa). (B) piste 2, précipitation au sulfate d'ammonium (70-100 %) ; piste 3, précipitation au sulfate d'ammonium (50-70 %) ;(C) lectine purifiée.

### 2.3.2. Activité agglutinante

L'activité de la lectine a été fortement augmentée avec des hématies trypsinées de rat (**tableau 4**).

Après la précipitation au sulfate d'ammonium, l'activité agglutinante a été améliorée environ de 3 fois, tandis que la lectine *de Ruta montana* pure a donné une très forte agglutination, il a été amélioré de 16 fois (**tableau 5**).

**Tableau 4 :** L'effet de trypsine sur l'activité agglutinante de l'extrait de *Ruta montana*

	Extrait en présence des érythrocytes non trypsinés	Extrait en présence des érythrocytes trypsinés
La plus faible concentration provoque l'agglutination (mg/mL)	0.564	0.376

**Tableau 5 :** L'activité agglutinante des différentes fractions de *Ruta montana* résultant de la précipitation du sulfate d'ammonium et de FPLC

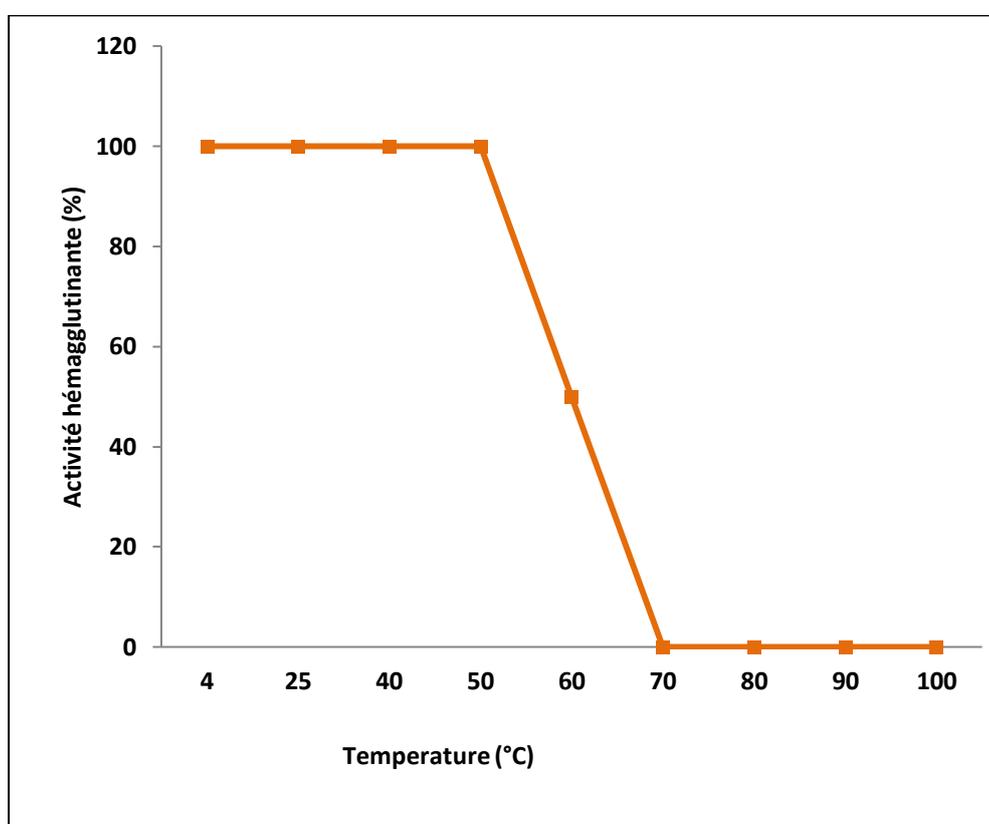
	0-30	30-50	50-70	70-100	Après FPLC
concentration en protéines (mg/mL)	0.321	0.22	0.334	0.267	0.175
La plus faible concentration provoque l'agglutination (mg/mL)	Pas d'agglutination	Pas d'agglutination	0.167	0.2	0.035

### 2.3.3. Effet de la température et du pH

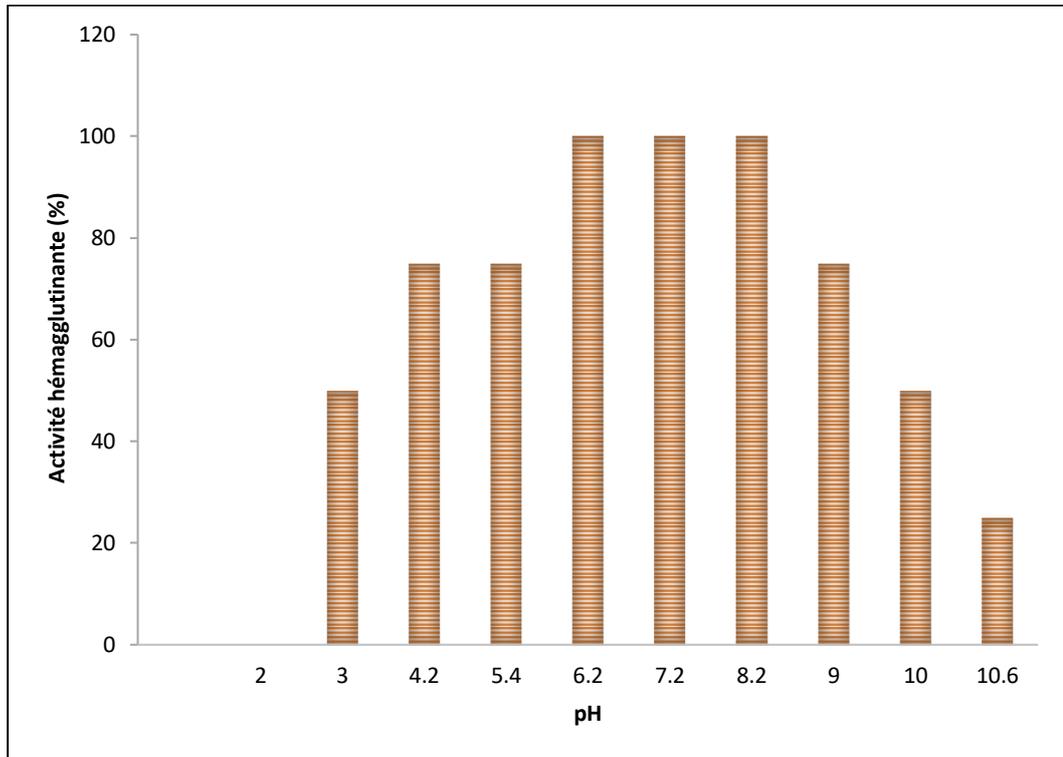
L'activité agglutinante de la lectine de *Ruta montana* a été complètement maintenue à des températures allant de 4 à 50 ° C pendant 30 min, son activité a fortement chuté et a perdu son activité à 70 ° C pendant 30 min (**figure 19A**).

Le pH optimal pour une activité agglutinante de la lectine de *Ruta montana* a été présenté à pH 4.2 - 9 et a perdu toute l'activité en dessous de pH 3, à pH 10, son activité a été réduite à ~ 50 % (**figure 19B**).

(A)



(B)



**Figure 19 :** Stabilité thermique (A) et stabilité du pH (B) de la lectine de *Ruta montana*.

#### 2.3.4. Test d'inhibition

Activité agglutinante de la lectines de *Ruta montana* a été inhibée par galactose et glucose (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Effet de différents sucres sur l'activité agglutinante de la lectine de *Ruta montana*.

Concentration \ Sucre	500mM	250	125	62.5	31.25
Galactose	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	+	+
n-acétylglucosamine	+	+	+	+	+

+ : Absence d'inhibition

- : Présence d'inhibition

### 2.3.5. Spécificité aux différentes espèces érythrocytes

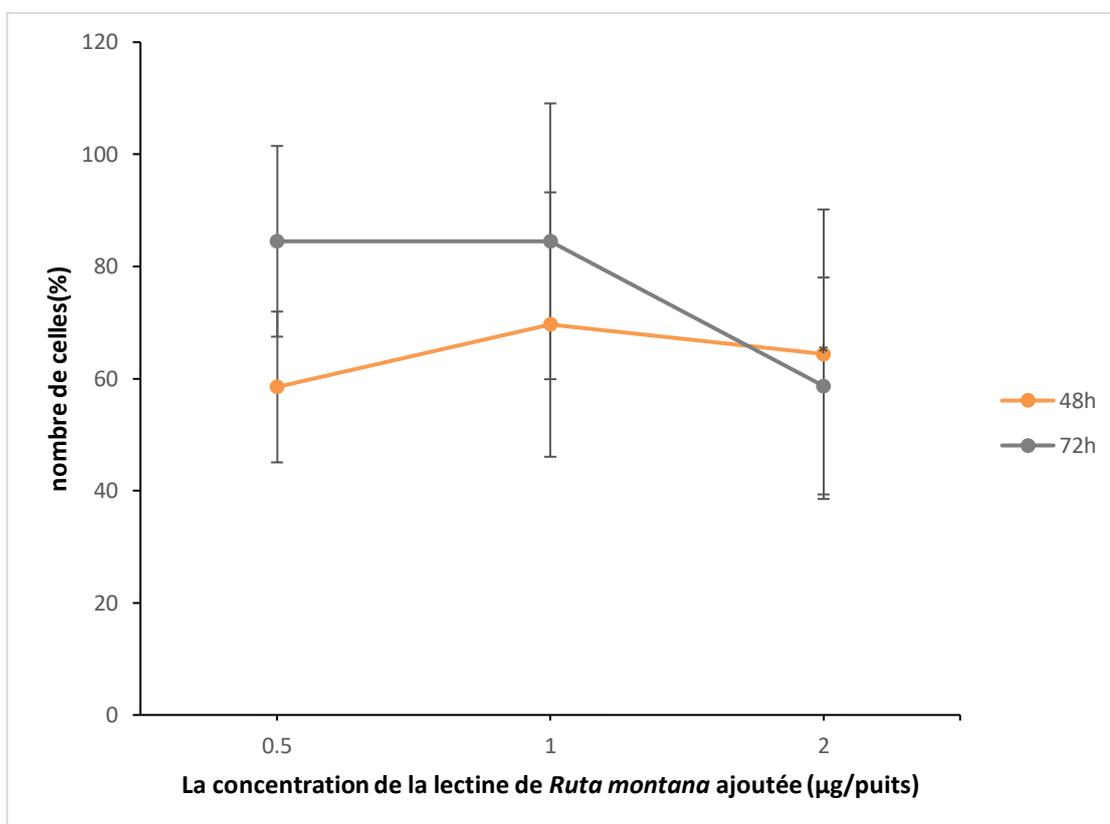
La lectine de *Ruta montana* présente la plus forte agglutination avec les érythrocytes de rat, et montre une spécificité envers les le groupe sanguin humain de type B (**Tableau 7**).

**Tableau 7 :** Minimum concentration de la lectine de *Ruta montana* nécessaire pour agglutiner les érythrocytes.

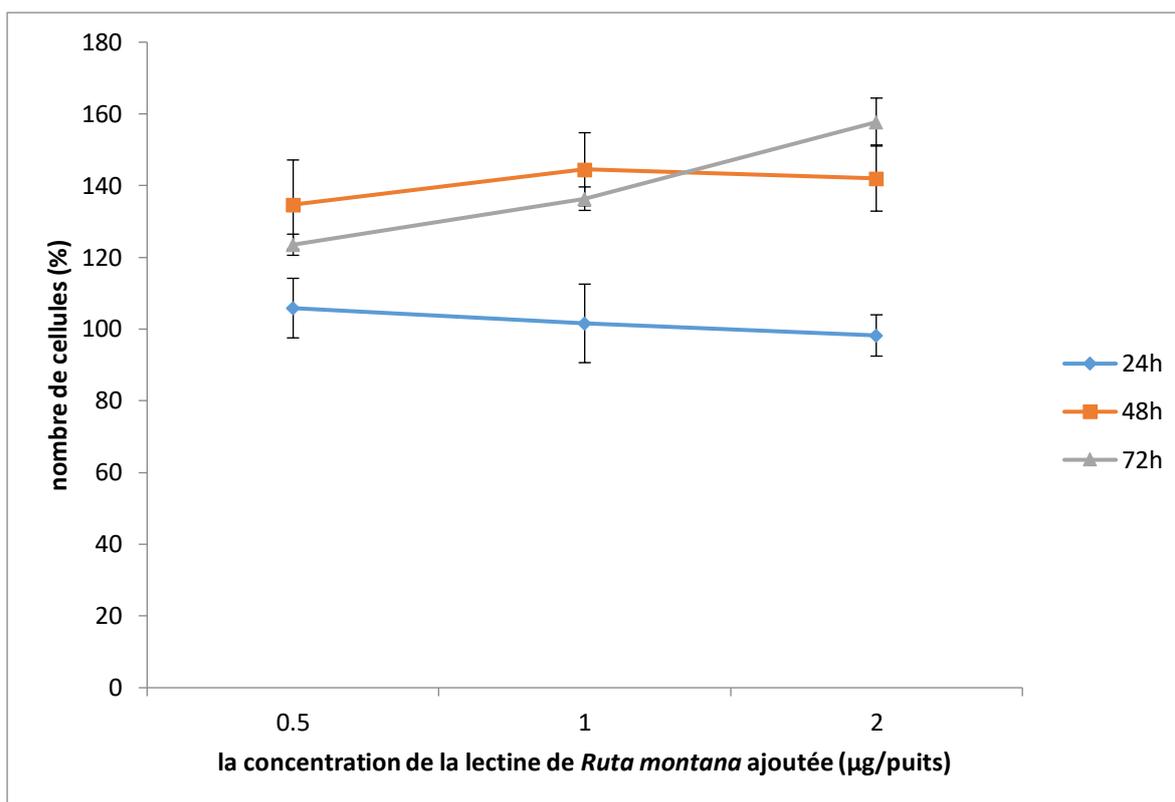
Les érythrocytes	Concentration de protéines (mg/mL)	La plus faible concentration en protéines provoque l'agglutination (mg/mL)
le groupe sanguin humain A	0.175	Pas d'agglutination
le groupe sanguin humain B		0.131
le groupe sanguin humain O		Pas d'agglutination
Les erythrocytes de lapin		0.07
Les erythrocytes de rat		0.035

### 2.3.6. Activité antiproliférative

La propriété anti-proliférative de la lectine de *Ruta montana* contre les lignées cellulaires THP-1 et Caco-2 est illustrée à la Figure 17 et 18. L'effet inhibiteur significatif de la lectine de *Ruta montana* sur la prolifération des lignées cellulaires Caco-2 a été observé avec 2 µg / puits pendant 72 h de traitement (56.2 %) (**Figure 20**), tandis que le traitement des cellules de la lignée THP-1 avec la lectine de *Ruta montana* a augmenté le nombre de cellules cancéreuses (**Figure21**).



**Figure 20** : Effet de lectine de *Ruta montana* sur la prolifération des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (caco-2), la viabilité cellulaire a été déterminé à l'aide du test de viabilité au rouge neutre. Les données représentent la moyenne ± écart type pour n= 6. \* 0.05>p>0.01 par rapport aux témoins qui ont été cultivés sans l'extrait, les barres indiquent l'écart type.



**Figure 21 :** Effet de la lectine de *Ruta montana* sur la prolifération des cellules THP-1 leucémiques humaines. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD pour  $n = 6$ . Les barres indiquent l'écart type.

## Partie 2 : *Peganum harmala*

### 1.1. Extraction

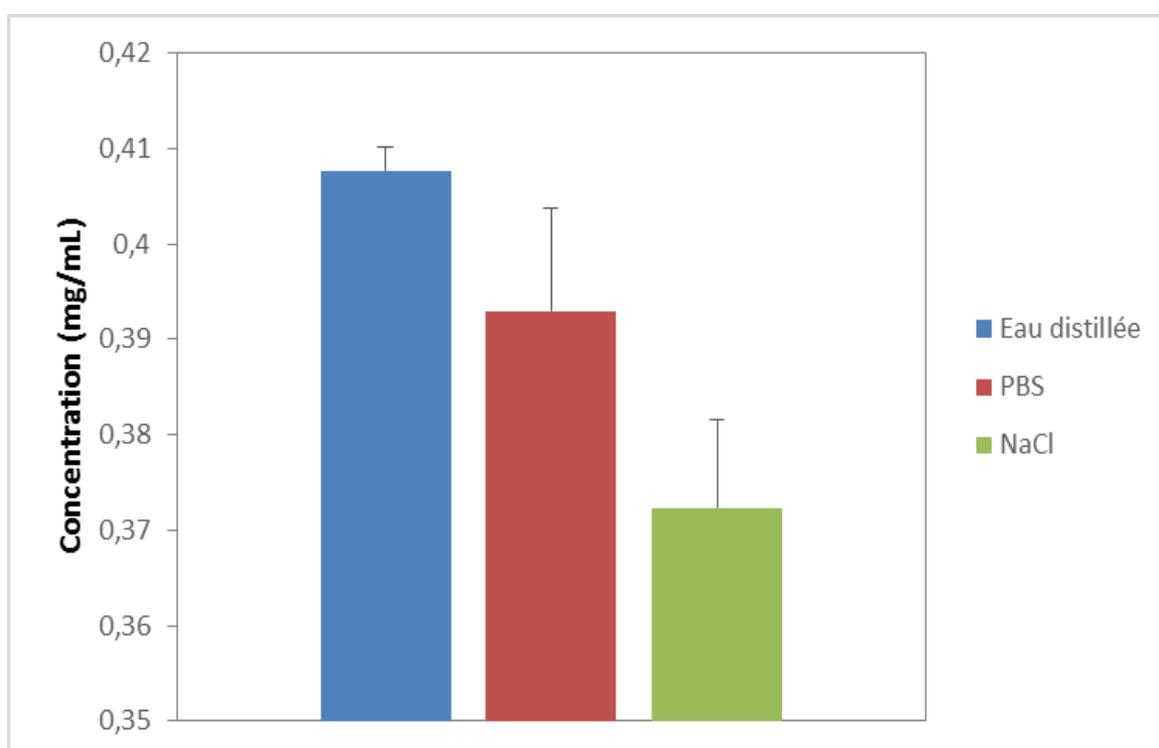
Les lectines des graines de *Peganum harmala* a été extrait par trois méthodes différentes (PBS, eau distillée et NaCl)

Après le test d'agglutination contre les érythrocytes de rat, l'extrait de l'eau distillée a montré une forte agglutination avec la concentration agglutinante minimale de 0,16 mg/mL, tandis que les autres extraits (PBS et NaCl) n'ont montré qu'une très faible agglutination avec la concentration agglutinante minimale de 0.34 mg/mL et 0.37 mg/mL respectivement (**tableau 8**).

Le dosage des protéines a montré que l'extrait d'eau distillée avait une concentration en protéines plus élevée que les extraits de PBS et NaCl (**Figure 22**). Cependant, l'extrait d'eau distillée possédait l'activité agglutinante la plus élevée (0.16 mg/mL) (**tableau 8**).

**Tableau 8 :** Minimum concentration protéique des différents extraits de *Peganum harmala* nécessaire pour agglutiner l'érythrocyte

	Extrait de PBS	Extrait d'H <sub>2</sub> O	Extrait de NaCl
La plus faible concentration provoque l'agglutination (mg/mL)	0.34	0.16	0.37



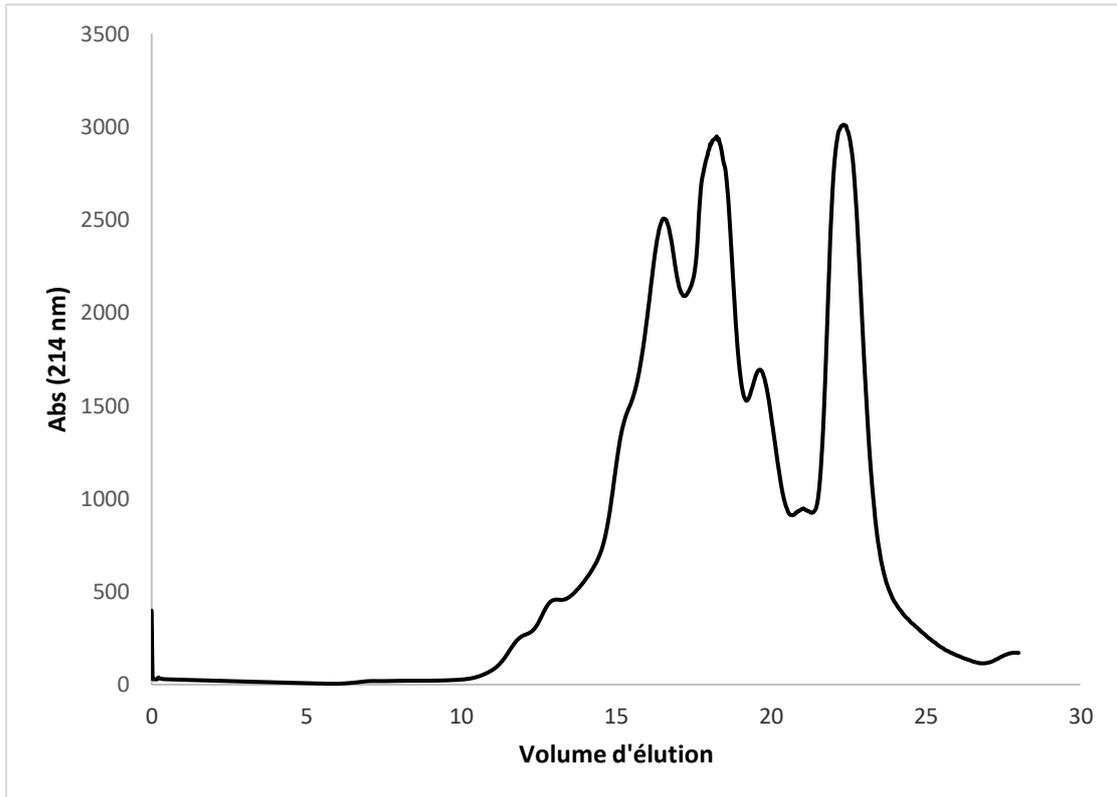
**Figure 22 :** Concentration en protéines de différents extraits de *Peganum harmala*.

## 1.2. Purification

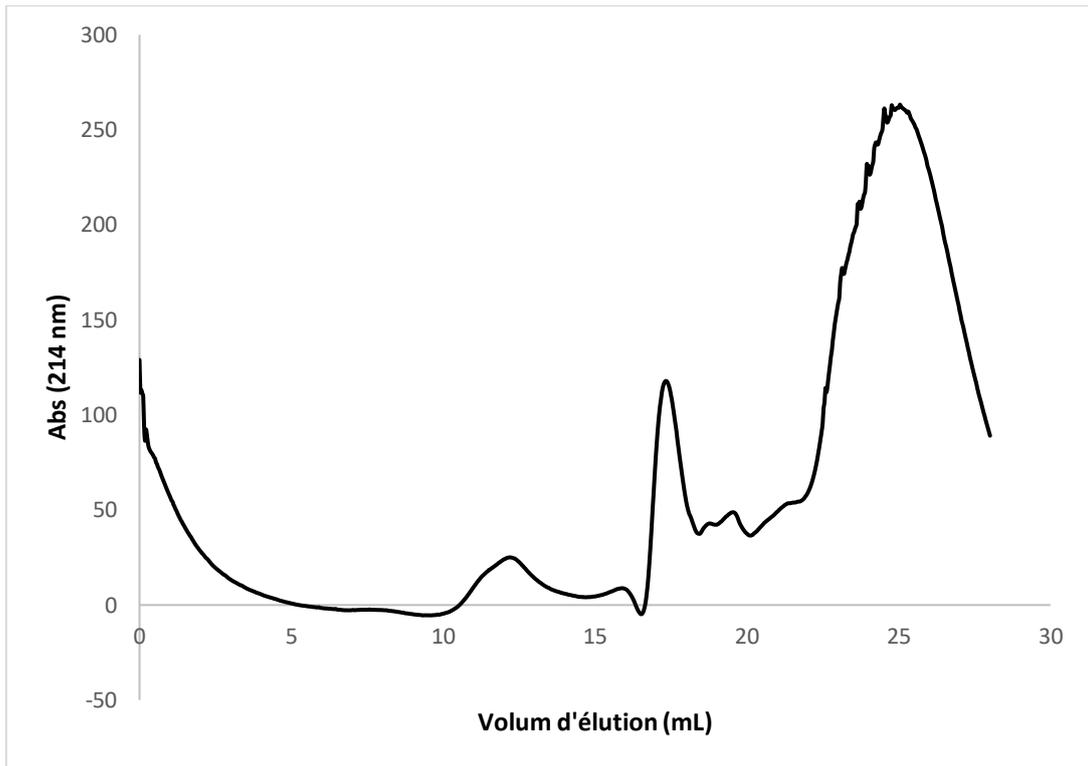
L'extrait de *Peganum harmala* (**figure 23A**) a été filtré à travers une membrane d'ultrafiltration de 3 kDa afin de séparer partiellement les protéines, y compris les albumines (**figure 23B**). L'ultraconcentré d'albumine résultant a ensuite été soumis à la chromatographie de filtration sur gel superose 12 afin de purifier davantage les lectines. Les

fractions 5 et 6 qui correspondent le volume d'élution 13.5 à 15.5 ml (**Figure 23C**) a montré une activité hémagglutinante évidente. Les fractions 5 et 6 ont été regroupées et re-chromatographiées, ce qui a entraîné la séparation d'une lectine pure (**Figure 23D**).

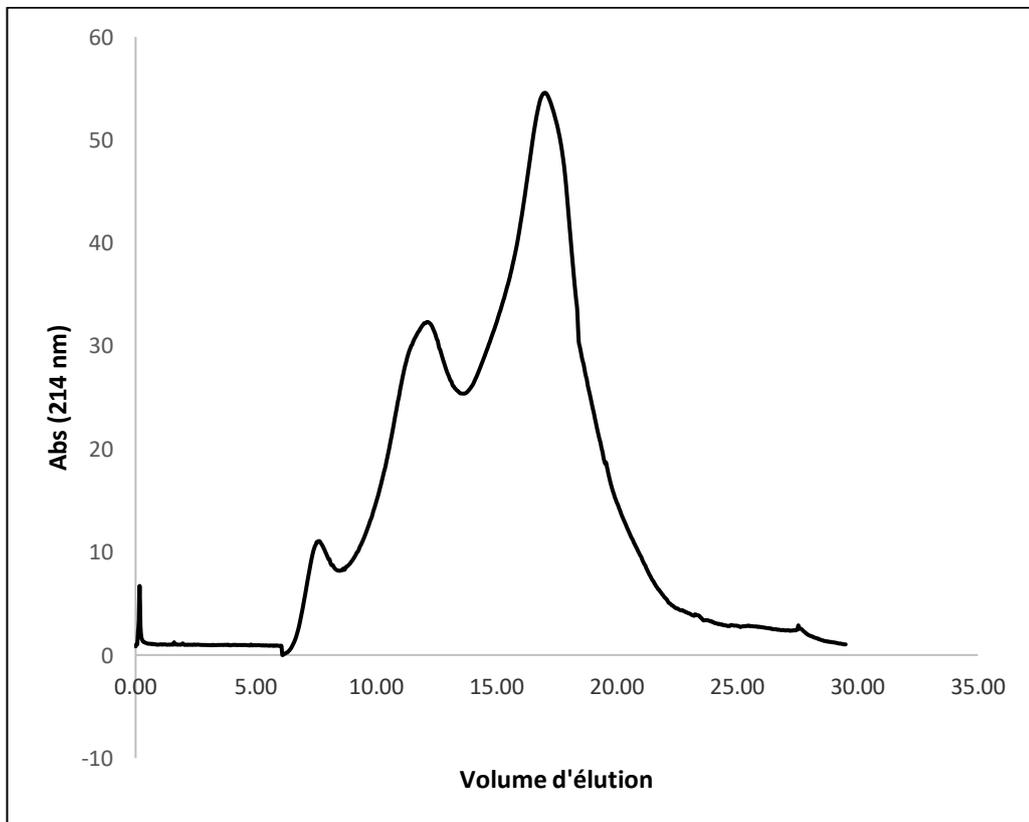
(A)



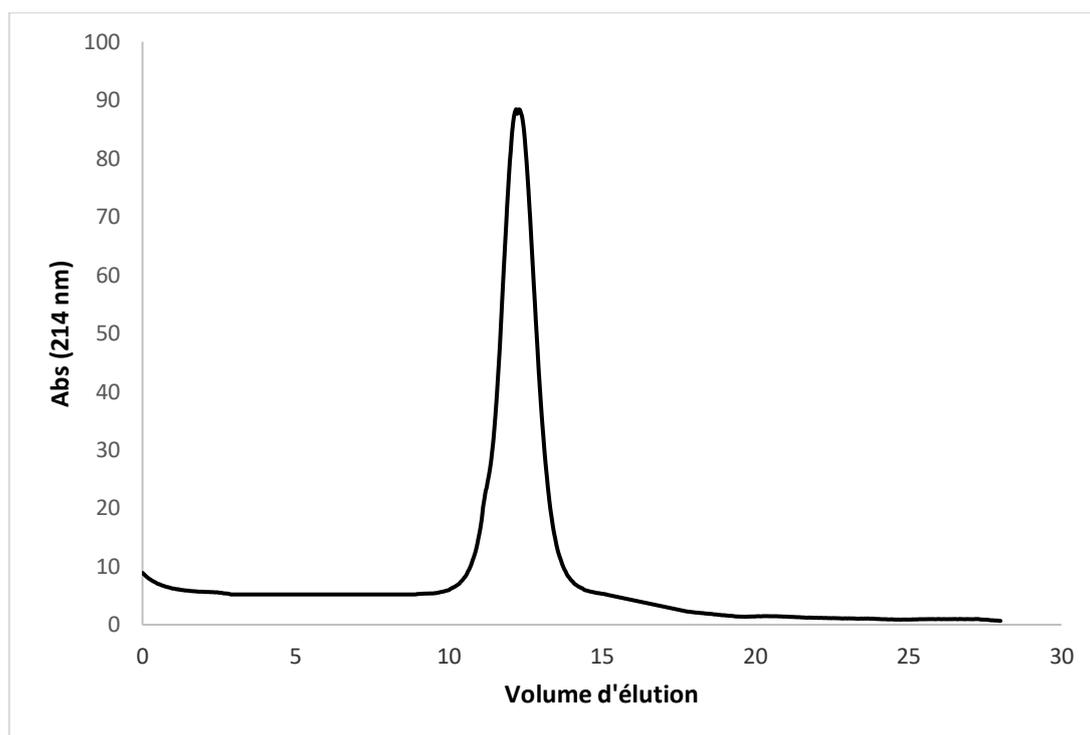
(B)



(C)



(D)

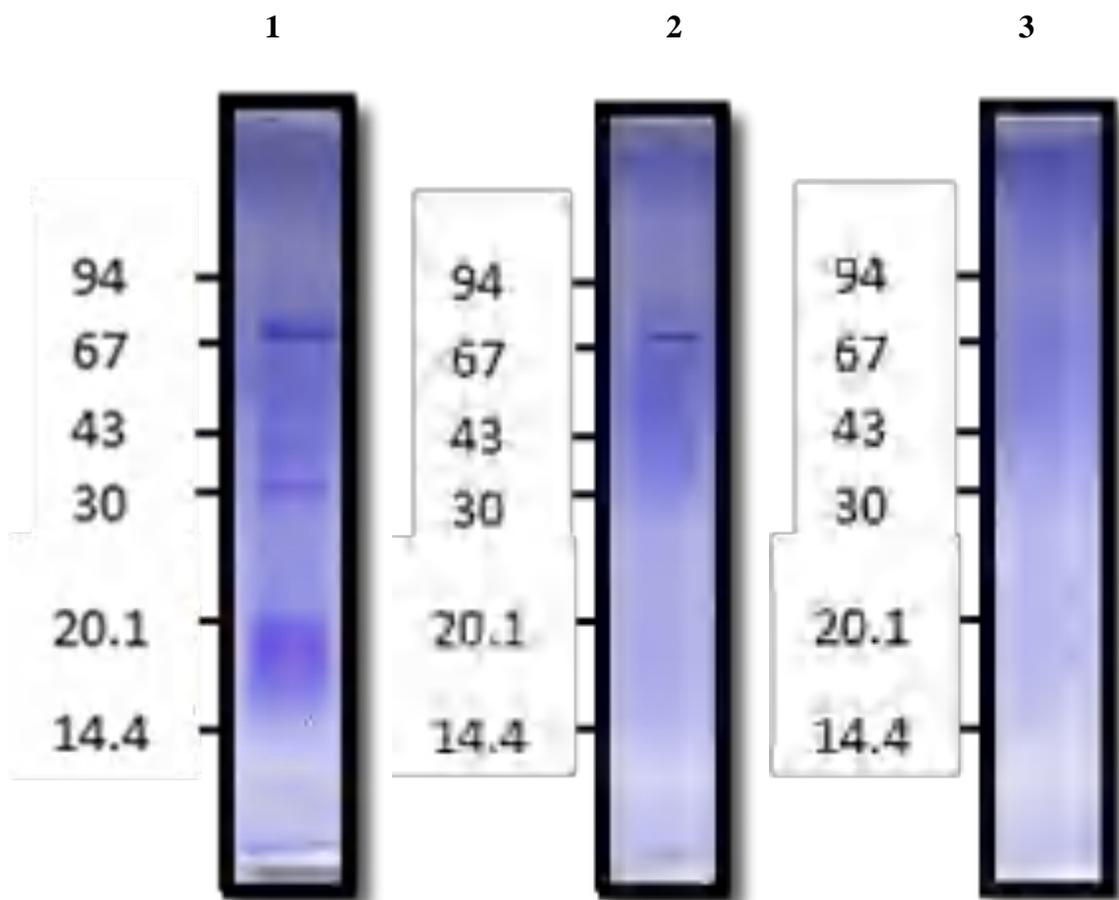


**Figure 23.** Chromatographie par filtration sur gel Superose 12 d'extraits de *Peganum harmala* et de fractions de lectine purifiées re-chromatographiées. (A) extrait aqueux pH 4, (B) extrait après concentration par ultrafiltration (seuil 3 kDa), (C) lectine partiellement purifiée, et (D) fractions de lectine regroupées montrant une activité agglutinante

### 1.3. Caractérisation de lectine

#### 1.3.1. SDS PAGE

En chromatographie par filtration sur gel superose 12, la masse moléculaire de la lectine de graines de *Peganum harmala* isolée a été estimée à environ 217.27 kDa. En SDS-PAGE, l'hémagglutinine purifiée a montré une seule bande à 70.53 kDa (**Figure 24**). Il en a été déduit que l'hémagglutinine était constituée de trois sous-unités de même taille.



**Figure 24** : Analyse SDS-PAGE de *Peganum harmal*. Les étalons de poids moléculaire sont indiqués sur le côté (kDa). Piste **1**, Ultrarétentat ; piste **2**, la fraction active de la première chromatographie ; piste **3**, lectine purifiée.

### 1.3.2. Activité agglutinante

Le test d'agglutination a été utilisé pour surveiller toute la procédure de purification

L'extrait de la plante présentait une forte agglutination avec les érythrocytes de rat. L'activité de la lectine a été fortement augmentée avec des hématies trypsinées de rat (**Tableau 9**).

Comme la montre le tableau 2, les fractions collectées à partir de la première chromatographie présente une activité agglutinante de 0.12 mg/mL, tandis que la seconde chromatographie a induit une activité agglutinante plus élevée de 0.009 mg/mL

**Tableau 9 :** L'effet de trypsine sur l'activité agglutinante de l'extrait de *Peganum harmala*

	Extrait en présence des érythrocytes non trypsinés	Extrait en présence des érythrocytes trypsinés
La plus faible concentration provoque l'agglutination (mg/mL)	0.12	0.06

**Tableau 10 :** L'activité agglutinante des fractions de *Peganum harmala* résultant de la Première et seconde FPLC

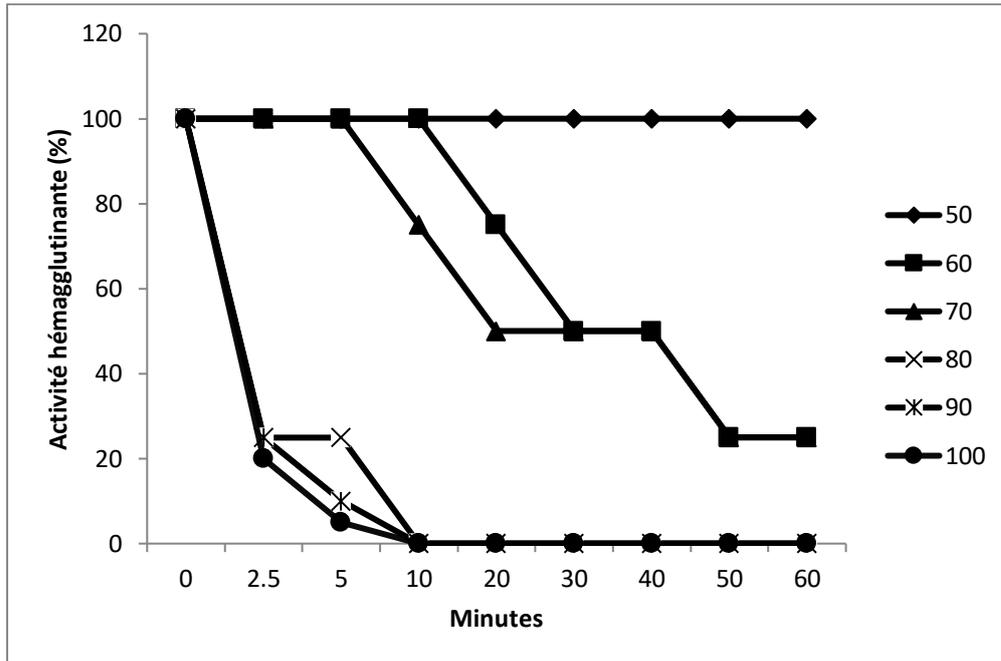
	Première FPLC	Deuxième FPLC
concentration en protéines (mg/mL)	0.272	0.181
La plus faible concentration provoque l'agglutination (mg/mL)	0.01	0.009

### 1.3.3. Effet de la température et du pH

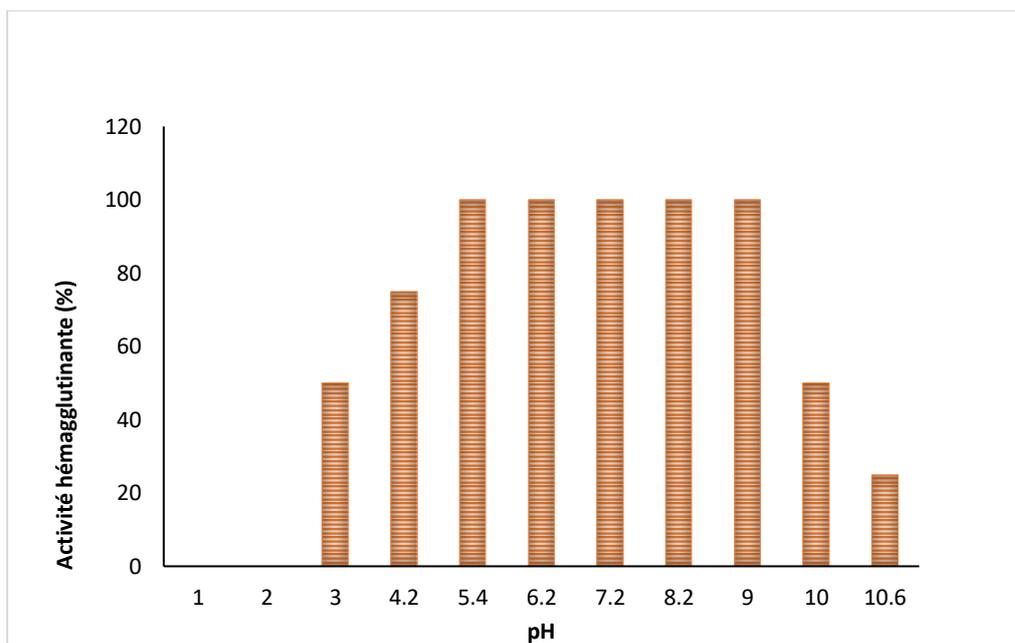
Le traitement thermique de lectine des graines de *Peganum harmala* à 100°C pendant 2.5 minutes réduit significativement leur activité agglutinante qui passe respectivement de 100% à 20%. Lorsque le chauffage atteint 10 minutes, l'activité hémagglutinante de ce lectine devient nulle. Aussi, le traitement thermique à 90°C et 80°C pendant 10 minutes est suffisant pour inactiver totalement l'activité agglutinante de lectine (**Figure 25A**).

Une activité d'agglutination complète de la lectine de *Peganum harmala* a été observée à pH 5.4 – 9, seule une activité minimale est restée à pH 3 et 10 et la totalité de l'activité a été perdue au pH 2 (Figure 25B).

(A)



(B)



**Figure 25 :** Stabilité thermique (A) et stabilité du pH (B) de la lectines de *Peganum harmala*

#### 1.3.4. Test inhibition

Différents glucides ont été testés pour leur capacité à inhiber l'agglutination. Cependant, aucun des glucides n'a été capable d'inhiber l'activité agglutinante de la lectine de *Peganum harmala*, même à une concentration plus élevée (500 mM) (**Tableau 11**).

**Tableau 11** : Effet de différents sucres sur l'activité agglutinante de la lectine de *Peganum harmala*

<b>Concentration</b> <b>Sucre</b>	500mM	250mM	125mM	62.5mM	31.25mM
Galactose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+

+ : Absence d'inhibition

### 1.3.5. Spécificité aux différentes espèces érythrocytes

La lectine de *Peganum harmala* agglutine toutes les espèces érythrocyte (**Tableau 12**).

**Tableau 12** : Minimum concentration de la lectine de *Peganum harmala* nécessaire pour agglutiner les érythrocytes

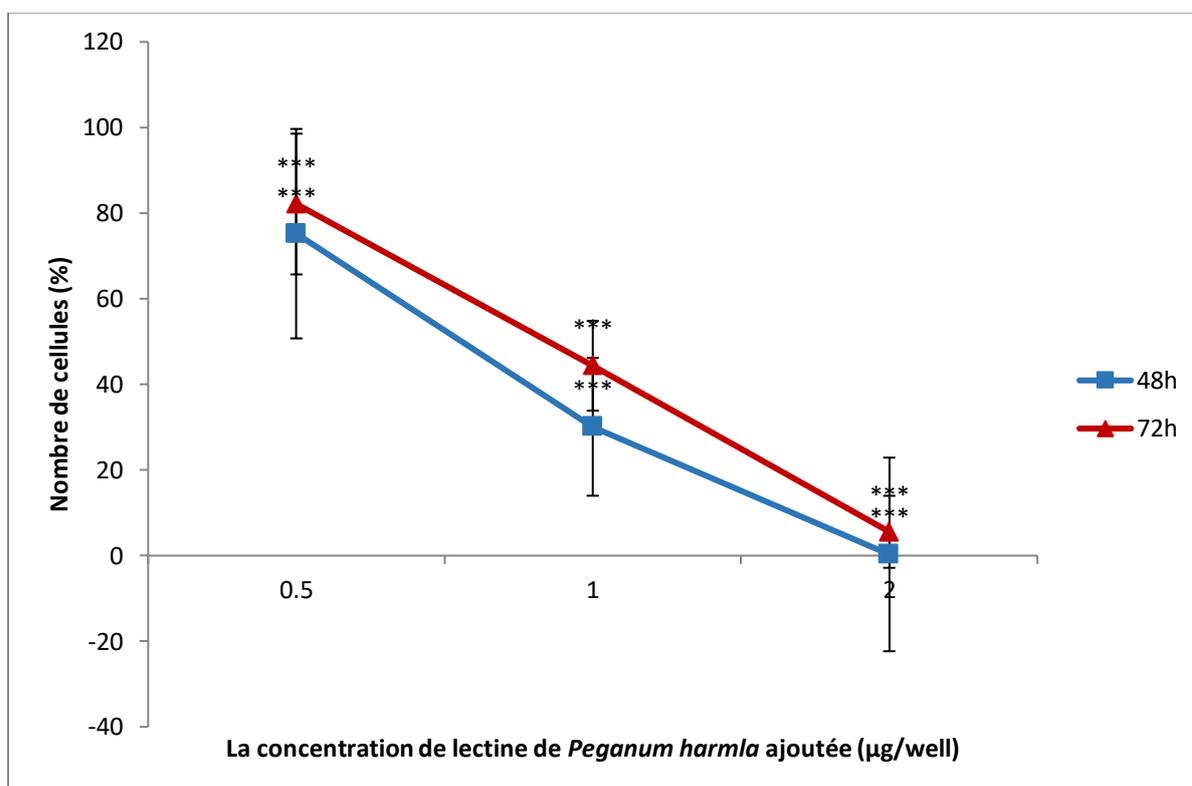
<b>Les érythrocytes</b>	<b>Concentration de protéine (mg/mL)</b>	<b>La plus faible concentration en protéines provoque l'agglutination (mg/mL)</b>
le groupe sanguin humain A	0.181	0.0362
le groupe sanguin humain B		0.0362
le groupe sanguin humain O		0.0362
Les erythrocytes de lapin		0.0181
Les erythrocytes de rat		0.009

### 1.3.6. Activité antiproliférative

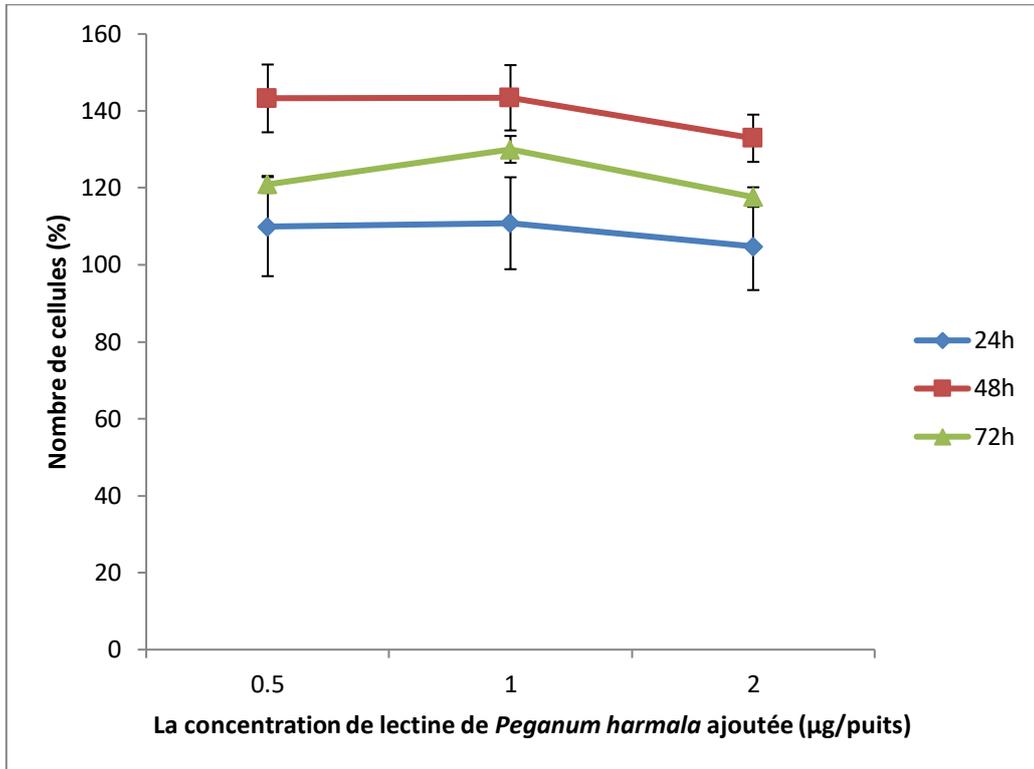
L'effet antiprolifératif de la lectine de *Peganum harmala* contre les cellules de la lignée caco-2 (69.92%) a été observé au deuxième jour à une concentration de 1 µg/puits.

L'effet antiprolifératif le plus élevé de la lectine de *Peganum harmala* contre les cellules de la lignée caco-2 a été observé à une concentration de 2 après 48h et 72h de traitement de 99,7% et 94,4% respectivement et il a montré un effet inhibiteur de croissance de manière dépendant de la dose et de temps (**Figure 26**).

Les résultats indiquent aussi que la lectine de *Peganum harmala* n'a pas un effet antiprolifératif significatif sur la prolifération des cellules de la lignée THP-1 (**Figure 27**).



**Figure 26** : Effet de la lectine de *Peganum harmala* sur la prolifération des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (caco-2), la viabilité cellulaire a été déterminé à l'aide du test de viabilité au rouge neutre. Les données représentent la moyenne  $\pm$  écart type pour n= 6. \*\*\*p < 0.001 par rapport aux témoins qui ont été cultivés sans l'extrait, les barres indiquent l'écart type.



**Figure 27** : Effet de la lectine de *Peganum harmala* sur la prolifération des cellules THP-1 leucémiques humaines. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT. Les données représentent la moyenne  $\pm$  écart type pour n = 6. Les barres indiquent l'écart type.

# *Discussion*

De nombreuses espèces végétales contiennent des protéines liant les glucides, communément appelées lectines ou agglutinines. D'une manière générale, les lectines sont des protéines qui se lient de manière réversible à des mono- ou oligosaccharides spécifiques. Depuis la découverte initiale d'un facteur hémagglutinant dans les extraits de graines de ricin par Stillmark en 1888, plusieurs centaines de ces protéines ont été isolées et caractérisées en détail en ce qui concerne leur spécificité de liaison aux glucides, leur structure moléculaire et leurs propriétés biochimiques (**Peumans et Van Damme, 1995**).

Chez la plante, les lectines jouent un rôle important dans la défense contre les insectes et les champignons (**Peumans et van Damme, 1995**) et certaines lectines établissent des relations hôte-symbiote, notamment dans la symbiose atmosphérique légumineuse-bactérie fixatrice (**Brock et al., 1994**).

Au cours des dernières décennies, les lectines sont devenues un sujet d'intérêt pour un grand nombre de chercheurs en raison de leurs propriétés biologiques potentiellement exploitables notamment antitumorales (**Xu et al., 2015**), immunomodulatrices et anti-insectes (**Lam et Ng, 2011**), activités antifongiques, antibactériennes, anti-VIH et mitogènes (**Mohammed et al., 2012**). En raison de leurs propriétés de liaison au sucre, les lectines ont été largement étudiées et utilisées comme outils moléculaires pour l'étude de l'architecture et de la dynamique des glucides à la surface cellulaire, et ont été exploitées pour des applications pratiques telles que la distinction entre les cellules normales et malignes (**Sharon, 1993 ; Padma et al., 1998**).

Plus récemment, ils ont attiré l'attention de la communauté scientifique en tant que constituants de l'alimentation humaine et animale. Étant donné que les lectines peuvent traverser la barrière gastro-intestinale, elles peuvent atteindre les fluides corporels et les tissus (**Wang et al., 1998**) où elles pourraient exercer plusieurs fonctions physiopathologiques, qui sont actuellement à l'étude. Toutes ces études couvrant différents domaines, du médical au biologique, reposent sur la disponibilité de grandes quantités de lectines sous forme pure. La large application et la variété des utilisations des lectines montrent la nécessité d'isoler les lectines de sources locales et bon marché puisque les lectines sont très chères. L'objectif de notre étude est l'extraction et purification des lectines et leurs études biologiques.

## 1. Extraction

Dans cette étude, la lectine a été extraite de racines de *Ruta montana* et graines de *Peganum harmala* avec trois méthodes différentes (Eau distillée à pH 4, Chlorure de sodium (NaCl), une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,4).

Afin de déterminer la présence des lectines dans chaque extrait un test d'agglutination à l'aide d'érythrocytes des rats a été réalisé. En présence de lectine, les sucres à la surface des globules rouges forment une interaction avec la lectine entraînant une agglutination. Ceci est évident par la formation d'une couche de tapis au fond des puits d'une plaque de microtitration. D'autre part, en l'absence de lectine, les sucres des globules rouges interagissent entre eux et forment un bouton rouge distinctif au fond de la plaque de microtitration.

L'extrait de *Ruta montana* obtenu par NaCl n'a montré aucune agglutination contre les érythrocytes de rat, ce résultat indique l'absence de lectine dans cet extrait, alors que les autres extraits (PBS et eau distillée) ont agglutiné les érythrocytes de rat, ce résultat indique la présence de lectines dans ces deux extraits. Le dosage des protéines a montré que l'extrait de PBS avait une concentration en protéines plus élevée que l'extrait d'eau distillée (**Figure 16**). Cependant, l'extrait d'eau distillée possédait l'activité agglutinante la plus élevée (0.45mg/mL). Ainsi, l'extraction la plus optimale des protéines totales était la solution PBS et l'extraction la plus optimale des lectines était l'extraction à l'eau distillée (**Tableau 3**).

Après le test d'agglutination des trois extraits de *Peganum harmala* contre les érythrocytes de rat, l'extrait de l'eau distillée a montré une forte agglutination, tandis que les autres extraits (PBS et NaCl) n'ont montré qu'une très faible agglutination.

Le dosage des protéines a montré que l'extraction de lectine de *Peganum harmala* par l'eau distillée avait une concentration en protéines plus élevée que les extraits de PBS et NaCl (**Figure 22**), en plus, l'extrait d'eau distillée possédait l'activité hémagglutinante la plus élevée (0.16 mg/mL) (**Tableau 8**). Cela indique que les lectins des grains de *Peganum harmala* et de racines de *Ruta montana* sont des albumines hydrosolubles ou des protéines solubles, qui sont extraites avec des albumines, des acides aminés libres, des polyphénols et des sucres au pH isoélectrique qui provoque la précipitation des globulines (pH 4) (**Megías et al., 2019**).

Selon Wang., *et al* (2014) et Guéguen., *et al* (2016) les protéines solubles dans l'eau représentent l'extrait d'albumine. Par conséquent, les lectines de *Ruta montana* et *Peganum harmala* ont été trouvées dans l'extrait d'albumine. Plusieurs lectines ont été extraites par de l'eau distillée, comme la lectine extraite des graines de *Moringa oleifera* (Santos *et al.*, 2005 ; Coelho *et al.*, 2009 ; Vera-Nuñez *et al.*, 2021), des graines d'*Erophaca Baetica* (Megias *et al.*, 2013), les graines de *Vicia palaestina* (Elamine *et al.*, 2020), Les graines de six espèces de *Vicia* (*V. benghalensis*, *V. dasycarpa*, *V. monantha*, *V. villosa*, *V. cracca*, *V. vicioides*, *V. pseudocracca*, *V. disperma*, *V. tenuifolia* and *V. monardii*) (Megías *et al.*, 2018) et le graines de *Phaseolus vulgaris* (Moreira et Perrone , 1977).

Les protéines sont généralement divisées en globulines et albumines selon la classification d'Osborne et Campbel (1897). Les globulines sont des protéines solubles dans le sel. Les albumines sont solubles dans l'eau et comprennent la plupart des protéines fonctionnelles telles que les enzymes, les inhibiteurs de protéase et les lectines. (Megías *et al.*, 2019).

## 2. Purification

Les extraits d'eau de deux plantes ont été concentrés par ultrafiltration à travers des membranes d'ultrafiltration de 3 kDa pour purifier partiellement les protéines des composés à faible poids moléculaire.

Dans le but de purification des lectines, L'ultrarétentat contenant des albumines concentrées des racines de *Ruta montana* a été soumis à la précipitation au sulfate d'ammonium, puis les fractions présentant une activité agglutinante ont été chargées sur une colonne de filtration sur gel Superose-12 couplée à un système AKTA-Purifier. Tandis que L'ultraconcentré d'albumine de *Peganum harmala* résultant a été soumis à une autre étape de chromatographie par filtration sur gel afin de purifier davantage les lectines potentielles. L'éluat a été contrôlé pour l'activité agglutinante, et les fractions présentant l'activité la plus élevée ont été regroupées et re-chromatographiées.

Les fractions de deux plantes présentant l'activité agglutinante ont été contrôlées par SDS-PAGE puis regroupées, dialysées et concentrées pour d'autres études.

### 3. Caractérisation des lectines

#### 3.1. Détermination du poids moléculaire et de la pureté des lectines

La pureté de la lectine de racines de *Ruta montana* et graines de *Peganum harmala* ont été évaluées à chaque étape de la purification à l'aide de SDS – PAGE dans des conditions réductrices. Le poids moléculaire de la protéine a été calculé en comparant la mobilité de la protéine purifiée à celle des protéines de référence.

La lectine de *Ruta montana* précipitée au sulfate d'ammonium a montré de nombreuses bandes protéiques de poids moléculaire moyen, entre 14.4–43kDa dans la fraction (70-100%) et entre 20.1-67 dans la fraction (50-70%). Après l'étape de purification par filtration sur gel Superose 12, seulement une bande avec une augmentation significative de leur intensité de poids moléculaire 28.26 kDa a été observée.

La masse moléculaire de la lectine de *Ruta montana* a été déterminée également par chromatographie de filtration sur gel Superose 12 préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 50 mM (NaCl 0.5 M pH 7). La lectine a été éluée (0.5 ml / min) avec le même tampon (**figure 17B**). Une masse moléculaire relative de 28.8 kDa a été calculée en utilisant  $V_e/V_0$ . Les résultats indiquent que la lectine de *Ruta montana* possède une structure monomérique. Cette valeur est proche du poids moléculaire rapporté pour la lectine monomérique purifiée à partir de graines d'*Astragalus membranaceus* et de *Bauhinia forficata* de masse moléculaire de 31.5 kDa (**Yan et al., 2010**) et 27.85 kDa (**Silva et al., 2012**) respectivement.

La lectine de *Peganum harmala* purifiée s'est déplacée sous la forme d'un seul pic symétrique lors de la chromatographie sur gel de filtration. La masse moléculaire relative de la lectine de *Peganum harmala* a été estimée par filtration sur gel Superose 12, préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 50 mM (NaCl 0.5 M, pH 7). La lectine a été éluée (0.5 ml / min) avec le même tampon (**figure 23C**). Une masse moléculaire relative de 217.27 kDa a été calculée pour la lectine de *Peganum harmala* en utilisant  $V_e / V_0$ . Dans SDS – PAGE, la protéine présentait une seule bande de poids moléculaire 70.53kDa. Ceci suggère que la lectine est composée de trois sous-unités identiques chacune avec une masse moléculaire de 70.53kDa. ce résultat est similaire à celle de la lectine de sérum de lamproie homotrimère 105 kDa (**Han et al., 2017**).

### 3.2. Activité agglutinante

L'activité hémagglutinante réalisée en plaque de microtitration 96 puits avec des érythrocytes de rat intacts et trypsinisés. L'activité des lectines a été reconnue par leur capacité à agglutiner les globules rouges. L'agglutination se produit à la suite de la lectine multivalente formant des réticulations entre les déterminants glycoprotéiques (ou glycolipidiques) sur la membrane érythrocytaire dans un processus analogue à l'agglutination produite par les anticorps (**Beeley, 1985**).

La lectine extraite des graines de *Peganum harmala* a donné une activité hémagglutinante significativement plus élevée par rapport aux lectines extraites des racines de *Ruta montana*. L'activité des lectines de deux plantes a été fortement augmentée avec des hématies de rat trypsinées ce qui explique la capacité de la trypsine à digérer les protéines, qui masquent les glucides membranaires, cela conduit à l'amélioration de la réactivité des hématies traitées (**Jaffe, 1980**).

La détermination de l'activité hémagglutinante de la lectine de l'extrait de *Ruta montana* par leur incubation avec des érythrocytes a révélé que 0.45 µg/µL était la plus faible concentration de l'extrait brut provoquant l'agglutination, cette valeur est supérieure à celles trouvées pour l'ultraconcentré 0.564 µg/µL, cela explique par la présence d'autres substances non protéiques dans l'extrait brut comme des polyphénols qui peuvent induire le phénomène d'agglutination (**Cortés-Giraldo et al., 2012**). Après la précipitation au sulfate d'ammonium, l'activité hémagglutinante a été améliorée environ 3 fois et ce résultat nous permet de confirmer, qu'effectivement nous sommes en présence de substances protéiques de type lectine. Tandis que la plus faible concentration de la lectine pure de *Ruta montana* provoquant l'agglutination était 0.035 µg/µL. cette valeur proche à celle de la lectine de *Erophaca Baetica* 0.03 µg/µL (**Megías et al., 2013**), et inférieure à celles précédemment trouvées pour la lectine de *V. pseudocracca* 0.059 µg/µL et *V. monardii* 0.14 µg/µL (**Megias et al., 2019**).

La plus faible concentration de l'extrait brut de *Peganum harmala* provoquant l'agglutination était 0.16 µg/µL ; cette valeur est inférieure à celle de l'extrait *Ruta montana*. Après la purification, l'activité hémagglutinante a été améliorée plus de 17 fois (0.009 µg/µL), cette valeur similaire à celle de la lectine de *Vicia dasycarpan* 0.009 µg/µL (**Megias et al., 2019**), et supérieure à celles précédemment trouvées pour la lectine de *Vicia palaestina* 0.0025 µg/µL (**Elamine et al., 2020**) ; *V. villosa* 0.0034 µg/µL ; *V. cracca* 0.004 µg/µL ; *V.*

*disperma* 0.0036 µg/µL (Megias *et al.*, 2019) et la lectine de *Pinellia ternata* 0.008 µg/µL (Zuo *et al.*, 2012).

### 3.3. Spécificité

L'agglutination des globules rouges par les lectines peut être inhibée par des sucres spécifiques qui se lient au site actif des lectines. Certaines lectines sont inhibées par plusieurs sucres différents, tandis que d'autres sont fortement inhibées par un sucre spécifique (Rüdiger et Gabius, 2001).

La spécificité de liaison aux glucides de lectine de *Ruta montana* et *Peganum harmala* a été évaluée par la capacité des sucres à inhiber l'agglutination des érythrocytes des rats. La lectine de *Ruta montana* a été inhibée par 31.25 mM de galactose et 125 mM de glucose (Tableau 6), ce qui indique qu'il appartient au groupe des lectines végétales de galactose. Ce qui est également le cas pour la lectine isolée de latex de *Synadenium carinatum* (Souza *et al.*, 2005), la lectine de graines de *Erythrina lysistemon* (Konozy, 2012), la lectine de graines de *Lotus corniculatus* (Rafiq *et al.*, 2013), la lectin de racines d'*Astragalus membranaceus* (Yan *et al.*, 2010) et la lectine de racines de *Astragalus mongholicus* (yan *et al.*, 2005).

L'activité hémagglutinante de *Peganume haramla* n'a pas été atténuée après l'ajout d'une variété d'hydrates de carbone, notamment galactose, mannose, fructose, saccharose et glucose (Tableau 11), indiquant que la lectine de *Peganum harmala* ne s'est lié à aucun d'entre eux.

Les globules rouges ont été largement utilisés dans les expériences d'agglutination car ils sont facilement obtenus, facilement visualisés et leurs surfaces portent une gamme de différents types de groupes glucidiques. La variété des déterminants glycoprotéiques et glycolipidiques peut être étendue par traitement des cellules avec des protéases ou des glycosidases ou en utilisant des érythrocytes d'espèces différentes (Beeley, 1985).

La plupart des lectines agglutinent les érythrocytes de tous les groupes sanguins humains, agissant à peu près à la même dilution avec différents groupes sanguins, et sont généralement appelées lectines non spécifiques, ou panagglutinines, ou lectines à large spécificité (Sharon et Lis, 1972). Les lectines spécifiques agglutinent préférentiellement les érythrocytes humains d'un type sanguin donné et forment des précipités avec les substances solubles correspondantes du groupe sanguin. (Sharon et Lis, 1972).

La lectine de *Ruta montana* a montré une spécificité vis-à-vis du groupe sanguin humain B uniquement, Cela peut être dû à l'absence de récepteurs spécifiques des lectines à la surface des globules rouges humaine A et O. Et une l'activité hémagglutinante contre les érythrocytes de rat plus élevé que les érythrocytes de lapin a été observée.

Plusieurs lectines démontrent une préférence pour agglutiner un ou plusieurs types d'érythrocytes humains ou certains animaux, comme la lectine *Sphenostyles stenocarpa*, qui a démontré une forte agglutination du sang humain de type O (Machuka *et al.*, 1999), la lectine *Hevea brasiliensis* qui a préférentiellement des érythrocytes de lapin agglutinés (Wititsuwannakul *et al.*, 1998) et la lectine de *Talisia esculenta* qui a démontré une préférence pour le groupe sanguin humain AB (Freire *et al.*, 2002).

La lectine de *Peganum harmala* agglutine tous les érythrocytes du groupe sanguin ABO avec une compétence similaire indiquant qu'il n'y a pas de spécificité envers les groupes sanguins. Cela peut être dû à la présence de récepteurs spécifiques des lectines sur toutes les surfaces des globules rouges. Les lectines de nombreuses espèces végétales s'agglutinent également les érythrocytes du groupe sanguin ABO, comme : Nagata et Burger (1974) ; De Mfsa *et al.*, (2004) ; Kavita *et al.*, (2020) ont rapporté que la lectine de germe de blé (WGL), la lectine de *Moringa Pterygosperma* et la lectine de *Lantana camara* respectivement n'étaient pas des lectines spécifiques aux groupes sanguins.

La lectine de *Peganum harmala* a révélé une activité hémagglutinante élevée lorsqu'ils ont été testés contre des globules rouges de rat par apport aux érythrocytes de lapin ce résultat est similaire à celui de lectine de *Ruta montana*.

### 3.4. Effet de la température et du pH

La structure des protéines est fortement influencée par des facteurs environnementaux, tels que le pH et la température (Lakowicz, 2006). Nous avons étudié l'effet de différentes températures sur la structure native des deux lectines.

La structure tridimensionnelle d'une protéine est maintenue par des interactions non covalentes, à savoir. Liaisons hydrogène, interactions ioniques, interactions hydrophobes, forces de van der Waals et de manière covalente par des liaisons disulfure. Les conditions qui perturbent ces forces stabilisatrices affectent la conformation native de la protéine en modifiant ses propriétés physiques et son activité biologique (Khan *et al.*, 2007).

Pour étudier la stabilité thermique de la lectine, la lectine de *Ruta montana* a été incubée pendant 30 min à différentes températures de 4 ° C à 100 ° C. L'activité hémagglutinante de la lectine a été complètement maintenue à des températures allant de 4 à 50 ° C pendant 30 min, l'activité de la lectine de *Ruta montana* a perdu son activité à 70°C pendant 30 min,

La stabilité thermique de la lectine de *Peganum harmala* a été étudiée en la soumettant à différentes températures à des durées croissantes.

L'activité d'hémagglutination maximale du lectine de *Peganum harmala* a été obtenue à 50°C, la lectine restait significativement stable en dessous de 50 °C pendant 60 min sans perdre son activité hémagglutinante. Lorsque la température était supérieure à 50°C, l'activité hémagglutinante de ce lectine a été diminuée et une relation linéaire a été observée pour le pourcentage d'activité résiduelle par rapport à la température et au temps de traitement (**Figure 22A**). L'activité de la lectine de *Peganum harmala* a été entièrement perdue à 80, 90 et 100°C pendant 10 min, ce résultat est similaire à celui de la lectine de graines de *Erythrina speciosa* était assez stable à 65°C pendant plus de 90 min; cependant, lorsqu'il est chauffé à 70°C pendant 10 min, il perd plus de 80% de son activité d'origine et est totalement inactivé à 80°C chauffé pendant moins de 10 min (**Konozy et al., 2003**). L'endurance à la chaleur des différentes lectines variait également. Par exemple, la lectine de *Tritrichomonas fetus* a entièrement perdu son activité à 80 °C pendant 30 min (**Babal et al., 1999**), la lectine de loach skin mucus a entièrement perdu son activité à 85 °C pendant 6 min (**Sun et al., 2019**) et la lectine des graines *Moringa Pterygosperma* a perdu son activité à 80°C pendant 1.5 min et à 90°C et à 100°C après 1 h (**De Mfsa et al., 2004**),

La perte d'activité biologique de la lectine *Peganum harmala* avec l'augmentation de la température est due à la déstabilisation des interactions faibles de la structure tertiaire responsables de la conformation native de la lectine.

Les lectines de deux plantes étaient remarquablement moins thermostables par rapport aux résultats trouvés par **Silvaa et al., 2012 ; Li et al., 2012 ; Correia et Coelho, 1995 ; Zuo et al., 2012 ; Chan et al., 2013 et Wong et al., 2010**

La lectine de *Ruta monatna* et la lectine de *Peganum harmala*, une fois qu'elles ont perdu ses activités hémagglutinantes à 70°C pendant 30min et à 80°C pendant 10 min respectivement, n'ont pas pu la retrouver lorsqu'elles ont été refroidies à température

ambiante. Ceci montre que la cinétique d'inactivation de l'activité hémagglutinante de deux lectines à ces températures est un processus irréversible.

La stabilité thermique de la lectine de *Ruta montana* et la lectine de *Peganum harmala* jusqu'à une température 50°C, indique que l'extraction de la lectine peut se faire à température ambiante sans subir de dénaturation. De plus, cela suggère la possibilité de sécher à 40-50°C sans perdre l'activité de la lectine.

Un test d'héagglutination de la lectine de *Ruta montana* avec différents pH montre que la lectine est active à partir de pH 3. Le pH optimal pour l'activité hémagglutinante de la lectine de *Ruta montana* a été observé dans la plage pH de 4.2 à 9. Avec une augmentation ou diminution supplémentaire du pH, l'activité hémagglutinante diminue et ne conserve que 50% d'activité à pH 10 et 3, et elle a perdu leur totale activité à pH 2. **Yan et al., 2005** a également signalé que l'activité de la lectine d'*Astragalus mongholicus* a été complètement inhibée à inférieure de pH 3. Ainsi, un milieu plus acide et plus alcalin sont des conditions moins favorables à l'activité de la lectine de *Ruta montana*.

Le pH optimal pour une activité hémagglutinante maximale de la lectine de *Peganum harmala* a été présenté à 4.2-9. La lectine a perdu complètement leur activité à pH 2. À pH 3 et pH 10 l'activité hémagglutinante de la lectine a été réduite à ~ 50 % (**Figure 25B**). Contrairement à nos observations, dans des études antérieures, **Chan et al., 2013 ; De Mfsa et al., 2004** ont rapporté que la lectine de Northeast Red Beans et la lectine de *Moringa Pterygosperma* respectivement ont été conservées ses pleines activités hémagglutinantes dans la large gamme de pH 2 à 12.

L'activité de lectine de *Peganum harmala* et de lectine de *Ruta montana* est réduite au-dessus de pH 9, **Boulgakov et al., (2004)** et **kaur et al., (2005)** ont obtenu des résultats similaires pour la lectine purifiée à partir de *Ruditapes philippinarum* et *Arundo donax* respectivement.

L'absence de l'activité hémagglutinante de la lectine de *Peganum harmala* et la lectine de *Ruta montana* à pH 1 et 2, et ses activités diminuent à 50 % à pH 3 empêchent ses développements en tant que médicament administré par voie orale, en raison de la plage de pH du suc gastrique de 1 à 3 (**Wong et al., 2010**). En revanche, les deux lectines peuvent être utilisée comme médicament injectable car elle est stable à la température et au pH physiologiques dans le plasma (**Wong et al., 2010**).

#### 4. Activité antiproliférative

Le cancer est une maladie grave caractérisée par une croissance incontrôlée des cellules, le traitement actuel du cancer a des effets secondaires désagréables, cela encourage les scientifiques à trouver le traitement alternatif à partir du composé naturel (**Islam et al., 2018**).

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, avec un nombre croissant de cas signalés chaque année. Le coût élevé de la chimiothérapie et le taux de mortalité élevé justifient le besoin croissant de développer de nouveaux médicaments chimiothérapeutiques. De nombreux médicaments anticancéreux disponibles présentent une toxicité pour les cellules normales, possèdent des effets indésirables et sont moins efficaces contre plusieurs types de cancer, ce qui entraîne un besoin de composés bioactifs provenant de sources naturelles qui jouent un rôle important dans le développement de médicaments chimiopréventifs pour combattre le cancer (**Nascimento et al., 2012**).

La propriété anti-proliférative des lectines a été démontrée in vitro, in vivo et dans des études de cas humains, suggérant leur rôle en tant qu'agents thérapeutiques. Les molécules de lectine sont connues pour se lier aux membranes ou aux récepteurs des cellules cancéreuses et présentent une cytotoxicité, une apoptose et une inhibition de la croissance tumorale (**De Mejia et Prisecaru, 2005**).

Plusieurs études ont rapporté que la lectine végétale a la capacité d'inhiber la croissance des cellules (**Megías et al., 2013; Elamine et al., 2020**), en outre, elles ont démontré que les lectines peuvent différencier les cellules malignes des cellules normales et induire l'apoptose (**Fu et al., 2011**). Ces résultats ont reçu une grande attention de nombreux auteurs et les ont encouragés à étudier les lectines pour les utiliser dans le traitement du cancer.

La propriété antiproliférative des lectines était due à la présence de sucres spécifiques sur la membrane cellulaire des cellules cancéreuses et à la capacité des lectines à connaître et à se lier à ces sucres spécifiques, l'affinité des lectines végétales pour les cellules cancéreuses est clairement établie (**Bhutia et al., 2019**). Cette affinité a été liée à la liaison spécifique des lectines à des structures de sucre singulières.

Ainsi, les cellules cancéreuses sont caractérisées par leur glycocalyx particulier qui expose des résidus de sucre qui ne sont pas exposés dans les cellules normales.

L'identification des cellules malignes à l'aide des lectines est basée sur cette exposition différentielle des sucres à la surface des cellules cancéreuses, qui a également été mise en relation avec les propriétés antiprolifératives des lectines. Une lectine de *Viscum album* (Santalaceae) a été proposée comme adjuvant dans le traitement de chimiothérapie (**Horneber et al., 2008**). Autres lectines, y compris celles d'*Astragalus membranaceus* (**Yan et al., 2010**), *Erophaca baetica*, (**Megías et al., 2013**) et *Canavalia ensiformis* (**Chang et al., 2012**) ont également montré une activité antiproliférative.

Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité antiproliférative de la lectine *Ruta montana* et *Peganum harmala* contre les cellules des lignées Caco-2 et THP-1.

Les lignées cellulaires Caco-2, dérivées d'un adénocarcinome du côlon, sont utilisées comme modèle de cellules cancéreuses exposées à des composants bioactifs. Les cellules Caco-2 ont été exposées à 0.5, 1 et 2 µg/puits de la lectine *Ruta montana* et *Peganum harmala* pendant 48 et 72 h (figure 5A). L'effet de la lectine de *Ruta montana* et *Peganum harmala* sur la prolifération des cellules cancéreuses a également été analysé sur les cellules THP-1, dérivées d'un cas de leucémie. Ces cellules poussent en suspension et représentent un modèle de monocytes. Les cellules THP-1 ont été exposées à 0.5, 1 et 2 µg/puits pendant 24, 48 et 72 h.

L'incubation des cellules cancéreuses Caco-2 en présence de lectine de *Ruta montana* à une concentration de 2 µg/puits pendant 72h a inhibé la prolifération de 56.2 %, tandis que l'incubation des cellules de la lignée THP-1 en présence de lectine de *Ruta montana* a augmenté la prolifération jusqu'à 57.72 % à concentration 2 µg/puits après 72 h d'incubation (Figure 4). Un résultat similaire a été observé dans la lectine (agglutinine d'arachide, PNA) purifiée à partir d'arachide qui a eu un effet stimulant sur les cellules embryonnaires et hépatiques du poisson zèbre (**wang et al., 2019**) et sur les cellules cancéreuses du côlon HT29 (**Ryder et al., 1992**), en revanche, il induit la mort cellulaire dans les cellules HeLa (**Mukhopadhyay et al., 2014**)

L'effet anti-prolifératif de la lectine de *Peganum harmala* contre les cellules de la lignée caco-2 (69.92%) a été observées au deuxième jour à une concentration de 1 µg/puits. L'effet antiprolifératif le plus élevé de la lectine de *Peganum harmala* contre les cellules de la lignée caco-2 a été observé à une concentration de 2 après 48h et 72h d'incubation de 99.7% et 94.4% respectivement et il a montré un effet inhibiteur de croissance dépendant de la dose. À une concentration de 0.5 µg/mL, la lectine de *Peganum harmala* était presque

inefficace contre la lignée cellulaire Caco-2 dans toutes les durées. La lectine du jacquier (*Artocarpus heterophyllus*) (Yu *et al.*, 2001) et la lectine de *Lantana camara* (Hiremath *et al.*, 2020) inhibent également la prolifération in vitro des cellules cancéreuses du côlon humain (les lignées cellulaires HT29).

La lectine de *Peganum harmala* s'est avérée inactive contre les lignées cellulaires THP-1 à toutes les concentrations et pendant toute la durée de cette étude. La lectine de *Aspidistra elatior* a également montré une activité antiproliférative in vitro significative vis-à-vis des lignées cellulaires tumorales Bre-04, Lu-04, HepG2 et Pro- -01, cependant, cette lectine n'a pas réussi à limiter la prolifération de la lignée cellulaire HeLa (Xu *et al.*, 2015).

Il a été rapporté que les lectines purifiées à partir d' *Erophaca. baetica* (Megías *et al.*, 2013) et de *Viscum album* (Hostanska *et al.*, 1996) et *Vicia palaestina* (Elamin *et al.*, 2020) inhibent la prolifération des cellules THP-1. ce qui est en contraste avec notre étude

Alors que les cellules Caco-2 représentent un modèle d'exposition des cellules de la paroi intestinale aux composants bioactifs (Girón-Calle *et al.*, 2010), l'exposition des cellules des tissus périphériques ou des cellules sanguines telles que celles modélisées par les cellules THP-1 nécessiterait l'absorption des lectines du tractus intestinal. Cela semble peu probable, mais cela peut en fait être possible car les lectines végétales sont très résistantes à la digestion. De plus, la présence de lectines végétales dans des organes distants tels que le système nerveux central a été rapportée (Zheng *et al.*, 2016).

*Conclusion et  
Perspectives*

## **Conclusion**

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le contexte général de l'étude des lectines d'origine végétale. Ils ont été divisés en trois parties et m'ont permis d'aborder différentes techniques qui permettent de purifier et caractériser la lectine de racine de *Ruta montana* et la lectines de graines de *Peganum harmala*

La première partie de mes travaux a été consacrée à l'extraction et la purification des lectines. Dans un premier temps, nous avons comparé différentes protocoles d'extraction des lectines, eau distillée à pH 4, chlorure de sodium (NaCl) et une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Il a apparu que le protocole optimal était l'extraction par l'eau distillé à pH 4. Suite à l'extraction protéique avec l'eau distillée, l'eau et les petites molécules de faible poids moléculaire sont éliminés à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration Amicon possédant un seuil de coupure de 3 kDa. La première lectine a été isolées à partir de *Ruta montana* en utilisant deux techniques précipétation au sulfate d'ammonium et chromatographie. La deuxième lectine a été isolé à partir de *Peganum harmala* par filtration sur gel avec Superose 12. Chaque étape a été suivie par le test d'agglutination et SDS PAGE pour vérifier l'existence et la pureté des lectine respectivement.

Les deux autres parties de mes travaux de thèse ont portés sur la caractérisation lectines et l'évaluation de leurs activités antiprolifératives

Le poids moléculaire de la lectine de deux plantes a été déterminé par SDS – PAGE et chromatographie par filtration sur gel, les résultats obtenus indiquent que la lectine de *Ruta montana* possède une structure monomère avec une masse moléculaire de 28.8 kDa, Tandis que La lectine de *Peganum harmala* était composée de trois sous-unités identiques, chacune avec une masse moléculaire de 70.53 kDa.

La lectine de *Ruta monatana* agglutine les érythrocytes de rat à une plus grande intensité par rapport aux autres érythrocytes (lapin et groupes sanguins humain ABO), cette activité a été fortement améliorée en présence de trypsine. Elle présente une spécificité pour le galactose et glucose et réagissait spécifiquement avec le groupe sanguin humain de type B. la lectine de *Ruta montana* a été thermostable jusqu'à 50 °C et a perdu son activité à 70°C pendant 30 min, plus stables dans la gamme de pH neutre.

La lectine de *Peganum harmala* a agglutiné tous les érythrocytes de même intensité, La plus fortes agglutinations ont été obtenues après la trypsinisation des érythrocytes de rat.

Elle a montré leur pouvoir à agglutiner toutes les hématies sans spécificité de groupe sanguin dans le système ABO, aucun des glucides utilisés pour le test n'a été capable d'inhiber l'activité hémagglutinante de ce lectine. L'activité de la lectine de *Peganum harmala* a été entièrement perdue à 80, 90 et 100°C pendant 10 min, plus stables dans la gamme de pH neutre et légèrement alcalin ou acide.

L'activité antiproliférative de la lectine de deux plantes contre deux lignées de cellules cancéreuses human leukemic THP-1 et Caco-2a été explorée via l'utilisation de test colorimétrique MTT et rouge neutre respectivement. Les résultats obtenus après le traitement des deux lignées de cellules cancéreuses avec les différentes concentrations de deux lectines (0.5, 1 et 2 µg/puit) indiquent que la lectine de *Ruta montana* a un effet inhibiteur significatif sur la prolifération des cellules de la lignée caco-2 à une concentration de 2 après 72 h d'incubation de 56,2 %, et stimule la prolifération cellulaire des cellules de la lignée THP-1 jusqu'à 57,72 % à 2 après 72 h d'incubation. La lectine de *Peganum harmala* a manifesté une activité antiproliférative significative en fonction de dose et temps contre les cellules cancéreuses Caco-2, l'effet anti-prolifératif le plus élevé de la lectine de *Peganum harmala* contre les cellules de la lignée caco-2 a été observé à une concentration de 2 après 48h et 72h d'incubation de 99,7% et 94,4% respectivement et elle n'a pas provoqué des effets antiprolifératifs sur les cellules de la lignée THP-1.

### **Perspectives**

Cependant, à l'avenir, La sécurité d'utilisation de ces lectines purifiées devrait être davantage confirmée par un test de cytotoxicité de la lectine in vivo en utilisant un modèle animal.

En outre, d'autres études portant sur La structure 3D et les séquences protéiques et leurs activités biologiques comme : antiviral, anti-insecte et immunomodulatrices ... seraient dignes d'être menées à l'avenir.

*Références  
bibliographiques*

**A**

Abbassi, K., Mergaoui, L., Atay-Kadiri, Z., Stambouli, A., Ghaout, S. (2003). Activité biologique de l'extrait de graines de *Peganum harmala* sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål 1775). *Journal of Orthoptera Research*, 12 (1): 71-78.

Abdullaev, F.I., de Mejia, E. G. (1997). Antitumor effect of plant lectins. *Natural Toxins*, 5: 157-163.

Akkouh, O., Ng, T.B., Singh, S.S., Yin, C., Dan, X., Chan, Y.S., Pan, W., Cheung, R.C.F. (2015). Lectins with anti-HIV activity: a review, *Molecules*, 20; 648–668.

Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(9): 1593-1608.

Araújo, R. M.S., Vaz, A. F.M., Aguiar, J. S., Coelho, L. C.B.B., Paiva, P. M.G., Melo, A. M.M., Silva, T. G., Correia, M.T.S. (2011). Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. *Natural Products and Bioprospecting*, 1: 97–100.

Ashraf, M. T., Khan, R. H. (2003). Mitogenic lectins, *Medical Science Monitor*, 9(11) : RA265–RA269.

Asgarpanah, J., Ramezanloo, F. (2012). Review : Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* , 6(22):1573-1580.

Azarkan, M., Georges, F., Julie, V., Raphaël, H., Rachida, E-M., Eric, S., Arnaud, V.B., André, M., Paulette, C., Frédéric, K (2018). Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (*Ananas comosus*) stem, *Scientific Reports*, 8 (11508) : 1-13

**B**

Babal, P., Pindak, F. F., Russell, L. C., Gardner, W. A. (1999). Sialic acid-specific lectin from *Tritrichomonas foetus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, 1428 (1): 106–116.

Balzarini, J. (2006). Large-molecular-weight carbohydrate-binding agents as HIV entry inhibitors targeting glycoprotein gp120. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 1(5): 355-360.

- Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica ET Biophysica Acta - Biomembranes*, 1154 (3–4):237–282.
- Barondes, S. H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*, 13:480-482.
- Barre A., Van Damme E.J. M., Peumans W.J., Rougé P (1996). Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding. Lectins. *Plant Physiology*, 112: 1531-1540
- Barton, C., Kouokam, J.C., Lasnik, A.B., Foreman, O., Cambon, A., Brock, G., Montefiori, D.C., Voidani, F., Mc.Cormick A.A., O'Keefe B.R., Palmer K.E (2014) .Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad-spectrum antiviral lectin griffithsin in two laboratory rodent models, *Antimicrob Agents Chemother*, 58(1): 120–127.
- Beeley, J.G. (1985). Lectin techniques *In Glycoprotein and Proteoglycan Techniques: In the Series 'Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 16, Elsevier; Amsterdam : 301-364.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35: 123–143.
- Benali, T., Habbadi, K., Khabbach, A., Marmouzi, I., Zengin, G., Bouyahya, A., Chamkhi, I., Chtibi, H., Aanniz, T., Achbani, E. H., & Hammani, K. (2020). GC–MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea odorata* Subsp. *pectinata* and *Ruta montana* essential oils and their potential use as food preservatives. *Foods*, 9(668):1-17. <https://doi.org/10.3390/foods9050668>
- Bhutia, S. K., Panda, P. K., Sinha, N., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Mahapatra, K. K., Saha, S., Patra, S., Mishra, S. R., Behera, B. P., Patil, S., Maiti T. K. (2019). Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagydependent cell death. *Pharmacological Research*, 144 :8–18.
- Bonnier, G. (1999). La Grande flore en couleur. Tome 3, Belin :205 - 206.
- Bouzidi, M. A., Latrèche, A., Attaoui, I., Benabderrahmane, M., Mehdadi, Z., Benyahia, M. (2012). Antibacterial Effect of the Essential Oils Extracted From *Ruta chalepensis* L. and *Ruta montana* (L.) L. *Journal of Life Sciences*, 6: 898-902.

Bnouham, M., Mekhf, H., Legssyer A., Ziyat A. (2002). Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 10: 33–50.

Brock, T. D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. (1994). Biology of microorganisms. 7<sup>ième</sup> édition, Prentice-Hall, Inc, USA: 909.

Bukhari, N., Choi, J.H., Jeon, C.W., Park, H.W., Kim, W.H., Khan, M.A., Leet, S.H. (2008). Phytochemical Studies of the Alkaloids from *Peganum Harmala*. *Applied Chemistry*, 12(1): 101-104.

Bulgakov, A.A, Park, K.I., Choi, K.S., Lim, H.K., Cho, M. (2004). Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish and Shellfish Immunology*, 16(4): 487-499.

### C

Carvalho, A.S., da Silva, M.V., Gomes, F.S., Paiva, P.M.G., Malafaia, C.B., da Silva, T.D., Vaz, A.F.M., da Silva, A.G., Arruda I.R., Napoleão T.H., Carneiro-da-Cunha M.d., Correia M.T. (2015). Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75:402–408.

Chandra, N.R., Ramachandraiah, G., Bachhawat, K., Dam, T.K., Surolia, A., Vijayan, M. (1999). Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from Garlic: quaternary association and Carbohydrate specificity. *Journal of Molecular Biology*, 285(3):1157-1168.

Chan, Y. S., Wong, J.H., Fang, E. F., Pan, W., Ng, T. B. (2013). A hemagglutinin from northeast Red beans with immunomodulatory activity and anti-proliferative and apoptosis-inducing activities toward tumor cells. *Protein & Peptide Letters*, 20(10): 1159–1169.

Chandrasekaran, G., Lee, Y., Park, H., Wu, Y., Shin, H. (2016). Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the Korean cauliflower medicinal mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18: 291–299.

Chang, C. P., Yang, M. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., Lei, H. Y. (2007). Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*, 45: 286–296.

- Chiba, S (1997). A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 44: 7–10.
- Chilson, O. P et Kelly-Chilson A. E (1989). Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes, *European Journal of Immunology*, 19(2) : 389–396.
- Coelho, J. S., Santos, N. D. L., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Ferreira, R. S., Zingali, R. B., Coelho, L. C. B. B., Leite, S. P., Navarro, D. M. A. F., Paiva, P. M. G. (2009). Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, 77(7):934-938.
- Coelho, M.B., Marangoni, S., Macedo, M.L. (2007). Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146:406–414.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3 (1): 31–40.
- Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (1995). Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55: 261-273.
- Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Megías, C. (2012). Hemagglutinating activity of polyphenols extracts from six grain legumes. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1951–1954.

## D

- Daoudi, A., Hrouk, H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibjibijen, J., Nassiri, L. (2016). Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: Etude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7 (3) : 926-935.
- De Mejía, E.G., Prisecaru, V.I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 425–445.
- De Mfsa, M.D., Mojica E-R. E., Merca F. E. (2004). Purification of lectin from mature seeds of malunggay (*Moringa pterygosperma*). *Philippine Journal of Crop Science*, 29(3) 13-24.
- de Oliveira, S.F., das Neves, S. P., de Melo, C. M., Teixeira, E.H., de Sousa, C.B., Arruda, F.V., Cajazeiras, J.B., Almeida, A.C., Pereira, V.A., Porto, A.L. (2011). Immunostimulatory

activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. *Cell and Tissue Research*, 346: 237–244.

De Virgilio, M., Lombardi, A., Caliandro, R., Fabbrini, M. S. (2010). Ribosome inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. *Toxins*, 2 : 2699–2737.

Dias, R.d.O., Machado, L.d.S., Migliolo, L., Franco, O. L. (2015). Review: Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*, 20: 519-541.

Drickamer, K. (1993). Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 9:237-264.

Drickamer, K., Taylor, M. E. (1993). Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell Biology*, 9: 237–264.

Dunster, J., Dunster, K. (1996). Dictionary of natural resource management: the comprehensive, single source guide to natural resource management terms. UBC, Canada : 343- 344.

## **E**

Elamine, Y., Torres-Salas, V., Messai, A., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2020). Purification, characterization, and antiproliferative activity of a single-chain lectin from *Vicia palaestina* (fabaceae) seeds. *Chemistry & biodiversity*, 17: e2000827.

Esko, J., Sharon, N. (2009). Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins *In Essentials of Glycobiology*. 2<sup>ième</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 489–500.

Estrada-Martínez, L. E., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2017). Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1-9.

## **F**

Forment, M., Roques, H. (1941). Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ofalac, Alger : 59.

Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, Se., Macedo, M. L. R. (2002). Isolation and partial

characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61–68.

Fu, L., Zhou, C., Yao, S., Yu, J., Liu, B., and Bao, J. (2011). Plant Lectins: Targeting Programmed Cell Death Pathways as Antitumor Agents. *The International Journal of Biochemistry and cell biology*, 43 (10), 1442-1449.

## G

Gabius, H.J. (1997). Animal lectins. *European Journal of Biochemistry*, 243 (3) : 543–576.

García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-Cuevas, A.L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A.J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J.L., Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 64: 1269–1278.

Gerardo, R. V., Hafiz, A. (2008). Introduction to animal lectins in animal lectins: A functional view. 1<sup>ière</sup> edition CRC, Boca Raton: 3-5

Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2010). Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Research International*, 43:1365-1370.

Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 20: 245–277.

Guéguen, J., Walrand, S., Bourgeois, O. (2016). Plant proteins: Context and potentialities for human food. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(4) : 177-185.

Guillot, J. (2000). Lectines d'hier et d'aujourd'hui. *Acta Botanica Gallica*, 147(3) : 297-299.

Guillot, J., Kanska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25: 203–230.

Gupta, G., Surolia, A., Sampathkumar, S.G. (2010). Lectin microarrays for glycomic analysis. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14: 419–436.

## H

Hamed, E. El-S., Ibrahim, M. M.El-A., Mounir, M.S. (2017). Antimicrobial activities of Lectins extracted from some cultivars of *Phaseolus vulgaris* Seeds. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 9(3):109-116.

- Hammami, I., Smaoui, S., Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Ali, T.M. (2015). *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI Journal*, 14:83-94.
- Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Springer-Verlag, Paris (France) : 409.
- Han, Y., Zhong, Z., Song, L., Olsson, S., Wang, Z., Lu, G. (2018). Evolutionary analysis of plant jacalin-related lectins (JRLs) family and expression of rice JRLs in response to *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(6): 1252–1266.
- Han, Y., Liu, X., Song, X., Gou, M., Pang, Y., Li, Q. (2017). Isolation of lectin from lamprey serum. *Medical Research and Innovations*, 1(5): 1-4.
- Hartley, M.R., Lord, J.M. (2004.) Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1701: 1-14.
- Hasan, I., Ozeki, Y., Kabir, S.R. (2014). Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*). *Indian J Biochem Biophys*, 51:142– 148.
- Hassan, M.A. A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T.W., Tiralongo, J. (2015). Review Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 7802-7838.
- Hassani, L. M. I., Hermas, J. (2008). Effects of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) feeding on the digestive track of the migratory locust *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae). *Zoologica Baetica*, 19: 71-84,
- Herraiz, T., Gonzalez, D., Ancin-Azpilicueta, C., Aran, V.J., Guillen, H. (2010). Beta-carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO), *Food and Chemical Toxicology*, 48(3): 839-845.
- Himansha, S., Sarathi, S. P. (2012). A review: Insight of Lectins. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3(4): 1-9.
- Hiremath, K.Y., Jagadeesh, N., Belur, S., Kulkarni, S.S., Inamdar, S.R. (2020). A lectin with anti-microbial and anti-proliferative activities from *Lantana camara*, a medicinal plant. *Protein Expression and Purification*, 170: 105574.

Hogervorst, P.A., Ferry, N., Gatehouse, A.M., Wäckers, F.L., Romeis, J. (2006). Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *Journal of Insect Physiology*, 52:614–624.

Horneber, M., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K., Rostock, M. (2008). Review: Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2 (CD003297): 1-72.

Hossaini, A. (1968). Hemolytic and hemagglutinating activities of 222 plants. *Vox Sanguinis*, 15(6):410–417.

Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Leutzen, H., Sütterlin, B., Saller, R., (1996). A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes THP-1 cells and murine thymocytes. *Nature Immunology*, 15 (6): 295–311.

## I

Imberty, A., Mitchell, E.P., Wimmerová, M. (2005). Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current opinion in structural biology*. 15(5): 525-534.

Islam, B., Khan, A. U. (2016). Lectins: To Combat Infections in *Protein purification*. Intechopen, India: 167- 188

Islam, M.d.S., Rahi, M.d.S., Jahangir, C. A., Rahman, M.d.H., Jerin, I., Amin, R., Faisal, K. M.d. H., Reza, M.d.A. (2018). In Vivo Anticancer Activity of *Basella alba* Leaf and Seed Extracts against Ehrlich's Ascites Carcinoma (EAC) Cell Line. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018 (1537896): 11.

Itakura, Y., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Tateno, H., Hirabayashi, J. (2017). Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1160-1182.

## J

Jaffe, W.G. (1980). Hemagglutinins (Lectins). In *Toxic constituents of plant foodstuffs*. 2<sup>ième</sup> édition, Academic Press, New York: 73-102.

Jandú, J. J. B., Neto, R. N. M., Zagnignan, A., de Sousa, E.M., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Correia, M. T. d. S., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Maria, T. Correia, d. S., da Silva, L. C. N. (2017). Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. *Frontiers in Pharmacology*, 8 :1-11.

Jiang, Q. L., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S.Y., Xie, T., Chen, D.Y., Chen, Y. J., He, J., Liu, J., Ouyang, L., Jiang, X. (2015). Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*, 48(1): 17–28.

## K

Kabouche, Z., Benkiki, N., Seguin, E., Bruneau, C. (2003). A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74: 194–196

Kaur, A., Singh, J., Kamboj, S.S., A.K. Sexana, R.M. Pandita and M. Shamnugavel, 2005. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, 66: 1933-1940

Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Kamboj, S.S., Saxena, A.K., Sharma, M.B. M., Sood, S.K., Singh, J. (2006a). A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and antiproliferative properties. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39:432–440.

Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J. (2006b). A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445:156–165.

Kellens, J, Jacobs, J, Peumans, W, Stobberingh, E. (1994). Agglutination of "*Streptococcus milleri*" by lectins. *Journal of Medical Microbiology*, 41: 1: 14-19.

Keyaerts, E., Vijgen, L., Pannecouque, C., Van Damme, E., Peumans, W., Egberink, H., Balzarini, J., Van Ranst, M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, 75(3): 179-87.

Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokded, R., Smiti, S., Falé, P., Araújo, M.E.M., Serralheiro, M.L.M. (2017). In vitro digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 101–107.

Khan, F., Ahmad, A., Khan, M. I. (2007). Chemical, Thermal and pH-induced Equilibrium Unfolding Studies of *Fusarium solani* Lectin. *IUBMB Life*, 59(1): 34 – 43.

Kilpatrick, D.C (2002). Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572 (2–3): 187–197.

Kolbe, K., Veleti, S.K., Reiling, N., Lindhorst, T.K. ( 2019 ). Review: Lectins of *Mycobacterium tuberculosis* – rarely studied proteins. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 15: 1–15.

Konozy, E.H. E. (2012). Characterization of a D- galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina lysistemon*. *Global Advanced Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 1(1): 007-018.

Konozy, E.H.E., Bernardes, E.S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L.J., Ward, R.J. (2003). Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410(2): 222-229.

Kranjčec, B., Papeš, D., Altarac, S. (2014). D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. *World Journal of Urology*, 32(1): 79–84.

## L

Lakowicz, J. (2006). Solvent and environmental effects *In Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>ième</sup> édition, Springer, New York: 205-235.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Urbano-Hernandez G., Ortega- Nieblas, M.M, Robles-Burgueño, M.R., Winzerling, J., Vazquez-Moreno, L. (2009). Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 689–694.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Vazquez-Moreno, L. (2017). Review Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (1242) :1-18.

Lam, S. K., Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:45–55.

LeVine, D., Kaplan, M.J., Greenaway, P.J. (1972). The purification and characterization of wheat-germ agglutinin. *Biochemical Journal*, 129:847–856.

Liu, B., Li, C.Y., Bian, H.J., Min, M.W., Chen, L.F., Bao J.K. (2009). Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 482: 1–6.

Li, C., Simeone, D.M., Brenner, D.E., Anderson, M.A., Shedden, K.A., Ruffin, M.T., Lubman, D.M. (2009). Pancreatic cancer serum detection using a lectin/glyco-antibody array method. *Journal of Proteome Research*, 8: 483–492.

Li, T., Yin, X., Liu, D., Ma, X., Lv, H., Sun, S. (2012). Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(7): 606–613.

Liu, J., Prakash, O., Cai, M., Gong, Y., Huang, Y., Wen, L., Wen, J.J., Huang, J-K., Krishnamoorthi, R. (1996). Solution Structure and Backbone Dynamics of Recombinant *Cucurbita maxima* Trypsin Inhibitor-V Determined by NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 35(5): 1516–1524.

Liu, J.J., Lin, M., Yu, J.Y., Liu, B., Bao, J.K. (2011). Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett*, 300: 105–114.

Liu, Z.Y., Li, X.F., Ding, X.P., Yang, Y. (2010). In silico and experimental studies of Concanavalin A: insights into its antiproliferative activity and apoptotic mechanism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 134–145.

Liu, Z., Luo, Y., Zhou, T.T., Zhang, W.Z. ( 2013) .Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death?, *Cell Prolif*, 46 : 509–515.

## M

Macedo, M..L, das Graças, M. Freire, M., da Silva, M. B., Coelho, L. C. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146:486–498.

- Machuka, J. S., Okeola, O. G., Van Damme, E. J. M., Chrispeels, M. J., Van Leuven, F., Peumans, W. J. (1999). Isolation and partial characterisation of galactosespecific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, 51: 721–728.
- Majee, S. B., Biswas, G. R. (2013). Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47) : 3444–3451.
- Majumder, P., Mondal, H.A., Das, S. (2005). Insecticidal activity of *Arum maculatum* tuber lectin and its binding to the glycosylated insect gut receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6725–6729.
- Makarim, E.M.O., Emadeldin, H.E.K. (2017). Insight into *Erythrina* Lectins: Properties, Structure and Proposed Physiological Significance. The *Open Bioactive Compounds Journal*, 5: 57-71.
- Masri, W., Belwaer, I., Khelifi, F., Nouiou, A., Ben salah, D., Amira, D., Hedhili, A. (2015). A propos d'un cas d'intoxication aigüe par *Ruta montana*. *Phytotherapie*, 13 :36-38
- Moura, G. M. M., Neto, A.M.M., Lima, R. V. C., Carelli, G. S. C., Cruz, J.I.O., Rabêlo, L. M. A., França, A. F. J., Veras, B.O., Santos, Y. Q. (2020). Potential pharmacological applications of lectins In *Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas*, 3<sup>ème</sup> édition, Ponta Grossa :31-42.
- Meite, A., Kouame, K.G., Kati-Coulibaly, S. (2006). Lectins: antinutritional substances?. *Médecine & Nutrition*, 42(4) : 179-187.
- Megias, C., Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2013). Purification of an antiproliferative lectin from *Erophaca Baetica* (leguminosae) seeds. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(5): 87-91.
- Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2019). Purification and partial characterization of seed lectins from *Vicias* belonging to subgenus *Vicilla* section *Cracca*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19: 101–121.
- Menard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunology*, 3(3):247-259.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E. (2006). Comparative study of lectin activity of higher Basidiomycetes *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8: 31–38.

Mishra, A., Assirbad, B., Shradha, M., Ashish, K., Lincoln, N., Subhashree, S. Mohanty, D. M., Puja, D., Amit, M., Sami, r K. P., Rohan D. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, 134 (110827) :1-17.

Miyake, K., Tanaka, T., Mcneil, P. L. (2007). Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity, *PLoS One*, 2(8), e687: 1-6

Mody, R., Joshi, S., Chaney, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33: 1–10.

Mohammed, A., Jebor, Y. H. J. (2012). Extraction, Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* L. cv. White Seeds (White Kidney Bean). *Medical Journal of Babylon*, 9(4) : 925-935.

Moreira, R.A., Perrone, J. C. (1977). Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 59: 783-787.

Motamedifar, M., Khosropanah, H., Dabiri, S. (2016). Antimicrobial Activity of *Peganum Harmala* L. on *Streptococcus mutans* Compared to 0.2% Chlorhexidine. *Journal of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences*, 17(3): 213-218.

Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Behera, B., Kanta Das, C., Hassan, Md. K., Nandini Das, D., Sinha, N., Bissoyi, A., Pramanik, K., Maiti, T. K., Bhutia S. K. ( 2014). In vitro and in vivo antitumor effects of Peanut agglutinin through induction of apoptotic and autophagic cell death. *Food and Chemical Toxicology*, 64: 369-377.

Mydock-McGrane, L. K., Cusumano, Z. T., Janetka J. W. (2016). Mannose-derived FimH antagonists: a promising anti-virulence therapeutic strategy for urinary tract infections and Crohn's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(2): 175–197.

## N

Nagata, Y., Burger, M.M. (1972). Wheat germ agglutinin. Isolation and crystallization. *Journal of Biological Chemistry* 247: 2248–2250.

Nascimento do, A. M., Conti, R., Turatti, I. C., Cavalcanti, B. C., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., Moraes, M. O., Manfrim, V., Toledo, J. S., Cruz, A. K., Pupo, M. T. (2012). Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 1276–81. In Kaur, N., Aroral,

D.S., Kaur, S., Kumar, A., Kaur, S. (2021). Antiproliferative and Oxidative Damage Protection Activities of Endophytic Fungi *Aspergillus fumigatus* and *Chaetomium globosum* from *Moringa oleifera* Lam. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193:3570-3585.

Niroumand, M. C., Farzaei, M. H., Amin, G. (2015). A review: Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 35(1): 104-109.

## O

Ohizumi, Y., Gaidamashvili, M., Ohwada, S., Matsuda, K., Kominami, J., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Naganuma, T., Ogawa, T., Muramoto, K. (2009). Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:2896–2902

Osborne, T.B., Campbell, G.T. (1897). The proteins of the sunflower seed. *Journal of the American Chemical Society*, 19: 487.

## P

Padma, P., Komath, S. S., Swamy, M. J. (1998). Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies on *Momordica charantia* (bitter gourd) seed lectin. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45(5): 911– 922.

Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., Hemalatha, S. (2012). Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2: 239-250.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347–352.

Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rougé, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491:27-54.

Pieters, R. J. (2009). Maximising multivalency effects in protein–carbohydrate interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7: 2013–2025.

Preetha, A., Ajaikumar, B.K., Chitra, S., Kuzhuvelil, B.H., Sheeja, T.T., Oiki S.L., Bokyung, S., Bharat, B. A. (2008). .Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9):2097-2116.

## R

Rafiq, S., Majeed, R., Qazi, A. K., Ganai, B. A., W, I., Rakhshanda, S., Qurishi, Y., Sharma, P.R., Hamid, A., Masood, A., Hamid, R. (2013). Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines. *Phytomedicine*, 21 : 30–38.

Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. *Plant Science*, 160: 739-744.

Raikhel, N. V., Lee, H.I. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 44:591-615.

Read, S. M., Northcote, D. H. (1983). Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae. *Planta*, 158: 119–127.

Regente, M., Taveira, G.B., Pinedo, M., Elizalde, M.M., Ticchi, A.J., Diz, M.S., Carvalho, A.O., de la Canal, L., Gomes V. M. (2014). A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. *Current Microbiology*, 69(1): 88–95.

Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Mattag, K.L., Ratcliffe, R. M. (1989). Isolation and Characterization of Amaranthin, a Lectin Present in the Seeds of *Amaranthus caudatus*, That Recognizes the T- (or Cryptic T)-Antigen. *The Journal Of Biological Chemistry*, 264(27): 16123-16131.

Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Remsen, E.E. (1990). Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*, 29(46):10555-10561.

Rouf R., Tiralongo E., Krahl A., Maes K., Spaan L., Wolf S., May T.W., Tiralongo J (2011). Comparative study of hemagglutination and lectin activity in Australian medicinal mushrooms (higher Basidiomycetes), *Int. J. Med. Mushrooms*, 13: 493–504.

Rüdiger, H., Gabius, H. J. (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18:589–613

Ruhul, A. A.R., Paul, R.K., Thakur, V.S., Agarwal, M.L. (2007) A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, Concanavalin A. *Cancer research*, 67 : 5617–5621.

Ryder, S.D., Smith, J.A., Rhodes, J.M. (1992). Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. *Journal of the National Medical Association*, 84(18): 1410-1416.

## S

Sacchettini, J.C., Baum, L.G., Brewer, C.F. (2001). Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction, *Biochemistry*, 40(10): 3009-3015.

Sadeghi, A., Smaghe, G., Broeders, S., Hernalsteens, J.P., De Greve, H., Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (2008). Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (*Allium sativum* L.) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). *Transgenic Research*, 17:9–18

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21: 1–26.

Sandros, J., Rozdzinski, E., Zheng, J., Cowburn, D., Tuomanen, E. (1994). Lectin domains in the toxin of *Bordetella pertussis*: selectin mimicry linked to microbial pathogenesis. *Glycoconjugate Journal*, 11: 501–506.

Santos, A. F. S., Argolo, A. C. C., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P.M.G. (2005). Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, 39: 975-980.

Santos, A. F. S., da Silva, M. D. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 15;41-62.

Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth, *Nature*, 324: 365–367

Sharon, N. (1993). Lectin carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(6):221–226.

- Sharon, N., Lis, H. (1972) Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science*, 177 (4053): 949-959.
- Sharon, N., Lis, H. (1990). Legume Lectins—A large family of homologous proteins, *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4: 3198–3208.
- Sharon, N., Lis H. (2001). The structural basis for carbohydrate recognition by lectins in *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Springer, New York : 1-16.
- Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11):53R-62R.
- Sharon, N. (1996). Carbohydrate—Lectin Interactions in Infectious Disease. *In Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases*. 1<sup>ière</sup> édition, Springer : 1-8.
- Shenoy, S.R., Barrientos, L.G., Ratner, D.M., O'Keefe, B.R., Seeberger, P.H., Gronenborn, A.M., Boyd, M.R. (2002). Multisite and multivalent binding between cyanovirin-N and branched oligomannosides: calorimetric and NMR characterization, *Chemistry & Biology*, 9(10): 1109-1118.
- Silva, M. C.C., Santana, L. A., Mentele, R., Ferreira, R. S., de Miranda, A., Silva-Lucca, R. A., Sampaio, M. U., Correia, M.T.S., Oliva, M. L.V (2012). Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, *Process Biochemistry*, 47: 1049–1059
- Sina A., Proulx-Bonneau S., Roy A., Poliquin L., Cao J., Annabi B (2010). The lectin Concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKc/NF-kB-dependent pathway, *J. Cell Commun. Signal*, 4(1) :31–38.
- Singh, R.S., Jain, P., Kaur H.P. (2013). Characterization and antimicrobial activity of lectins from *Penicillium sp.* *Indian Journal of Experimental Biology*, 51: 984–991
- Singh, R.S., Bhari, R., Kaur, H.P. (2010). Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30: 99–126.
- Souza, J.D., Silva, M.B.S., Argolo, A.C.C., Napole~ao, T.H., Sa, R.A., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Silva, M.D.S., Coelho, L. C. B. B. (2011). A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with

antifungal and termiticidal activities. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (5):696–702.

Souza, M.A., Amâncio-Pereira, F., Cardoso, C. R. B., da Silva, A. G., Silva, E. G., Andrade, L. R., Pena, J. D. O., Lanza, H., Afonso-Cardoso, S. R. (2005). Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose Binding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48 (5) : 705-716.

Souza, M. A., Carvalho, F. C., Ruas, L. P., Ricci-Azevedo, R., Roque-Barreira, M. C. (2012). The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties, *Glycoconjugate Journal*, 30(7): 641-57.

Sperling, O., fuchs, A., Lindhorst, T. K. (2006). Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannosideligands. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4 : 3913–3922.

Sun, P., Ren Y., Zheng, J., Hu, A. (2019). Purification and Characterization of a New Lectin from Loach Skin Mucus. *Journal of Chemistry*, ID 3853646:11.

Swamy, B.M., Bhat, A.G., Hegde, G.V., Naik, R.S., Kulkarni, S., Inamdar, S.R. (2004). Immunolocalization and functional role of *Sclerotium rolfsii* lectin in development of fungus by interaction with its endogenous receptor. *Glycobiology*, 14: 951–957.

Swanson, M.D., Winter, H.C., Goldstein, I.J., Markovitz, D.M. (2010). A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication, *Journal of Biological Chemistry*, 285: 8646– 8655.

## T

Takhtajan, A. (2009). Flowering Plants. 2<sup>ième</sup> edition, *Springer*, 33 : 41-375.

Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostàlovà, Z., Sanz, L., Calvete, J. J. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30(4-5): 217–24.

Topin, J., Arnaud, J., Sarkar, A., Audfray, A., Gillon, E., Perez, S., Jamet, H., Varrot, A., Imberty, A., Thomas, A. (2013). Deciphering the Glycan Preference of Bacterial Lectins by Glycan Array and Molecular Docking with Validation by Microcalorimetry and Crystallography, Investigating Lectins by Glycan Array and Docking. *PLOS ONE* ,8(8): e71149- e71161.

Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (thp-1). *International Journal of Cancer*, 26 : 171-176.

V

Van Damme, E.J.M., Allen, A.K., Peumans, W.J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Letters*, 215: 140-144.

Van Damme, E.J.M., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1997). Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (13): 8353–8360.

Van Damme, E.J.M., Hause, B., Hu J., Barre, A, Rougé, P., Proost, P., Peumans, W.J. (2002). Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree. *Plant Physiology*, 130:757-769.

Van Damme, E.J.M., Lannoo, N., Peumans, W.J. (2008). Plant lectins, *Advances in Botanical Research*, 48: 107–209.

Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rouge, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(6): 575–692.

Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183 (2):258–264

Varrot, A., Basheer, S.M., Imberty, A. (2013). Fungal lectins: Structure, function and potential applications. *Current Opinion in Structural Biology.*, 23: 678–685.

Velkov, V.V., Medvinsky, A.B., Sokolov, M.S., Marchenko, A.I. (2005). Will transgenic plants adversely affect the environment?. *Journal of Biosciences*, 30:515–548.

Vera-Nuñez, N., Guirao, A. Y., da Silva, J. D. F., Ramos, I. P., Torres, M. K. S., Coelho, L. C. B. B., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Medel, E. (2021). Water-soluble lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* seeds treatment recovers glycemic levels and improves left

ventricular ejection fraction on Type-2 Diabetes mice mode. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3) : e20201596.

Vitlic, A., Lord, J. M., Phillips, A. C. (2014). Stress, ageing and their influence on functional, cellular and molecular aspects of the immune system, *AGE*, 36: 1169–1185

## W

Wang, C., Li D., Xu, F., Hao, T., Zhang, M. (2014). Comparison of Two Methods for the Extraction of Fractionated Rice Bran Protein. *Journal of Chemistry*, ID 546345:1-10.

Wang, H.X., Ng, T.B., Liu, W.K., Ooi, V.E.C., Chang, S.T. (1995). Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*, *International Journal of Peptide and Protein Research*, 46: 508–513.

Wang, K., Liu, C., Hou, Y., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., He, G. (2019). Differential Apoptotic and Mitogenic Effects of Lectins in Zebrafish. *Frontiers in Endocrinology*, 10 (356): 1-10.

Wang, Q., Yu, L.G., Campbell, B.J, Milton, J.D., Rhodes, J.M. (1998). Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet*, 352: 1831–1832.

Wang S.Y., Yu, Q.J., Zhang, R.D., Liu, B. (2011). Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43 : 1263–1266.

Wang, Z., Zhang K., Sun X., Tang K., Zhang J (2005) .Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene gna into maize plants, *J Biosci*, 30:627–638

Watkins, W.M., Morgan, W.T. (1952). Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* .196: 825–826.

Wiert, C. (2006). Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future?. World scientific: 401 - 416.

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Sakulborirug, C. (1998). A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 47: 183–187.

Witvliet, M. H.; Burns, D. L.; Brennan, M. J.; Poolman, J. T.; Manclark, C. R. (1989). Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infection and Immunity*. 57: 3324–3330.

Wong, J. H., Wan, C. T and Ng Tzi B (2010). Characterisation of a haemagglutinin from Hokkaido red bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Hokkaido red bean). *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 90: 70–77.

## X

Xu, X., Zhang, Z., Chen, Y., Yuan, M., Yuan, S., Bao, J. (2015) Antiviral and antitumor activities of the lectin extracted from *Aspidistra elatior*, *Zeitschrift für Naturforschung*, 70(1-2): 7–13.

## Y

Yan, Q. J., Jiang, Z. Q., Yang, S. Q., Deng, W., & Han, L. J. (2005). A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 442:72-81.

Yan, Q.J., Zhu, L., Kumar, N., Jiang, Z., Huang, L. (2010). Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 122: 589–595.

Yamaguchi, K., Mori, A., Funatsu, G. (1995). The Complete Amino Acid Sequence of Lectin-C from the Roots of Pokeweed (*Phytolacca americana*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (7) : 1384-1385.

Yau, T., Dan, X., Ng, C. C. W., Ng, T. B. (2015). Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*, 20: 3791-3810.

Yilmaz, G., Becer, C. R. (2015). Review: Glyconanoparticles and their interactions with lectins. *Polymer Chemistry*, 6: 5503–5514.

Yu, L. G., Milton, J. D., Fernig, D. G., Rhodes, J. M (2001). Jackfruit lectin (jacalin), a Thomsen-Friedenreich antigen-binding lectin, inhibits proliferation of HT29 human colon cancer cells by altering cell surface tyrosine phosphorylation and down regulating MAP kinase (MEK1/2) and MAP kinase (Erk1/2). *Gastroenterology*, 120 : A665–A665.

## Z

Zhang, X., Chen, L.X., Ouyang, L., Cheng, Y., Liu, B. (2012). Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents, *Cell Prolif*, 454 : 466–476.

Zheng, J., Wang, M., Wei, W., Keller, J. N., Adhikari, B., King, J. F., Peng, N., Laine, R. A. (2016). Dietary plant lectins appear to be transported from the gut to gain access to and alter dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*, a potential etiology of Parkinson's disease. *Frontiers in Nutrition*, 3 (7) : 1-16.

Zhu, F., Zhou, Y-K., Ji, Z-L., Chen, X-R. (2018). Review: The Plant Ribosome-Inactivating Proteins Play Important Roles in Defense against Pathogens and Insect Pest Attacks. *Frontiers in Plant Science*, 9:146-159

Zuo, Z., Fan, H., Wang, X., Zhou, W., Li, L. (2012). Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. *SpringerPlus*, 1(13):1-9.

# *Annexes*

## **Annexe 1**

### **Préparation des tampons**

#### **Tampan d'extraction**

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM , 0.14 M NaCL , pH 7.4

Pour 1 litre :

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM : 1.4196g

0.14M NaCL : 8.8116g.

Ajuster le pH final à 7.4

#### **Préparation de tampon utilisé dans la chromatographie**

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, 0.5M NaCL, Ph 7

Pour 2 litre :

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 Mm: 14.196g

0.5 M NaCL : 58.44g.

Ajuster le pH final à 7

### **Préparation des solutions tampons à différents pH (1-10.6) (Chandra Mohan, 2003)**

#### **1. Tampon acide chlorhydrique-chlorure de potassium (HCl-KCl); Plage de pH 1,0 à 2,2**

(a) Chlorure de potassium 0.1 M : 7.45 g/l (M.W. : 74.5)

(b) Acide chlorhydrique 0.1 M

Mélanger 50 ml de chlorure de potassium et le volume indiqué d'acide chlorhydrique.

Mélanger et ajuster le volume final à 100 ml avec de l'eau déminéralisée. Ajuster le pH final à l'aide d'un pH-mètre sensible.

HCl (ml)	97	10.6
pH	1.0	2.0

#### **2. Tampon Citrate ; Plage de pH 3,0 à 6,2**

(a) Acide citrique 0.1 M : 19.21 g/l (PM : 192.1)

(b) Citrate de sodium 0.1 M dihydraté : 29.4 g/l (PM : 294.0)

Mélanger les solutions d'acide citrique et de citrate de sodium dans les proportions indiquées et ajuster la volume à 100 ml avec de l'eau déminéralisée. Ajuster le pH final à l'aide d'un

pH-mètre sensible. L'utilisation de sel pentahydraté de citrate de sodium n'est pas recommandée.

Acide citrique (ml)	46.5	31.5	16.0	7.2
citrate de sodium (ml)	3.5	18.5	34.0	42.8
pH	3.0	4.2	5.4	6.2

### 3. Tampon Tris-HCl, plage de pH de 7,2 à 9,0

(a) Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 0.1 M; 12.1 g/l (PM : 121.0)

(b) Acide chlorhydrique 0.1 M

Mélanger 50 ml de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane et le volume indiqué d'acide chlorhydrique et ajuster le volume final à 200 ml avec de l'eau déminéralisée. Ajuster le pH final à l'aide d'un pH-mètre sensible.

HCl (ml)	44.2	21.9
pH	7.2	8.2

### Tampon carbonate-bicarbonate, plage de pH de 9,2 à 10,6

(a) Carbonate de sodium 0.1 M (anhydre), 10.6 g/l (PM : 106.0)

(b) Bicarbonate de sodium 0.1 M, 8.4 g/l (PM : 84.0)

Mélanger les solutions de carbonate de sodium et de bicarbonate de sodium dans les proportions indiquées et ajuster le volume final à 200 ml avec de l'eau déminéralisée. Ajuster le pH final à l'aide d'un pH-mètre sensible.

Carbonate de sodium (ml)	4.0	27.5	42.5
Bicarbonate de sodium(ml)	46.0	22.5	7.5
pH	9.2	10.0	10.6

## **Annexe 2**

### **Dosage des protéines par la méthode du Bradford**

Le dosage des protéines de Bradford est une procédure simple pour la détermination des concentrations de protéines dans des solutions qui dépend du changement d'absorbance dans le Comassie-bleue G-250 lors de la liaison de la protéine (**Bradford, 1976**). Contrairement à de nombreux autres tests, le test de Bradford n'est pas sensible aux interférences d'une grande variété de produits chimiques présents dans l'échantillon. L'exception notable concerne les fortes concentrations de détergents. Il existe une variation significative de protéine à protéine dans la valeur d'absorbance proche de celles des échantillons de protéines d'intérêt.

Le test ici est conçu pour être utilisé sur des plaques de microtitration. Il s'agit d'un format de test facile pour ceux qui ont accès à des pipettes à canaux multiples et à des spectrophotomètres à plaque de microtitration.

#### **Réactif de Bradford**

Le réactif peut être préparé en dissolvant 100 mg de Comassie bleue G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95 %, en ajoutant 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (p/v) à cette solution et en diluant le mélange à 1 litre avec de l'eau.

#### **Albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/ml)**

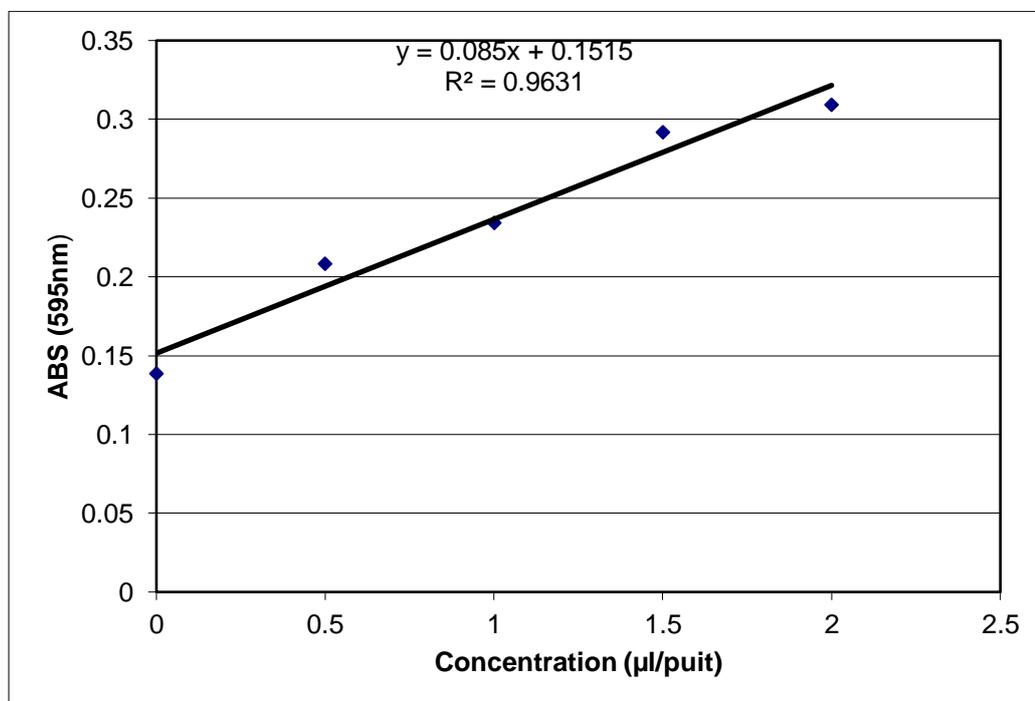
Nous avons dissous la BSA dans une solution saline et la stockons congelée dans des aliquotes de 1 ml pour une utilisation rapide.

#### **Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA**

Remarque : effectuer toutes les déterminations en triple

1. Pipeter 0, 0.5, 1, 1.5 et 2  $\mu\text{L}$  de BSA (1 mg/ml) dans les puits assignés d'une plaque à 96 puits
2. Ajouter 40  $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford dans tous les puits contenant le standard
3. Ajouter dd  $\text{H}_2\text{O}$  à tous les puits pour amener le volume final à 200  $\mu\text{L}$
4. Lire l'absorbance à 595 nm sans aucune incubation préalable.

BSA ( $\mu\text{L}$ /puit)	0	0.5	1	1.5	2
DO1	0.126	0.204	0.243	0.288	0.296
DO2	0.142	0.219	0.208	0.309	0.322
DO3	0.148	0.202	0.252	0.279	0.31
DO Moyenne	0.13866667	0.20833333	0.23433333	0.292	0.30933333



La gamme d'étalonnage de BSA

Annexe 3

Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																		
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697		0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662		5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627		10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592		15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557		20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522		25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	286	323	362	402	445	488		30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453		35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418		40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383		45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348		50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313		55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279		60
									0	31	63	97	132	168	205	244		65
										0	32	65	99	134	171	209		70
											0	32	66	101	137	174		75
												0	33	67	103	139		80
													0	34	68	105		85
														0	34	70		90
															0	35		95
																0		100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

## Annexe 4

## Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

<b>Gel de séparation (Running gel)</b>	<b>15%</b>
30% Acryl/Bis	3.38 mL
1.5 tris pH 8.8	2.25 ml
10% SDS	68 $\mu$
Eau distillée	1.06 mL
TEMED	11 $\mu$ l
APS 10 %	26 $\mu$ L.
<b>Gel de sConcentration (Stacking gel)</b>	<b>15%</b>
30% Acryl/Bis	310 $\mu$ L.
0.5 tris pH 6.8	230 $\mu$ L.
10% SDS	38 $\mu$ L.
Eau distillée	1.4 mL.
TEMED	5.6 $\mu$ l
APS 10 %	13 $\mu$ L

<p><b>10% Ammonium persulphate solution</b></p> <p><b>(APS) :</b></p> <p>10mg Ammonium persulphate</p> <p>100ml eau distillée</p> <p><b>30%Acryl/Bis :</b></p> <p>22.5 Acrylamide</p> <p>0.6 bisacrylamide</p> <p>75 ml d'eau distillée</p>	<p><b>La Solution de coloration</b></p> <p>- Acide acétique :40 ml</p> <p>- Méthanol :180 ml</p> <p>- Eau distillée : 180 ml - Bleu de coomassie R 250 : 1g</p>
<p><b>Tampon de migration pH 8 pour SDS-PAGE</b></p> <p>- Tris: 6g</p> <p>- Glycine:28 g</p> <p>- SDS : 1 g</p> <p>- eau distillée 1L</p>	<p><b>La solution de décoloration :</b></p> <p>- Acide acétique: 37mL</p> <p>- Méthanol: 100 mL</p> <p>- Eau distillée : 360mL</p>

## Annexe 5

Activité antiproliférative de la lectine de *Ruta montana* (pourcentage des cellules vivantes), chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écartype (n = 6).

### THP-1

Durée Dose ( $\mu\text{g/puits}$ )	24 h	48 h	72 h
0.5	105.85 $\pm$ 8.30	134.70 $\pm$ 12.44	123.52 $\pm$ 2.95
1	101.59 $\pm$ 10.94	144.57 $\pm$ 10.18	136.36 $\pm$ 3.26
2	98.22 $\pm$ 5.75	142.10 $\pm$ 9.20	157.72 $\pm$ 6.68

**Caco-2**

Durée \ Dose (µg/puits)	48 h	72 h
0.5	58.49 ± 13.44	84.48 ± 17.00
1	69.63 ± 23.58	84.48 ± 24.60
2	64.34 ± 25.82	64.75 ± 27.32

**Activité antiproliférative de la lectine de *Peganum harmala* (pourcentage des cellules vivantes), chaque valeur représente la moyenne ± écartype (n = 6).**

**THP-1**

Durée \ Dose (µg/puits)	24 h	48 h	72 h
0.5	109.92 ± 12.87	143.25 ± 8.81	120.90 ± 2,19
1	110.81 ± 11.95	143.42 ± 8.49	130 ± 3.48
2	104.78 ± 11.34	132.89 ± 6.14	117.61 ± 2.54

**Caco-2**

Durée \ Dose (µg/puits)	48 h	72 h
0.5	75.20 ± 24.46	82.12 ± 16.44
1	30.08 ± 16.09	44.35 ± 10.49
2	0.27 ± 22,60	5.56 ± 8.41

**Présentée par :**  
MESSAI Alima

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat Science**  
**EN BIOCHIMIE**

**Thème : Extraction, purification des lectines à partir des plantes médicinales : *Ruta montana*,  
*Peganum harmala* et leurs études biologiques**

**Résumé :**

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, d'origine non immunitaire, présentant plusieurs propriétés biologiques, L'objectif de ce travail était de purifier et caractériser la lectine des racines de *Ruta montana* et des grains de *Peganum harmala* et d'étudier leurs activité antiproliférative. Les lectines de deux plantes ont été extraites par trois méthodes différentes, eau distillée à pH 4, chlorure de sodium (NaCl) et une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). La lectine de *Ruta montana* a été purifiée par ultrafiltration et précipitation au sulfate d'ammonium, suivies d'une chromatographie par filtration sur gel. Tandis que la lectine de *Peganum harmala* a été purifiée par ultrafiltration et chromatographie par filtration sur gel. La caractérisation de la lectine de *Ruta montana* montre qu'elle possède une structure monomérique avec un poids moléculaire de 28.8 kDa, elle a perdu son activité à 70°C pendant 30 min et plus stable à pH neutre, et montre une spécificité aux érythrocytes humains de type B, son activité est inhibée par le galactose et le glucose. La lectine de *Peganum harmala* était composée de trois sous-unités identiques, chacune avec une masse moléculaire de 70.53 kDa. Elle était stable entre pH 4.2 et pH 9, leur incubation à 80 °C pendant 10 min a conduit à une dénaturation irréversible. Elle a agglutiné tous les érythrocytes humain ABO, son activité n'a pas été inhibée par la présence de monosaccharides, tels que galactose, mannose, fructose, saccharose et glucose. La lectine de *Ruta montana* a une activité antiproliférative sur les cellules de la lignée Caco-2 et stimulent la prolifération cellulaire des de la lignée THP-1. La lectine de *Peganum harmala* montre un effet inhibiteur élevé de manière dose-dépendante sur les cellules de la lignée Caco-2 et aucun effet sur les cellules de la lignée THP-1.

**Mots-Clés :** Lectine, *Ruta montana*, *Peganum harmala*, Activité agglutinante, Activité antiproliférative.

**Devant le jury :**

**Soutenue le :**24/01/2023

**Président :** Mr. NOUADRI T MCA. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

**Directeur de thèse :** NECIB Y. Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

**Examineurs :** Mme. BAHY A. MCA. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1  
Mr. OULDJAOUY A. Pr. Univ. Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi  
Mme. KADI K Pr. Univ. Abbes Laghrour Khenchela  
Mme. Hamli S MCA. Univ. Abbes Laghrour Khenchela

**Année universitaire : 2022/2023**