

TABLE DES MATIERES

.....	1
PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE ...09/10.../2010.....	1
.....	1
TABLE DES MATIERES.....	2
LISTE DE TABLEAUX ET FIGURES.....	5
LISTES DES ABREVIATIONS.....	6
PREMIERE PARTIE :	7
PRESENTATION DU CONTEXTE DE L'ETUDE.....	7
I. INTRODUCTION	7
II. OBJECTIFS	9
II.1 OBJECTIF GÉNÉRAL	9
II.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	10
DEUXIEME PARTIE :	11
GENERALITES.....	11
I. LES LECTINES	12
I.1 DÉFINITION	12
I.2 HISTORIQUE	13
I.3 SPÉCIFICITÉ DES LECTINES	16
I.4 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES LECTINES.....	18
<i>I.4.1 Liaison avec les sucres</i>	<i>18</i>
<i>I.4.2 Agglutination des cellules</i>	<i>18</i>
<i>I.4.3 Activité mitogène</i>	<i>18</i>
<i>I.4.4 Effets mimétiques des hormones</i>	<i>19</i>
<i>I.4.5 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses</i>	<i>19</i>
<i>I.4.6 Actions antivirales</i>	<i>19</i>
<i>I.4.7 Autres propriétés</i>	<i>19</i>
I.5 UTILISATION DES LECTINES	20
<i>I.5.1 Dans le domaine biomédical</i>	<i>20</i>
<i>I.5.2 Dans le domaine agronomique</i>	<i>21</i>

I.6 LECTINES DES PLANTES	22
<i>I.6.1 Fonction de lectines dans les plantes.....</i>	<i>22</i>
<i>I.6.2 Classification des lectines.....</i>	<i>24</i>
II. MONOGRAPHIE DE ABRUS PRECATORIUS L.	26
II.1 SYSTÉMATIQUE:.....	26
II.2 NOMS COMMUNS :.....	26
II.3 CARACTÈRES BOTANIQUES :.....	26
II.4 EMPLOIS	31
II.5 DROGUE	31
<i>II.5.1 La Graine :</i>	<i>31</i>
<i>II.5.2 Autres organes :</i>	<i>32</i>
II.6 PHARMACOCINÉTIQUE ET MÉTABOLISME	32
II.7 PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE.....	32
III. LE SYSTÈME ABO	35
III.1. DÉFINITION	35
III.2. GROUPE ABO	35
III.3. STRUCTURE CHIMIQUE.....	37
III.4. LECTINES SPÉCIFIQUES DES GROUPES SANGUINS.....	38
TROISIEME PARTIE :.....	39
NOTRE ETUDE	39
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES	40
I.1. MATÉRIELS	40
<i>I.1.1. Matériel végétal :</i>	<i>40</i>
<i>I.1.2. Matériel Biologique:</i>	<i>40</i>
<i>I.1.3. Matériels techniques :</i>	<i>40</i>
I.2 MÉTHODES	42
<i>I.2.1 Extraction des Lectines :.....</i>	<i>42</i>
<i>I.2.2 Purification :.....</i>	<i>44</i>
<i>I.2.3 Lyophilisation :.....</i>	<i>47</i>
<i>I.2.4 Activité hémagglutinante des extraits :.....</i>	<i>47</i>
<i>I.2.5 Etude comparative de l'activité agglutinante de nos extraits :.....</i>	<i>49</i>
II. RÉSULTATS	52

II.1 ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE DES LECTINES DE L'EXTRAIT BRUT :.....	52
II.2 ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE DES FRACTIONS OBTENUES APRÈS PURIFICATION :.....	52
II.3 ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE DES DIFFÉRENTS LYOPHILISATS :.....	54
II.4 RÉSULTAT DE L'ÉTUDE COMPARATIVE :.....	55
III. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :.....	57
IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :.....	60
CONCLUSION :.....	60
QUATRIÈME PARTIE.....	63
BIBLIOGRAPHIE:.....	63
ANNEXES	71
PHOTOS :.....	72
FICHE SIGNALÉTIQUE:.....	78

LISTE DE TABLEAUX ET FIGURES

Les Tableaux :

TABLEAU I : HISTORIQUE DE DÉCOUVERTE DES LECTINES.....	14
TABLEAU II : SPÉCIFICITÉ OSIDIQUE DE CERTAINES PLANTES À LECTINES (RENATO, ET COLL. 1991).....	17
TABLEAU III : LES GROUPES SANGUINS.....	36
TABLEAU IV : CARACTÉRISTIQUES DE L'ANTIGÈNE H.....	37
TABLEAU V : LA SPÉCIFICITÉ DES LECTINES D'ORIGINE VÉGÉTALES AUX GROUPES SANGUINS.....	38
TABLEAU VI : ACTIVITÉ HÉMAGGLUTINANTE DE L'EXTRAIT BRUT ET DES FRACTIONS.....	53
TABLEAU VII : AGGLUTINATION DES FRACTIONS OBTENUES PAR PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM	54
TABLEAU VIII : AGGLUTINATION DES DIFFÉRENTES DILUTIONS DE LYOPHILISATS SUR LES HÉMATIES DU GROUPE A.....	55
TABLEAU IX : RÉSULTAT D'AGGLUTINATION DES EXTRAITS.....	56
TABLEAU X : RÉSULTAT D'AGGLUTINATION	57

Les Figures :

FIGURE 1 : PHOTO DES FEUILLES DE ABRUS PRECATORIUS.....	28
FIGURE 2 : PHOTO DE LA GRAINE MÛRE DE ABRUS PRECATORIUS.....	29
FIGURE 3 : GOUSSE IMMATURES D'ABRUS PRECATORIUS.....	30
FIGURE 4 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L-ABRINE.....	34
FIGURE 5 : ORDRE DE RÉACTIVITÉ DE L'ANTIGÈNE H.....	37
FIGURE 6 : SCHÉMAS D'EXTRACTION DES LECTINES À PARTIR DE LA POUDRE DE GRAINE DE ABRUS PRECATORIUS.....	43

FIGURE 7 : ACTIVITÉ DES DIFFÉRENTS FILTRATS NON LYOPHILISÉ SUR LE GROUPE A...52

LISTES DES ABREVIATIONS

APA	: <i>Abrus precatorius</i> Agglutinin
CNTS	: Centre National de Transfusion Sanguine
Con A	: Lectine de la Canavalia
DL₅₀	: Dose Létale 50%
DLM	: Dose Minimale Létale
DMT	: Département de Médecine Traditionnelle
Gal	: Galactose
GalNac	: N-acétylgalactosamine
Glc	: Glucose
GlcNac	: N-acétylglucosamine
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé publique
KDa	: Kilo Dalton
L Fuc	: L Fucose
Man	: Mannose
NaCl	: Chlorure de sodium
Trs/mn	: Tours par minute
µg	: Microgramme
NaN₃	: Azide de Sodium
Kg	: Kilogramme
(NH₄)₂SO₄	: Sulfate d'ammonium

PREMIERE PARTIE :

PRESENTATION DU CONTEXTE DE L'ETUDE

I. Introduction

Les Lectines sont des protéines qui fixent le sucre et se combinent avec les mono et oligosaccharides par des liaisons autres que covalentes. Ce sont des oligomères de protéines multivalentes, c'est à dire comportant plusieurs sites de liaison des

saccharides. Cette structure polyvalente confère aux lectines l'aptitude d'agglutiner des cellules portant sur leur membrane externe les fractions saccharidiques appropriées. Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent chez toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux (Goldstein, 1978; Pusztai et al. ,1983; Etzler, 1985 ; Kocourek, 1983 ; Liener et al. ,1986).

La présence des lectines a été rapportée dans plusieurs variétés de plantes. Elles sont rencontrées dans de nombreux légumes secs (Yagi et al. 2002 ; Rüdiger 2001). Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées. Elles sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes.

Actuellement, certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour le typage du sang, principalement en raison de l'indisponibilité d'anticorps anti -O (H) naturels et en raison du fait que certaines d'entre elles distinguent les sous groupes A1 et A2 (Liener, 1976) .

Abrus precatorius est une liane grimpante de la famille des légumineuses présente dans toutes les régions tropicales. Ses gousses contiennent des graines très riches en lectines. Trois toxines, dénommée l'abrine I, II et III et deux agglutinines, APA (*Abrus precatorius Agglutinin*) I et II ont été isolée de la graine de *Abrus precatorius* (Hegde et al. ,1991).

Au Mali, les études précédentes, effectuées au niveau du Département de Médecine traditionnelle de L'Institut National de Recherche en Santé Publique (DMT/INRSP), ont démontré que les lectines de *Abrus precatorius* ont une forte activité agglutinante sur les hématies du groupe sanguin (Ali, 2006 ; Doumbia, 2005).

Le but principal de notre étude est de poursuivre les travaux sur ces lectines pour déterminer leur spécificité d'agglutination sur le groupe sanguin A en vue d'obtenir des réactifs végétaux de groupage. Les résultats de cette étude pourront être mis à profit dans les centres spécialisés pour le groupage de sang tel que le Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) pour améliorer la disponibilité des réactifs de groupage par une production locale de lectines par le DMT.

II. Objectifs

II.1 Objectif général

- Etudier l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de *Abrus precatorius*.

II.2 Objectifs spécifiques

1. Décrire une technique d'obtention de l'extrait brut de lectines à partir de la graine de *Abrus precatorius*.
2. Déterminer l'activité agglutinante de l'extrait brut sur les hématies du groupe sanguin A.
3. Fractionner l'extrait brut par filtration sur gel et par précipitation au sulfate d'ammonium.
4. Déterminer l'activité agglutinante des fractions obtenues après purification.
5. Comparer l'activité agglutinante de l'extrait brut à celle des fractions obtenues.
6. Comparer les activités agglutinantes de l'extrait brut, des fractions obtenues à celle des lectines de *Dolichos biflorus* (anti-A1) et *Ulex europaeus* (Anti- A2)
7. Comparer les activités agglutinantes de l'extrait brut, des fractions obtenues à celle des Réactifs à base d'anticorps monoclonaux anti-A, Anti-B, Anti-A+B

DEUXIEME PARTIE :

GENERALITES

I. Les Lectines

I.1 Définition

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, végétale ou animale, dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (Goldstein et al, 1980). Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes , car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (Liener et al., 1986).

Les lectines végétales sont actuellement les seules qui soient couramment utilisées pour caractériser ou fractionner des glycoconjugués d'origines diverses (Goldstein et Hayes, 1978; Sharon et Lis, 1989). Très souvent, ces lectines sont classées en fonction du monosaccharide capable d'inhiber la réaction d'agglutination induite par la lectine. Les méthodes anciennement utilisées pour leur identification consistent à mélanger l'extrait à examiner avec des érythrocytes en solution. L'agglutination ou la précipitation des cellules indique que la solution analysée contient une ou parfois plusieurs molécules agglutinantes. L'abondance des ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

I.2 Historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (Sharon and Lis 2004). A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné. Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin "*legere*" qui veut dire « sélectionner ». Le tableau I montre l'historique de découverte des lectines (Renato, et coll. 1991)

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

Tableau I : Historique de découverte des Lectines

ANNEE	AUTEURS	DECOUVERTES
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1988	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Abrus precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes à hémagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum

1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd& Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

I.3 Spécificité des lectines

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Sharon 2003).

Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose(Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acétylneuraminique, NeuAc) (Lis and Sharon 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (Dam and Brewer 2002).

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en carbone (C 1) de monosaccharides tels que l' α - méthyle-galactoside et le β -méthyle-galactoside.

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (Park, et coll. 2008). Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (Lee and Lee 1995). Le tableau II nous montre la spécificité osidique de certaines plantes à lectines.

Tableau II : Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato, et coll. 1991)

ESPECES	SPECIFICITE
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adenia digitata</i>	Gal
<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man > Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man > Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissus sessilifolia</i>	GlcNac >Fuc >Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNac

I.4 Propriétés Biologiques des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées.

I .4.1 Liaison avec les sucres

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (Miyoshi et coll, 1982).

I.4.2 Agglutination des cellules

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998).

En outre, on s'est aperçu que les lectines agglutinent plus facilement les cellules malignes par rapport à leurs homologues normales. Des attitudes préférentielles ont été observées également entre cellules embryonnaires et cellules adultes, entre cellules en mitose et cellules en interphase (Wang et coll., 1998).

I.4.3 Activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (Barbosa, 2001 ; Falasca 1989 ; Nachbar et coll., 1980).

I.4.4 Effets mimétiques des hormones

Les lectines des graines de haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (Greer et coll., 1985). De même les lectines des graines de *Momordica charantia* comme diverses autres lectines possèdent des activités antilipolytiques et lipogénique (activités insuline-like) à cause de son interaction avec les récepteurs d'insuline des adipocytes (Wang et coll., 1998).

I.4.5 Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses

Les travaux de Valentier et coll. (2003) suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme *in vitro*. Quant à Banwell et coll. (1983), ils montrent que les lectines des graines de haricot rouge provoquent l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses.

I.4.6 Actions antivirales

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (Wang et coll, 1998).

Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolious* (Lopez 2003).

I.4.7 Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (Nachbar et coll. 1980), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (Gomes 1994), les effets pro et anti-inflammatoires (Assreuy 1997), l'induction de l'apoptose (Kulkarni 1988).

I.5 Utilisation des lectines

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

I.5.1 Dans le domaine biomédical

➤ Hématologie :

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (Boyd and Sharpleigh 1954) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

➤ Immunologie :

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (Hirabayashi 2004).

Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques (Jaffe, 1980).

➤ Biologie cellulaire :

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions

normales et pathologiques (Jaffe, 1980). Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar, 2005).

➤ Cancérologie :

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (Guillot, coll. 2004).

Kenoth et al (2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

I.5.2 Dans le domaine agronomique

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (Murdock et coll. ., 2002).

Par exemple, la lectine de blé et celle de graine de *Bauhinia purpurea* ont des effets létaux pour deux insectes (*Ostrinia nubilabis* et *Diabrotica undecimpunctata*) se nourrissant sur le maïs, l'action des lectines peut se faire à des concentrations relativement faibles (Peumans et coll. 1995).

I.6 Lectines des plantes

Dans les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermaphytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (Grant, 1991 ; Renkonen., 1948 ;). La famille des Légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales et elle est assez représentée dans les pays tropicaux comme le Mali. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la Concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. Elles se retrouvent dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de subir une attaque par des organismes étrangers, notamment les organes intervenants dans la survie de l'individu ou de l'espèce (Nachbar et coll., 1980). La plupart des lectines se trouvent ainsi dans les graines. Pour exemple, les lectines représentent 30 % des protéines totales des graines de *Canavalia ensiformis*. Elles se forment au cours de la maturation des graines pour atteindre leur taux maximum dans la graine mûre et disparaissent progressivement au cours de la germination en même temps que prennent place les réserves (Jaffe, 1982). Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (Chrispeels and Raikhel, 1991, Rudiger and Gabius ,2001 ; Van Damme et coll., 1997). Le mode d'action précis des lectines dans l'insecte demeure inconnu.

I.6.1 Fonction de lectines dans les plantes

Depuis de nombreuses années, des études sont consacrées à la mise en évidence des fonctions physiologiques des lectines végétales. Ces recherches s'effectuent selon deux approches :

- Accumulation des informations sur les propriétés biochimiques des lectines et sur leur distribution dans les tissus aux différents stades de croissance des plantes ;

- Elaboration d'hypothèses concernant les fonctions des lectines sur la base des informations acquises et confirmation de ces hypothèses par des expériences adéquates.

A la suite de ces études, des hypothèses sur les fonctions physiologiques des lectines ont été avancées. Force est de constater cependant qu'à l'heure actuelle beaucoup de ces fonctions restent encore hypothétiques faute de preuves formelles :

- ❖ La spécificité des lectines et les propriétés conférées par leurs sites multiples de valence amènent certains auteurs à les comparer à des anticorps, et à proposer alors pour ces molécules un rôle d'"anticorps" chez les plantes. Cependant, une augmentation de la synthèse des lectines lors de l'exposition de la plante à un antigène (caractéristique importante des anticorps animaux) n'a jamais été démontrée. Sans être de véritables anticorps de la plante, les lectines peuvent jouer le rôle de molécules constitutives de défense contre des parasites. De nombreuses études révèlent ainsi l'existence d'interactions entre des lectines et des microorganismes (Pistole, 1981 ; Etzler, 1986).
- ❖ d'autres études, au contraire suggèrent que les lectines favorisent l'invasion des plantes par des pathogènes en servant de récepteurs pour des phytotoxines, ou de molécules d'adhésion pour le pathogène. L'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* est un exemple de ce type de pathogénèse (Etzler, 1986).
- ❖ la symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les Légumineuses est un processus complexe qui s'établit en plusieurs étapes : adhésion de la bactérie aux racines, internalisation et nodulation. Elle confère aux Légumineuses la propriété de fixer l'azote atmosphérique. Ce processus requiert un haut degré de

spécificité : une souche de *Rhizobium* peut noduler uniquement certaines légumineuses. Une littérature abondante fait état des travaux visant à démontrer le rôle des lectines dans ce processus de reconnaissance de la bactérie de la plante (Kaminski et Coll., 1987; Diaz et coll., 1989).

- ❖ de nombreuses autres fonctions des lectines sont avancées : Fonction dans l'élongation des parois cellulaires ; fonction de cofacteurs enzymatiques agissant avec des enzymes glycoprotéiques ; intervention dans le transport des glucides et dans leur mise en réserve dans les graines ; contrôle de la division cellulaire (mitogénicité) et de la germination ; intervention dans les processus de reconnaissance de cellule à cellule (Etzler, 1986 ; Kaminski et coll., 1987).

La littérature très abondante révèle l'intérêt de nombreuses équipes de recherche pour confirmer ou infirmer ces hypothèses. Etzler (1986) remarque cependant à juste titre que la spécificité osidique des lectines n'est probablement qu'une des propriétés fonctionnelles de ces molécules. En plus de leurs sites de fixation aux sucres, certaines lectines possèdent en effet des sites leur permettant de se lier avec d'autres types de ligands. La Concanavaline A, par exemple, possède un site de liaison spécifique au myo-inositol (Wassef et coll., 1985). Ainsi, d'autres fonctions encore inexplorées pourraient être liées à la présence de ces autres sites non-sucre spécifiques.

I.6.2 Classification des lectines

Selon la classification de Peumans et Van Damme (1995), trois types majeurs de lectines sont présentes chez les plantes :

1. Mérolectines :

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides (exemple : héveine, protéines d'Orchidées).

Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.

2. Les Hololectines :

Les hololectines contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi-identiques, ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules. La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines.

3. Les Chimérolectines :

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

II. Monographie de *Abrus precatorius* L.

Synonymes : *Abrus minor* Desv, *Abrus moculatus* Norohna

II.1 Systématique:

- ❖ Embranchement : Spermaphytes
- ❖ Sous Embranchement : Angiospermes
- ❖ Classe : Dicotylédones
- ❖ Ordre : Leguminosales
- ❖ Famille : Fabacées
- ❖ Genre : *Abrus*
- ❖ Espèce : *precatorius*

II.2 Noms Communs :

Elle est communément appelée en :

- Français: *liane réglisse, arbre a chapelet, œil de paon, graine diable, herbe de diable, cascavelle, jequirity*
- Bambara: *n'de bleni, cema*

II.3 Caractères Botaniques :

Originare de l'inde, la plante de *Abrus precatorius* pousse aujourd'hui dans toutes les régions tropicales comme le Mali. C'est une plante grimpante ligneuse pouvant faire 50 m de long et donc atteindre le sommet des plus grands arbres. Les feuilles composées ont de 8 à 17 paires de folioles membraneuses, oblongues ou oblongues-ovales. Les inflorescences sont longues de 2 à 7 cm, la corolle est rose à pourpre. Les

fruits sont des gousses qui souvent se mêlent et s'entortillent en grappe et renferment 3 à 7 graines très dures, d'une taille moyenne de 5 mm, écarlates avec une tache noire près du hile (voir les Figures 1, 2 et 3).

Les graines servent à faire des colliers et chapelets mais sont extrêmement toxiques. Elles provoquent l'agglutination des globules rouges puis la mort par asphyxie. Il faut noter que les graines doivent être broyées pour révéler leur toxicité, car leur tégument est si dur qu'avalées entières elles ne feront que traverser le système digestif sans causer aucun trouble. Certaines personnes voient dans l'opposition du rouge/noir des graines une forme de représentation de la dualité cosmique telle que la voit le Tao dans son principe du Yin et du Yang.

La culture est simple, un substrat drainant est important (la plante pousse volontiers dans le sable) et il est préférable de ménager une saison d'hiver avec arrosages réduits. Elle demande de la chaleur et acceptera le plein soleil ou la mi-ombre si la température lui convient.



Figure 1 : Photo des Feuilles de *Abrus precatorius*



Figure 2 : Photo de la graine mûre de *Abrus precatorius*



Figure 3 : Gousse immatures d'*Abrus precatorius*

II.4 Emplois

Les graines sont considérées, à juste titre, comme toxique pour les hommes et les animaux dans tout le Sénégal et leur usage, uniquement externe, est très peu signalé. Le décocté ou le macéré de feuilles est quelque fois prescrit pour les conjonctivites par les *wolof* et *Lébou* du Cap-Vert. Ses racines sont utilisées pour la gonorrhée et la jaunisse. La plante est aussi utilisée comme abortive, laxative, sédatrice et aphrodisiaque (Doumbia, 2005).

Des extraits de tiges et de racines de *Abrus precatorius* présentent une activité notable contre les cestodes et les schistosomules (*Schistosoma mansoni*) (Molgaard P. et coll. 2001).

II.5 Drogue

Elle est constituée par les graines qui sont ovoïdes, brillantes, bicolores. La région du hile est pourpre, presque noire et le reste est rouge.

II.5.1 La Graine :

Les graines de *Abrus precatorius* contiennent une lectine toxique, l'abrine et une agglutinine non toxique. Elles renferment aussi de l'acide abrique, des terpènes du β systérol, du stigmastérol, de l'acide gallique, un alcaloïde, de l'acide polygalacturonique, du pentosane, des sucres réducteurs, et un glucoside.

L'abrine est une toxine puissante qui se compose de quatre isotoxines (a, b, c et d), monovalents ayant des poids moléculaires allant de 63 à 67 KDa. C'est une glycoprotéine ayant beaucoup d'affinités avec les résidus du sucre, ce qui a conduit à la classer parmi les lectines. Elle est constituée de deux chaînes de protéines (sous-unités A et B) et de deux résidus du sucre comparativement petits. La lectine proprement dite (sous-unité B) se fixe sur les cellules cibles, ce qui permet le transfert de la protéine enzymatique active (sous-unité A, également appelée toxome). Les

lectines dotées d'une telle structure affichent une sélectivité et une toxicité élevées. Son mécanisme d'action toxique est identique à celle de la ricine, mais la toxicité de l'abrine chez la souris est de 75 fois celle de la ricine

II.5.2 Autres organes :

Les racines, les feuilles, les tiges contiennent de la Glycyrrhizine donnant par hydrolyse de l'acide glycyrrhétique et deux molécules d'acide glucuronique (5-10% dans les feuilles), protéines (26,7% dans les feuilles), glucides (feuilles) et les saponosides triterpéniques. (Dickers KJ, 2003)

II.6 Pharmacocinétique et Métabolisme

L'abrine n'est pas hydrolysée par les enzymes du tube digestif et, malgré la grosseur de ses molécules, elle est relativement vite résorbée. Comme dans le cas des lectines du haricot commun, la biodisponibilité après l'ingestion semble faible (<10 %), plus de 90 % de la dose étant susceptible de traverser les intestins sans être digérée. Son élimination résulte probablement de la formation d'anticorps contre les lectines et de la phagocytose de ce complexe immun.

II.7 Pharmacologie et Toxicologie

L'abrine compte parmi les plus puissants poisons biogènes, l'abrine a étant la plus toxique de ses quatre isotoxines. En cas d'application intraveineuse à un animal, la DL₅₀ (dose unique létale 50 %) est inférieure à un microgramme par kilogramme de son poids. En revanche, les résultats obtenus pour la toxicité aiguë varient fortement en cas d'administration intrapéritonéale. Pour une souris, la DL₅₀ d'abrine oscille alors entre 1,5 et 1,8 µg/kg , et grimpe à 10 µg/kg dans le cas de l'abrine a . (Dickers KJ, 2003)

Les doses létales minimales (DLM) d'abrine administrées par voie intraveineuse sont à peine inférieures à la DL₅₀ chez la souris, le rat et le cobaye, à cause de la très forte

penne de la relation dose-effet. Des souris ayant reçu de façon répétée, sur une période de quatre semaines, la moitié de la DLM sont restées en bonne santé ou ne présentaient que des symptômes cliniques négligeables. Les chiens semblent un peu moins sensibles que les rongeurs.

En cas d'absorption de doses toxiques d'abrine, les symptômes sont certes un état de faiblesse, l'inappétence, l'apathie et une légère fièvre, mais en revanche le système nerveux central n'est pas atteint, et ni le foie ni les reins ne présentent de dysfonctionnement. La toxicité de l'abrine est due aux particularités typiques des lectines toxiques. Les lectines réagissent avec les cellules de la bordure en brosse du duodénum, conduisent à la destruction des cellules et par suite à des troubles de la digestion et de l'absorption des aliments.

La toxicité des graines n'est possible qu'une fois le tégument dur externe est enlevé, sinon elle échappe à la désintégration lors de la digestion et la toxine ne serait pas libérée (Kerharo et Coll, 1974). D'après Diacono, l'extrait aqueux des graines récentes possède une toxicité plus élevée que celui des anciennes graines sur les cobayes. Par contre, les extraits alcooliques sont doués d'une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et *Eschérichia coli*. Cette activité antibactérienne est surtout élevée avec les extraits à base de tégument (Desai et Coll, 1966). Par ailleurs des effets abortives et tératogènes de l'extrait des graines ont été observés après des essais histopathologiques sur des rats et souris (Iserin et Coll, 2001).

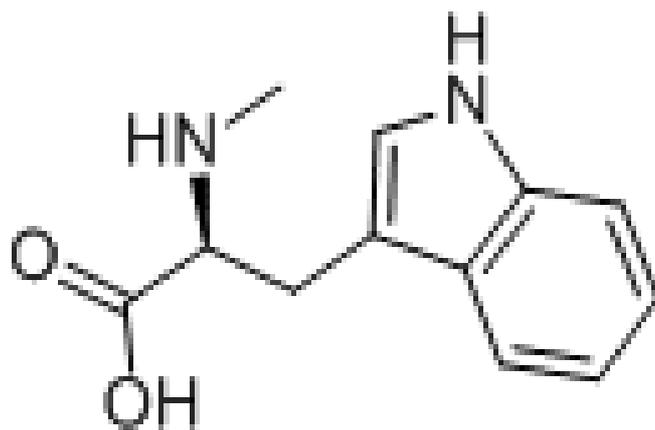


Figure 4 : Structure Chimique de L-Abrine

III. Le Système ABO

III.1. Définition

Le système des groupes sanguins ABO est un système de reconnaissance des globules rouges étrangers à l'organisme grâce à la présence de structures antigéniques à la surface de ces cellules.

En 1900, Landsteiner observe que les globules rouges de certains individus sont agglutinés par le sérum de certains autres ; il découvre ainsi les antigènes A et B et leurs anticorps respectifs.

En 1902 : Decastello et Sturli reconnaissent un 4ème groupe plus rare : AB.

En 1924 : Bemstein montre que les groupes constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de Mendel.

III.2. Groupe ABO

La découverte du système ABO signe la date de naissance de l'immunogénétique et a été à l'origine de progrès considérable en médecine en permettant d'envisager des transfusions compatibles chez l'homme. A cause de sa large distribution tissulaire, le système ABO représente aussi l'antigène d'histocompatibilité majeur en transplantation d'organe.

Les antigènes A et B détectés par des anticorps spécifiques définissent quatre groupes sanguins principaux : A, B, AB, O (absence d'antigènes A et B). Dans le sérum on trouve toujours l'anticorps correspondant aux antigènes ou à l'antigène absent des globules rouges. Ainsi, les sujets du groupe A ont toujours un anti-B ; les sujets du groupe B ont toujours un anti-A ; les sujets de groupe AB n'ont pas d'anticorps et les sujets de groupe O ont les deux anticorps anti-A et anti-B voir tableau 3.

Tableau III : Les Groupes sanguins

Antigène	Sérum	Groupe	Fréquence
Ni A, ni B	Anti A et anti B	O	43%
A	Anti B	A	45%
B	Anti A	B	9%
AB	Ni anti- A, ni Anti-B	AB	3%

En utilisant des extraits de plantes (lectines) on peut subdiviser des sujets A en deux sous groupes A1 et A2. Les hématies de sujets A1 (80% des A) sont fortement agglutinées par la lectine anti-A1 de *Dolichos biflorus* mais faiblement agglutinées par la lectine anti-H *Ulex europaeus*. Au contraire, les hématies des sujets A2 (20% des A) ne sont pas agglutinées par *Dolichos biflorus* mais faiblement agglutinées par *Ulex europaeus*. Cette subdivision conduit à l'identification de six phénotypes courant : A1, A2, B, A1B, A2B, O ; résultant de la présence de quatre allèles principaux A1, A2, B, et O.

L'antigène H est la partie du système Hh qui est présente sur la surface de toutes les hématies, exceptées chez les phénotypes *bombay* qui sont extrêmement rares.

Tableau IV : Caractéristiques de l'antigène H

Anti-H	PHENOTYPE	PREVALENCE%
+	H+	99,9%
0	H-	Très rare

H est le précurseur de A et B et ceux-ci ont moins de H que les groupes O. L'ordre de réactivité de l'Anti-H avec les hématies du système ABO est schématisé de la façon suivante :

FORT						FAIBLE
O	A2	B	A2B	A1	A1B	

Figure 5 : Ordre de réactivité de l'antigène H

III.3. Structure chimique

Les antigènes ABO sont constitués de glycannes liés à des protéines (glycoprotéines) ou à des lipides membranaires (glycolipides).

Dans les glycoprotéines la liaison est de type O-glycosidique. Sur le dissaccharide central : galactosyl β 1-3 N-acétyl-galactosamine sont liés des N-acétyl-glucosamines et des galactoses plus quelques fucoses. L'une des antennes est terminée par une N-acétyl-glucosamine chez les sujets du groupe A et par un galactose chez les sujets du groupe B. Il n'y a pas d'ose à cette place chez les sujets du groupe O.

III.4. Lectines spécifiques des groupes sanguins

Plusieurs lectines agglutinent les hématies des foies avec une spécificité de groupe sanguin (Bird, 1974). La spécificité des lectines aux groupes sanguins est présentée dans le tableau V (Doumbia, 2004)

Tableau V : La spécificité des lectines d'origine végétales aux groupes sanguins

Spécificités	Plante
Anti-A	<i>Phaseolus limensis</i>
Anti-A1	<i>Dolichos biflorus</i>
Anti-B	<i>Ptita plumosa</i>
Anti-A+B	<i>Crotalaria striata</i>
Anti-H	<i>Lotus tetagonolus</i> <i>Ulex europaeus</i>
Anti-M	<i>Iberis amaras</i>
Anti-N	<i>Vicia graminea</i>

TROISIEME PARTIE :

NOTRE ETUDE

I. Matériels et Méthodes

Il s'agit d'une étude réalisée aux laboratoires de phytochimie du Département de Médecine traditionnelle (DMT) et de sérologie groupage du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS).

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel végétal :

Les graines de *Abrus precatorius* étudiées ont été récoltées dans le jardin du DMT à Sotuba (Bamako) et ont été ensuite triées et conditionnées dans un sachet plastique.

I.1.2. Matériel Biologique:

Notre étude a porté sur les hématies humaines prélevées chez des donneurs de sang provenant du Centre Nationale de Transfusion Sanguine(CNTS) à Bamako.

I.1.3. Matériels techniques :

1 Les Equipements de laboratoire :

Les matériels utilisés au laboratoire ont été : Agitateur ; Bain-marie ; Balance de précision électronique de portée maximale ; Bécher ; Broyeur ; Centrifugeuses ; Ciseau ; Compresse coton ; Couteau ; Embouts ; Entonnoir ; Eprouvettes graduées (1litre, ½ l, 100 ml, 50ml, 25ml, 10ml et 5ml,) ; Erlenmeyer ; Etuve ; Flacon de 125 ml ; Lames porte objets ; Lyophilisateur ; Marqueur ; Micropipettes ; Microscope optique muni d'objectifs (10, 40 et 100) ; Mortier et pilon en bois ; Papier filtre ; Petites Bouteilles récupérées, lavées, stérilisées à l'étuve à 100 degré pendant 24 h ; Pipette pasteur pipettes (5-10ml) ; Plaque pour groupage ; Poire ; Portoir ; Réfrigérateur ; Rotavapor ; Sachets en plastique ; Spatules ; Colonne ; Pompe aspirateur ; Tube de dialyse ; Bassine ; Tube à essai.

2 **Solvants et Réactifs de laboratoire :**

Les réactifs utilisés ont été : Eau de javel ; Eau distillée ; Eau physiologique ; Ether de pétrole ; NaCl ; NaOH ; NaN₃ ; Réactifs de groupage de *Ulex europaeus*, *Dolichos biflorius* et d'anticorps monoclonaux ; Sulfate d'ammonium.

I.2 Méthodes

I.2.1 Extraction des Lectines :

La coque dure et lisse des graines de *Abrus precatorius* rend leur concassage difficile. Les graines ont été ainsi écrasées à l'aide de cailloux silex. Les amandes séparées des téguments ont été ensuite broyées à l'aide d'un petit moulin et la poudre obtenue a servi pour l'extraction des lectines. Ainsi 100 grammes de poudre ont été dégraissées avec 500ml d'éther de pétrole dans un erlenmeyer pendant 24 heures. Le marc obtenu a été macéré dans un litre d'eau physiologique pendant 18 heures à 4°C puis filtré. Le filtrat recueilli a été centrifugé à une vitesse de 1000 Trs/mn pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a constitué notre extrait brut (Figure 5). L'extrait brut a été conservé au frais et a servi pour le test d'hémagglutination et aussi pour la suite de nos investigations

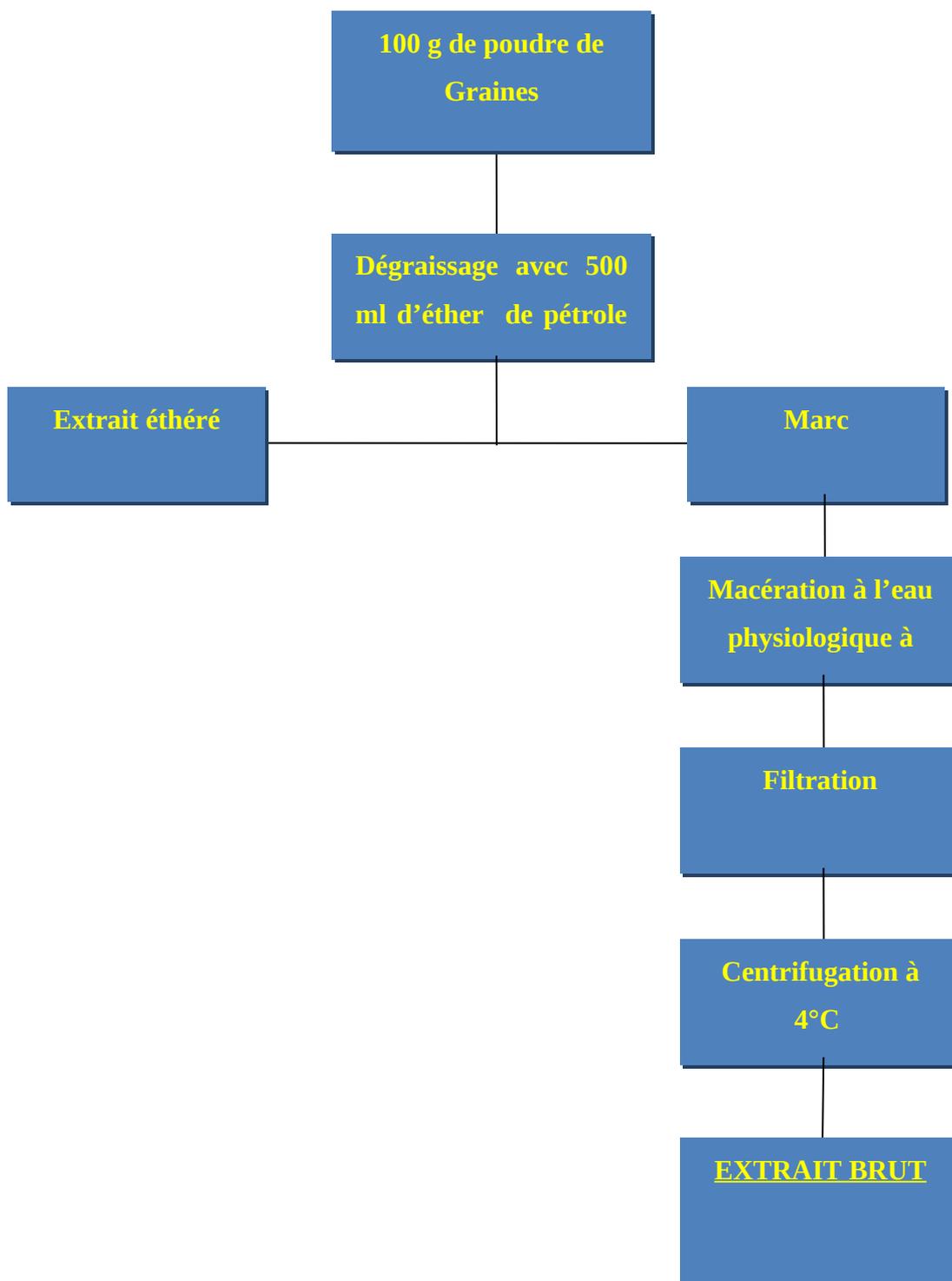


Figure 6 : Schémas d'extraction des lectines à partir de la poudre de graine de *Abrus precatorius*

I.2.2 Purification :

La technique de filtration sur gel et de précipitation au sulfate d'ammonium ont été utilisées pour purifier notre extrait brut.

I.2.2.1 Filtration sur gel :

1. Le Principe :

La filtration sur gel est une technique de fractionnement des extraits qui repose sur la séparation selon la masse moléculaire. Ainsi, les substances de masses élevées sont les premières à être recueillies.

2. Techniques :

- Description de la colonne :

La colonne utilisée a une hauteur de 100 cm avec un diamètre de 4,5cm d'ou un volume de 700 ml environ.

- Montage du dispositif :

La colonne était fixée sur une potence à l'aide de 2 pinces, et reliée de haut en bas à deux petits raccords. Celui d'en haut est relié à la pompe qui aspire les extraits et l'eau physiologique, et celui d'en bas sert au drainage des éluâts à la sortie de la colonne.

- Remplissage de la colonne :

La colonne a été remplie de gel Sephacryl, qui a été lavé avec de l'eau physiologique pendant 24h.

- Passage de l'extrait Brut :

L'extrait brut a été passé sur la colonne à travers une pompe réglée à 2ml/mn. Après épuisement de l'extrait, le bout de la pompe a été plongé dans l'eau physiologique dégazée utilisée comme solvant d'élution.

La séparation de l'extrait brut sur le gel a permis d'isoler 3 fractions (F1, F2 et F3) ayant respectivement une coloration jaune pâle, blanche et incolore. Les fractions obtenues ont été au préalable testées sur les hématies et ensuite lyophilisées.

3. La Dialyse :

Sachant que les protéines de l'extrait sont de grosses molécules, une dialyse a été effectuée afin d'éliminer le maximum de petites molécules et le sel contenu dans l'eau physiologique ayant servi pour l'élution des extraits.

- Principe :

Elle est l'opposé de l'osmose c'est à dire les ions quittent le milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré.

- Mode Opératoire:

Le principe consiste à remplir les tubes de dialyse avec les fractions obtenues par filtration sur gel et à les placer dans un récipient rempli d'eau distillée pendant 24H. Les fractions sont récupérées pour être ensuite lyophilisées.

- Préparation des tubes de dialyse :

La préparation des tubes consiste à :

- Bouillir les tubes dans une solution à 2% de NaOH pendant 10 minutes
- Bouillir ensuite 2 fois dans l'eau distillée (quantité non déterminées) pendant 5 à 10 minutes.
- Rincer les tubes (intérieur et extérieur) avec de l'eau distillée.
- Conserver au frais dans de l'eau distillée contenant 0,05% de NaN_3 jusqu'à utilisation.

1.2.2 Précipitation au sulfate d'ammonium:

1. Principe :

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient. Les protéines seront éventuellement toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

2. Technique :

Le fractionnement protéique est effectué sur 10 ml d'extrait brut de *Abrus precatorius* à différentes concentrations de sulfate d'ammonium (pourcentage de saturation) : 40% ; 60% ; 70% ; 80% ; 95% ; ajoutées par petites fractions appropriées. Le tout est soumis à une agitation mécanique à froid. Après un repos d'une heure environ, la solution est centrifugée à 4000 trs /mn pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu est éliminé et le précipité est recueilli dans 10 ml d'eau physiologique et a servi pour le test d'hémagglutination.

I.2.3 Lyophilisation :

I.2.3.1 Principe :

C'est une technique de déshydratation à basse température et sous vide qui consiste à transformer des extraits initialement liquide en poudre (lyophilisat).

I.2.3.2 Technique :

Les extraits purifiés ont été d'abord congelés puis fixés au lyophilisateur. Les lyophilisats obtenus sont testés sur des hématies à différentes concentrations.

I.2.3.3 Dilution des lyophilisats :

Une série de dilution de l'extrait brut et des fractions a été réalisée. La concentration des dilutions étaient de 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,50 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml, 7,8125 µg/ml et 3,90 µg/ml. Dans un portoir huit tubes contenant chacun 1ml d'eau physiologique ont été disposés. 10 mg correspondant à 10000 µg de poudre de lyophilisats ont été pesées et versées dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique. Le tube a été placé dans un agitateur à tube puis dans un agitateur à ultra son pendant deux minutes pour dissoudre les précipités. 1 ml de ce mélange a été prélevé et ajouté dans le premier tube. Après agitation 1ml du premier tube a ensuite été ajouté au deuxième tube. On procède ainsi jusqu'au dernier tube de la série de dilution.

I.2.4 Activité hémagglutinante des extraits :

I.2.4.1 Préparation de suspension d'hématie à 5% :

La préparation de la suspension d'hématies a été effectuée selon l'épreuve de Simonin. Les hématies tests ont été débarrassées de toute trace de sérum ou plasma.

Pour cela elles ont été soumises à un lavage puis à une dilution. Puis, elles ont été mises en suspension à 5 % pour l'emploi.

1. Lavage des hématies :

Dans un portoir contenant quatre tubes secs portant chacun la lettre correspondant aux groupes sanguins A, B, AB et O ont été disposé. 3 ml de sang de chaque groupe ont été mis dans les tubes correspondants auxquels 1 ml d'eau physiologique a été ajouté. Après agitation, le mélange a été centrifugé à 1000trs /mn pendant 5mn. Le surnageant formé a été versé et le culot d'hématies obtenu a été de nouveau mis en suspension sous agitation avec de l'eau physiologique. Cette opération a été reprise quatre fois de suite dans les mêmes conditions.

2. Dilution des hématies :

Elle a été faite à 5%, dans de l'eau physiologique dans de nouveaux tubes portant le nom des groupes correspondant aux hématies utilisées.

1.2.4.2 Test d'Agglutination :

Pour tester l'activité hémagglutinante des extraits deux techniques d'agglutinations ont été utilisées : la technique en tube et la technique sur plaque.

1. Technique en Tube :

Deux tubes secs contenant respectivement trois gouttes d'hématies diluées à 5% des groupes de sang pour chaque extrait ont été utilisés. 50µl d'extrait végétal ont été ajouté dans chacun des tubes après 5mn d'incubation, le mélange a été centrifugé à 1000trs / mn pendant 1mn. En cas de réaction positive, les hématies se présentaient sous forme de lambeaux fins.

2. Technique en Plaque :

Une goutte de sang diluée à 5% de chaque groupe a été étalée sur une plaque d'opaline. A chaque goutte de sang a été ajouté l'extrait végétal à volume égal, le mélange a été ensuite trituré avec l'extrémité inférieure d'un tube à hémolyse. Après, la plaque a été oscillée lentement pendant quelques secondes, puis laissée au repos.

La lecture à l'œil nu a été effectuée au bout de deux minutes.

I.2.5 Etude comparative de l'activité agglutinante de nos extraits :

Elle a été effectuée sur 100 échantillons de sangs choisis de façon aléatoire pendant une semaine au CNTS. Sur ces 100 prélèvements, l'activité agglutinante de nos extraits a été comparée à celles des lectines de *Dolichos biflorius* (l'anti-A1) et de *Ulex europaeus* (l'anti-H) d'une part et à celles des réactifs à base d'anticorps monoclonaux (l'anti-A, l'anti-B et l'anti-AB) d'autre part.

Pour être proche de la concentration de *Dolichos biflorius* et de *Ulex europaeus*, les extraits ont été utilisés à leurs faibles concentrations d'agglutination : Extrait brut, fraction 1 dosées à 62,5µg /ml et Fraction 2 dosée à 31,25µg /ml.

1. Sélection des hématies :

Les échantillons d'hématies du jour ont été fraîchement prélevés sur anticoagulant, sur des donneurs volontaires. Les hématies ont été triées pour éliminer celles dont des résultats sont positifs aux tests de HIV, HBS et HCV pour la sécurité dans la manipulation.

2. Lavage des hématies :

Un lot de tube sec de 4 ml numéroté de 1 à 20, suivant le numéro d'ordre de chaque donneur a été disposé dans un portoir. Sur 1ml de sang prélevé est ajouté 3ml d'eau

physiologique, les tubes ont été fermés puis centrifugés à 1000trs /mn pendant 20mn à la température du laboratoire. Le culot d'hématies a été repris et lavé trois fois successivement.

3. **Dilution des hématies :**

De nouveaux tubes numérotés ont été disposés dans un portoir. Sur 50 μ l de culot d'hématies ont été ajoutés 3ml d'eau physiologique, puis agités pendant quelques secondes. Les diluats ainsi obtenues servaient pour les tests.

4. **Mode d'utilisation des réactifs :**

1. *Dolichos biflorus* Anti-A1 :

La lectine extraite des graines de *Dolichos biflorus* permet de distinguer le sous groupe A1. La technique en tube et la technique sur plaque peuvent être utilisées. Dans cette étude, la technique sur plaque a été choisie.

- **Méthode :**

- 1- Préparer une suspension de sang à 5 %
- 2- Ajouter 1 volume de sang sur 1 volume du réactif.
- 3- Triturer pendant quelque secondes avec l'extrémité inférieure d'un tube
- 4- Procéder à la lecture Au bout de 30 secondes, sinon après ce temps d'autres sous-groupes comme A2 et A2B peuvent être agglutinés. Une agglutination indique la présence de l'anti-A1.

2. *Ulex europaeus* anti-H :

La lectine isolée des graines de *Ulex europaeus* permet de distinguer le sous groupe A2. Seule la technique en tube est recommandée pour son utilisation.

- Méthode :

- 1- Préparer une suspension de sang à 5 %
- 2- Placer dans les tubes 1 volume de sang plus 1 volume de l'anti-H
- 3- Laisser incuber pendant quelques minutes à la température du laboratoire
- 4- Soumettre les tubes fermés à une centrifugation à 1000trs/mn pendant 20 secondes
- 5- Observer l'agglutination de façon macroscopique

3. *Les Anticorps Monoclonaux :*

Pour détecter la présence ou l'absence des antigènes A et B sur les hématies, les anticorps Anti-A, anti-B et Anti-AB monoclonaux dirigé contre les antigènes correspondants ont été utilisés. Ces anticorps monoclonaux sont préparés à partir de surnageants de cultures de cellules d'hybridomes.

Deux techniques peuvent être utilisées : la technique sur plaque et la technique en tube.

Dans cette étude, la technique sur plaque a été choisie :

- Méthode:

1. Préparer une suspension de sang à 5 %
2. Distribuer une goutte de chaque réactif approprié sur une plaque propre.
3. Ajouter à proximité de chaque goutte du réactif 1 goutte de sang total
4. Mélanger l'anticorps et le sang d'une façon uniforme
5. Observer l'agglutination macroscopique

II. Résultats

II.1 Activité hémagglutinante des lectines de l'extrait brut :

L'activité hémagglutinante des lectines de l'extrait brut est positive. On observe une agglutination totale des hématies du groupe A après 2mn d'incubation.

II.2 Activité hémagglutinante des fractions obtenues après Purification :

1. Filtration sur gel :

Trois fractions (F1, F2 et F3) sont obtenues au cours de la filtration sur gel. Seules les deux premières fractions F1 et F2 donnent de forte agglutination (Figure 6 et Tableau VI).



Figure 7 : Activité des différents filtrats non lyophilisé sur le groupe A

Tableau VI : Activité hémagglutinante de l'extrait brut et des fractions

Lectines	Activité Hémagglutinante
Extrait brut	++++
Fraction 1	+++
Fraction 2	++
Fraction 3	-

Légende :

- Agglutination totale : + + + +
- Agglutination forte : + + +
- Agglutination moyenne : + +
- Absence d'Agglutination : -

2. Précipitation au sulfate d'ammonium :

Cinq fractions sont obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium. De 40 à 70% de saturation de sulfate d'ammonium, de très fortes agglutinations sont obtenues. De 80% à 95% l'activité est devenue très faible. (Tableau VII).

Tableau VII : Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium

Lectines	Pourcentage de saturation de Sulfate d'ammonium	Activité hémagglutinante
Fraction 1	40%	+++
Fraction 2	60%	+++
Fraction 3	70%	+++
Fraction 4	80%	+
Fraction 5	95%	+

Légende :

- Agglutination forte= +++
- Agglutination faible= +

II.3 Activité hémagglutinante des différents lyophilisats :

1. L'extrait Brut :

L'activité la plus élevée est visible à la dilution de 1000µg/ml et la plus faible à partir de 62,5µg/ml (Tableau VIII)

2. Les fractions obtenues par filtration sur gels :

Pour la fraction 1 (F1), l'activité la plus élevée est visible à la dilution de 1000µg/ml et la plus faible à partir de 62,5µg /ml (Tableau VIII).

Pour la fraction (F2), l'activité la plus élevée est apparue à 1000µg/ml et la plus faible jusqu'à 31,25 (Tableau VIII).

Tableau VIII : Agglutination des différentes dilutions de lyophilisats sur les hématies du groupe A

Lyophilisats	Dilution µg /ml								
	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,8	3,9
Extrait Brut	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Fraction1	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Fraction 2	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-

3. Les Fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium:

Aucune activité n'a été observée avec les lyophilisats des fractions protéiques.

II.4 Résultat de l'Etude Comparative :

1. Activité hémagglutinante des extraits : (Tableau IX)

Les extraits de lectine (l'extrait brut et les Fractions F1, F2) de *Abrus precatorius* ont agglutiné partiellement toutes les hématies des autres groupes. Par contre toutes les hématies du groupe A ont été entièrement agglutinées.

Tableau IX : Résultat d'Agglutination des extraits

Dilution Hématies	62,5µg /ml (Extrait brut)	62,5µg /ml (Fraction1)	31,25µg /ml (Fraction2)
A	+	+	+
B	+/-	+/-	+/-
AB	+/-	+/-	+/-
O	+/-	+/-	+/-

Légende :

- Agglutination Totale : +
- Agglutination partielle : +/-

2. Agglutination des Réactifs d'anticorps monoclonaux et des lectines de *Dolichos biflorus* et de *Ulex europaeus* sur les hématies : (Tableau X)

- **L'Anti-A** a agglutiné 29% des hématies du groupe A, dont 25% du sous groupe A1 agglutiné par l'Anti -A1 et 4% du sous groupe A2 agglutiné par l'Anti-H.
- **L'Anti-B** a agglutiné 19% des hématies du groupe B, dont l'Anti-H 6%, l'Anti-A1 0% et l'Anti-AB 19%.

- **L'Anti-AB** a agglutiné 4% des hématies du groupe AB, 29% du groupe A et 19% du groupe B.
L'Anti-H et l'Anti-A1 n'ont eu aucune action sur AB.
- **L'Anti-H** a agglutiné 48% des hématies du groupe O et les autres réactifs n'ont eu aucune action sur O.

Tableau X : Résultat d'Agglutination

Réactifs Hématie	ANTI-A1	ANTI-H	ANTI-A	ANTI-B	ANTI-AB
A (29%)	25%	4%	29%	0%	29%
B (19%)	0%	6%	0%	19%	19%
AB (4%)	0%	0%	4%	4%	4%
O (48%)	0%	48%	0%	0%	0%

III. Commentaires et Discussion :

Notre étude portait sur l'évaluation de l'activité hémagglutinante des lectines des plantes, entreprise par le Département de Médecine traditionnelle. Le travail était la suite de celui effectué par ALI en 2006 sur quatre plantes dont la notre : les graines de *Abrus precatorius*

Pour optimiser l'extraction de nos lectines afin d'améliorer l'effet agglutinant des extraits, nous avons procédé à un concassage des graines de *Abrus precatorius* pour obtenir les amandes qui constituent la partie la plus riche en lectines (Jaffe W.G 1980 ;

Mialonier et coll., 1973). L'extrait brut aqueux obtenu a donné une agglutination totale des hématies du groupe A et partielle des autres groupes, après 2mn d'incubation. L'activité hémagglutinante des lectines de *Abrus precatorius* obtenue est comparable à celle observé par Ali (2006) et Doumbia (2005) au DMT.

Dans le but d'éliminer les impuretés afin d'améliorer l'activité hémagglutinante de l'extrait brut, nous avons procédé à la purification par filtration sur gel et par précipitation au sulfate d'ammonium : La filtration sur gel a donné deux fractions actives (F1 et F2) à fortes agglutinations tandis que la précipitation au sulfate d'ammonium a donné trois fractions de fortes agglutinations de 40 à 70 % de saturation. L'activité hémagglutinante de ces fractions est moindre par rapport à l'extrait brut. Cette différence d'activité est certainement due au faite que les fractions purifiées sont les diluât de l'extrait brut.

Nous avons procédé à la lyophilisation de l'extrait brut et des fractions pour connaitre leur concentration minimale active et aussi pour éviter leur détérioration lors de la conservation. Les lyophilisats de l'extrait brut et des fractions 1et 2 obtenues par filtration sur gel ont donné leurs plus fortes agglutinations à la même concentration soit 1000 μ g/ml et des faibles agglutinations à des concentrations différentes : 62,5 μ g/ml pour l'extrait brut et la fraction 1 et 31,25 μ g/ml pour la fraction 2. En comparaison avec les résultats d'ALI (2006), qui a obtenu la plus forte agglutination à 3900 μ g/ml et la plus faible à 44 μ g/ml des lyophilisats. Nous pouvons affirmer que la purification des extraits a améliorée leurs activités.

Les lyophilisats des fractions obtenues par fractionnement protéiques n'ont donné aucune agglutination.

Par ailleurs, nous avons constaté que les extraits aqueux sont plus actifs que les lyophilisats, car ils agglutinent les hématies en même temps que les anticorps monoclonaux en moins de 2 minutes d'incubation. Parmi les extraits aqueux, c'est

l'extrait brut qui a donné une agglutination totale par rapport aux fractions, cela pourrait s'expliquer par sa forte concentration en lectine.

En comparaison avec les anticorps monoclonaux, les lectines de *Abrus precatorius* ont faiblement agglutiné toutes les hématies du groupe A après 15 minutes d'incubation par rapport à l'anti-A qui a donné des agglutinations plus ou moins fortes après 2 mn d'incubation. La différence de temps et de degré d'agglutination est certainement due à la faible concentration utilisée : 62,5 µg/ml pour l'extrait brut et la fraction 1 et de 31,25 µg/ml pour la fraction 2 de nos extraits en lectines.

Par rapport aux lectines de *Dolichos biflorus* et d'*Ulex europaeus*, les lectines de *Abrus precatorius* n'ont montré aucune capacité à distinguer les hématies du groupe A en sous groupe A1 et A2.

L'anti-H (*Ulex europaeus*) a agglutiné toutes les hématies du groupe O sans exception et certaines hématies du groupe A. Celles-ci constituent les hématies du sous groupe A2. Les études ont montré que le taux de prévalence dans la population du groupe A est de 22% pour A2 et 78% pour A1. L'anti-H a également agglutiné quelques hématies du groupe B et aucune hématie du groupe AB dans nos échantillons.

Les hématies du groupe A ayant donné une agglutination positive avec les lectines de *Dolichos biflorus* (anti-A1) sont du sous groupe A1. Nous avons constaté que dans nos échantillons qu'il y a plus de A1 que de A2 cela nous met en parfait accord avec la prévalence plus élevée de A1 dans la population de A que A2.

Les lectines de *Abrus precatorius* ont confirmé le pouvoir polyagglutinant des lectines en générale car au cours de l'échantillonnage nous avons constaté que les autres groupes ont été plus ou moins faiblement agglutinés. Notre étude a montré que l'activité polyagglutinante des lectines peut être résolue en utilisant que les extraits aqueux et en procédant à la lecture des résultats en moins de 5 mn d'incubation. Nos

résultats suggèrent qu'au delà de ce temps les lectines d'*Abrus precatorius* réagissent aussi avec les autres groupes sanguins.

IV. Conclusion et Recommandations :

Conclusion :

La présente étude montre que les lectines isolées des graines de *Abrus precatorius* agglutinent fortement les hématies du groupe A par rapport aux autres groupes sanguins.

Les lectines de *Abrus precatorius* comparées aux anticorps monoclonaux ont eu les mêmes pouvoirs et degré d'agglutinations avec les même temps d'incubations. Des degrés d'agglutination nettement supérieurs à celui des lectines du *Dolichos biflorus* (Anti-A1) et *Ulex europaeus* (AntiA2) ont été observés sans pour autant permettre de différencier les sous groupes A1 et A2.

Les lectines de *Abrus precatorius* pourraient êtres des lectines ayant une spécificité GalNAc à condition de procéder à la lecture des tests en 2 minutes d'incubation sinon dépassé ce temps d'autres groupes réagissent en provoquant ainsi une polyagglutination.

Les lectines de *Abrus precatorius* étant des molécules multivalentes et a plusieurs agglutinines, il serait envisageable soit d'isoler l'agglutinine responsable de la spécificité aux hématies A soit d'inhiber les sucres qui sont moins spécifique pour élucider la polyagglutination.

L'amélioration de la qualité de l'extraction et la purification peut faire des lectines de *Abrus precatorius* des réactifs de groupage d'origines végétales aux mêmes titre que celles de *Dolichos biflorus* et de *Ulex europaeus* et être ainsi utilisé par les centres spécialisés.

Recommandations :

Au DMT

De poursuivre les investigations sur les graines de *Abrus precatorius*.L

- Ajouter de l'albumine pour tenter de baisser la concentration de l'extrait brut afin qu'il soit moins discriminant que l'extrait purifié.

- Améliorer les résultats par des artifices techniques afin d'en élaborer un réactif.

QUATRIEME PARTIE

Bibliographie:

1. MONOGRAPHIES DE *Abrus precatorius*:

<http://www.jardinsdumonde.org> : 25 Mars 2010

2. INFORMATION GENERALE SUR L'INTOXICATION DE *Abrus precatorius*:

<http://www.cbif.gc.ca> : 14 Avril 2010

3. LE SYSTEME ABO :

<http://www.snv.jussieu.fr> : 7 Mai 2010

4. ALENCAR N.M.N (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. *Mediators of inflammation*, 8 107-113.

5. ALI K. (2006). Les lectines ayant une spécificité GalNac. Thèse Pharmacie, FMPOS (42). 60p

6. ASSREURY A.M.S (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation*, 6, 201-210.

7. BABOSA T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95 (5), 673-678

8. BANWELL J.G. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean : a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenrology*, , 84, 506-515

9. BIRD G.W.G (1974). Plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte anomalies. *Ann. N.Y. Acad. Sci* ; 234,129.

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

11. CHRISPEELS, MJ and RAIKHEL, NV (1991). Lectins, Lectin genes and their role in plant defense. *Plant cell*, 3, 1-9.

12. DAM, T.K. and BREWER, C.F. (2002) Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*, 102, 387-429.

13. **DAVIS JH** (1978). *Abrus precatorius* (rosary pea). The most common lethal plant poison. *Journal of Florida Medical Association*, 65: 189-191.
14. **DEMBELE V.**, (1996). Contribution a l'étude de lectine végétales à Bamako. Thèse Pharmacie, FMPOS. 66p
15. **DESAI R V, SIRSI M** (1966). Antimicrobial activity of *Abrus precatrius* Linn, *Inian J. Pharm*, 28 N°6 , 164-165
16. **DIAZ, L.C., MELCHERSe, L.S., HOOYKAAS, P.J.J., LUGTENBERG, B.J.J. et KIJNE, J.W.** (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. *Nature*, Vol. 338, p. 579-581.
17. **DICKERS KJ., BRADBERRY SM., RICE P., GRIFFITHS GD., VALE JA.**, (2003). Abrin poisoning *Toxicol. Rev.*, **22 (3)**, 137-142.
18. **DOUMBIA M** , (2004). Etudes de l'activité hémagglutinante des lectines extraites des graines de la flore malienne. Thèse Pharmacie, FMPOS, 84P
19. **ETZLER, M. E.**, (1985). Plant lectins: Molecular and Biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:209-234.
20. **ETZLER, M.E.** (1986). Distribution and function of plant lectins in The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando (USA) : Liener, I.E. ; Sharon, N. ; Goldstein, I.J. , Academic Press, Inc., p. 371-437.
21. **FALASCA A.I.** (1989). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowics. *Febs Lett.*, , 246(1-2) 159 -162
22. **GOLDSTEIN, I. J. & HAYES, C. E.**, (1978). The lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35:127 340.

23. **GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N.** (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
24. **GOMES J.C** (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. *Agent Action* , 41, 132-135
25. **GRANT G.** (1991).Lectins. In toxic substances in crop plants.ed.by the royal Society oh Chemistry, 339p.
26. **GREER F., BREWER A.C., PUSZTAI A** (1985). Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Brit. J. Nutr.*, 54, 95 -103
27. **GUILLOT, J., GUERRY, M., KONSKA, G., CALDEFIE-CHEZET, F., DE LATOUR, M. and PENAULT-LLORCA, F.** (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*, 91, 141-158.
28. **GUNSOLUS JM** (1955). Toxicity of Jequirity beans. *J Amer Med Assoc*, 157: 779.
29. **HART M** (1963). Jequirity bean Poisoning. *N Engl J Med*, 268: 885-886.
30. **HEGDE R, MAITI TK, PODDER SK.** (1991). Purification and characterization of three toxins and two agglutinins from *Abrus precatorius* seeds by using lactamyl-sepharose affinity chromatography. *Anal Biochem*, , 194:101-9.
31. **HIRABAYASHI, J.** (2004) Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.*, 21, 35-40.
32. **ISERIN P et coll** (2001). Encyclopédie des plantes médicinales Identification, préparation, soins, édition Larousse/ VUEF, P 36, 84, 158,2006

33. **JAFFE W.G.** hemagglutinins (Lectins) (1980). In toxic constituents of plant foodstuffs. New –York,, Academic Press, 502 p.
34. **JAFFÉ, W. C.** (1969). Hemagglutinins. In I. E. Liener Toxic constituents of Plant Foodstuff. Academic Press, New York
35. **KAMINSKI, P.A., BUFFARD, D. et STROSBERG, A.D.** (1987). The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant molec. Biol.* , Vol. 9, N°5, p. 497-507.
36. **KENOTH R., et al** (2001). Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichsanthes cucumerina* seed lectin. *Eur.J. Biochem.*, , 268, 5541-5549
37. **KERHARO. J, ADAM. G.** (1974), Pharmacopée sénégalaise, Bigot, Paris, P1014.
38. **KOCOUREK, J.; HOREJSL V.,** (1983). A note of the recent discussion of definition of the term "Lectin". In T. C. Bog-Hansen, & G. A. Spengler, (Eds). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Proceedings of the 5th Lectin Meeting. Vol. 3,* Walter de Gruyter Berlin-New York
39. **KULKARNI G.V** (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell.Research*, 245,170-178.
40. **LEE, Y.C. and LEE, R.T.** (1995) Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.
41. **LIENER I. E.** (1976). Phytohaemagglutinins (Phytolectins). *Annu. Rev. Plant Physiol* 27: 291–319
42. **LIENER, I. E.; SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J.,** (1986). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, Orlando, FL. pp: 600.

43. LIS, H. & SHARON, N., (1981). Lectins in higher plants. 371-447. In A. Marcus. The Biochemistry of Plants. Academic Press, vol. 6, New York.
44. LIS, H. and SHARON, N. (1998) Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev., 98, 637-674.
45. LOPEZ S (2003). Anti-humain immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta medica*, 69 (2), 109-112
46. MAKELA, O., (1957). Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn*, 35 SII, 1-156
47. MEITE A; KOUAME K; OFFOUMOU M. (2008). Evaluation de l'activité hémagglutinante des lectines graines de trois espèces de cucurbitaceae couramment consommées en Côte d'Ivoire. *Science et Nature* Vol.5 N°2 199-204
48. MIALONIER, G.; PRIVAT, J. P.; MONSIGNY, M KOHLEN, G. & DURAND, R., (1973). Isolement, propriétés physico-chimiques et localization *in vivo* d'une phytohemagglutinine (lectine) de *Phaseolus vulgaris* L. (var. rouge). *Physiol Veg.*, 11:519-531
49. MOLGAARD P., NIELSEN SB., RASMUSSEN DE., DRUMMOND RB., (2001). Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *J. of Ethnopharmacol.*, 74 (5), 257-264.
50. MURDOCK L.L SHADE R.E (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insect pests. *J. Agric. food. Chem.* 50 (22)6605-6611
51. MYOSHI M. et Al (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. vitaminol.* , 28, 255-264

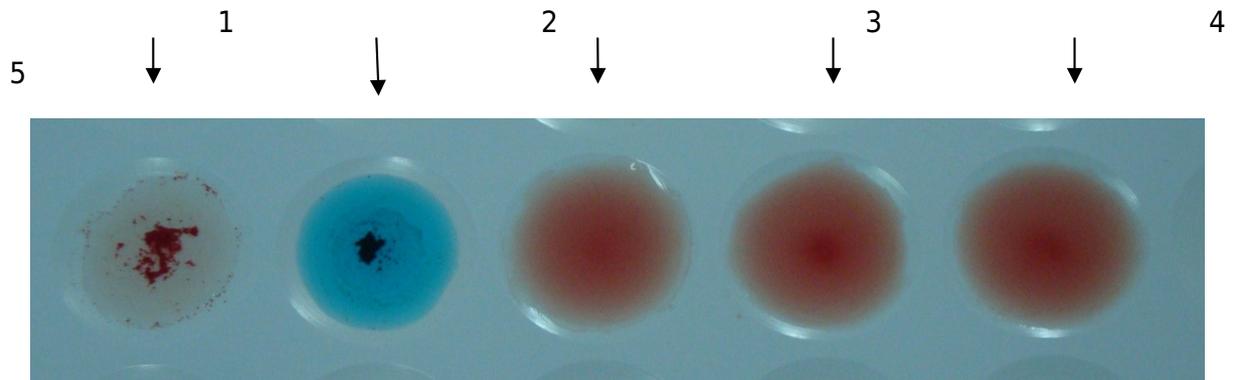
- 52. NACHBAR M.S., OPPENHEIM J.D.**(1980) . Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, ,33 ,2238 -2345
- 53. OLNES, S., REFSNES, K., PIHLA.** Mécanisme d'action des lectines toxiques d'abrine et de la ricine. *Nature* 1974; 249:627-631.
- 54. PARK, S., LEE, M.R. and SHIN, I.** (2008) Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 1579-1591.
- 55. PEUMANS W.J., VAN DAMME J.M.** (1995)-lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, ,109,347-352
- 56. PISTOLE, T.G.**(1981). Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Ann. Rev. Microbiol.* , Vol. 35, p. 85-112.
- 57. PUSZTAI, A.; CROY, R. R. D.; GRANT, G. & STEWART, J.** (1983). Seed lectins, distribution, location and biochemical role. In J. Daussant; J. Mosse, & J. Vaughan, (Eds). *Seed Proteins*, Academic Press, New York
- 58. RENATO DE A, MOREIRA** (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 86, Suppl. II, 211-218.
- 59. RENKONEN K. O** (1948). Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)* 26:66.
- 60. RUDIGER, H.** (1993) .Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, pp. 31-46.
- 61. RUDIGER, H. and GABIUS, H.J.,** (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J*, 18, 589-613.

- 62. SHARON, N. and LIS, H.** (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.
- 63. SHARON, N., and HALIMA, LIS.** (2003) *Lectins*. Kluwer Academic Publishers
- 64. SHARON, N., LIS, H.** (1989). *Lectins*. Chapman and Hall, London.
- 65. STRIPE F & BARBIERI L** (1986). Symposium: Molecular Mechanisms of Toxicity, Toxic Lectins from Plants. *Human Toxicology*, 5(2): 108-109.
- 66. VALENTINER U. et al** (2003). The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.*, , 23 (2B), 1197-1206
- 67. VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. and ROUGE, P.** (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Rev. Plant Sci.*, 17, 575-692.
- 68. WANG H., NG T.G.** (1998) - Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*, , 253, 143- 146
- 69. WASSEF, N.M., RICHARDSON, B.G. et ALVING, C.R.** (1985). Specific binding of Concanavalin A to free inositol and liposomes containing phosphatidyl-inositol. *Biochem. Biophys. Res. Com.* , Vol. 130, p. 76-83.
- 70. YAGI, F., TIWAYA, T. HARAGUCHI and I.J. GOLDSTEIN,**(2002). The Lectin from leaves of Japanese cycad. *Cycas revolute* Thumb. (Gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *Eur. J. Biochem.*, 269: 4335-4341

ANNEXES

Photos :

Photo 1 :



1 : Agglutination totale provoquée par l'extrait brut non purifié sur le groupe A

2 : Agglutination totale provoquée par l'anti-A sur le groupe A

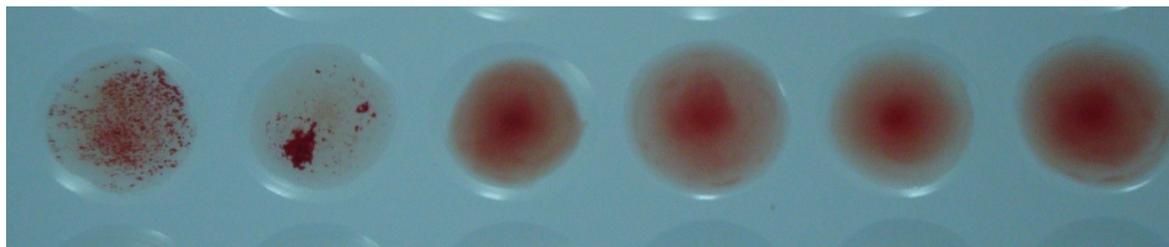
3 : Agglutination faible provoquée par l'extrait brut à 62,5 µg/ml sur le groupe A

4 : Agglutination faible provoquée par la fraction 1 à 62,5 µg/ml sur le groupe A

5 : Agglutination faible provoquée par la fraction 2 à 31,25 µg/ml sur le groupe A

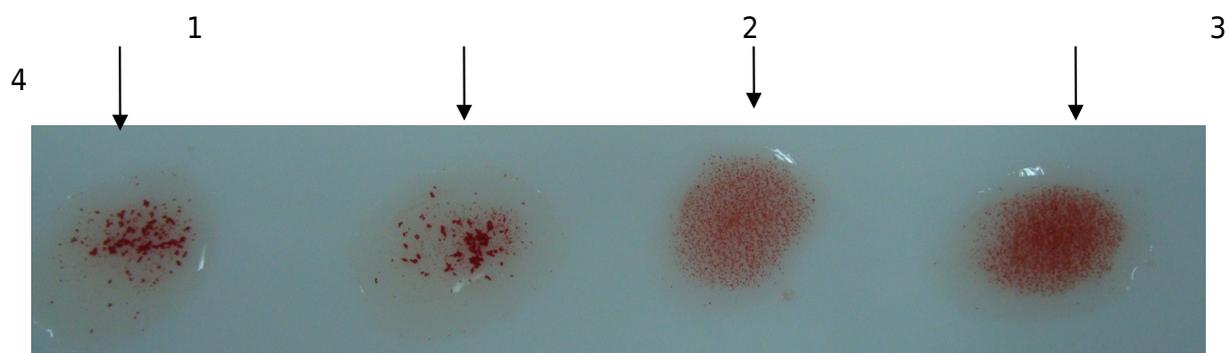
Photo 2 :





- 1 : Agglutination forte provoquée par l'extrait brut non purifié sur A
- 2 : Agglutination totale provoquée par l'anti-A1 sur A
- 3 : Agglutination faible provoquée par l'anti-H sur A
- 4 : Faible agglutination provoquée par l'extrait brut à 62,5 µg/ml sur A
- 5 : Faible agglutination provoquée par la fraction 1 à 62,5 µg/ml sur A
- 6 : Faible agglutination provoquée par la fraction 2 à 31,25 µg/ml sur A

Photo 3 : activité de l'extrait brut sur les différents groupes sanguins



- 1 : Forte agglutination provoquée par l'extrait brut non purifié sur le groupe A
- 2 : Forte agglutination provoquée par l'extrait brut non purifié sur le groupe B
- 3 : Faible agglutination provoquée par l'extrait brut non purifié sur le groupe AB

Photo 5 : Agglutination des différents groupes par l'extrait brut (Eb) , et la fraction 1 (F1) dosée à 62,5µg/ml et de la fraction 2 (F2) dosé à 31,25 après 15 minutes d'incubation

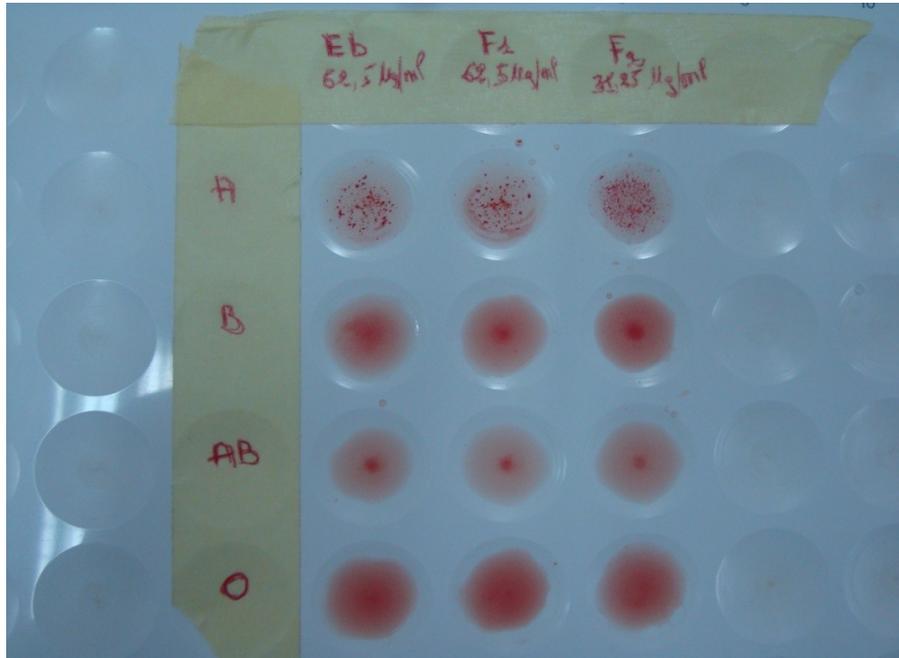


Photo 6: Agglutination des différents groupes par l'extrait brut (Eb) et la fraction 1 dosés à 62,5µg/ml et de la fraction 2 dosée à 31,25µg/ml après 30 minutes d'incubation.

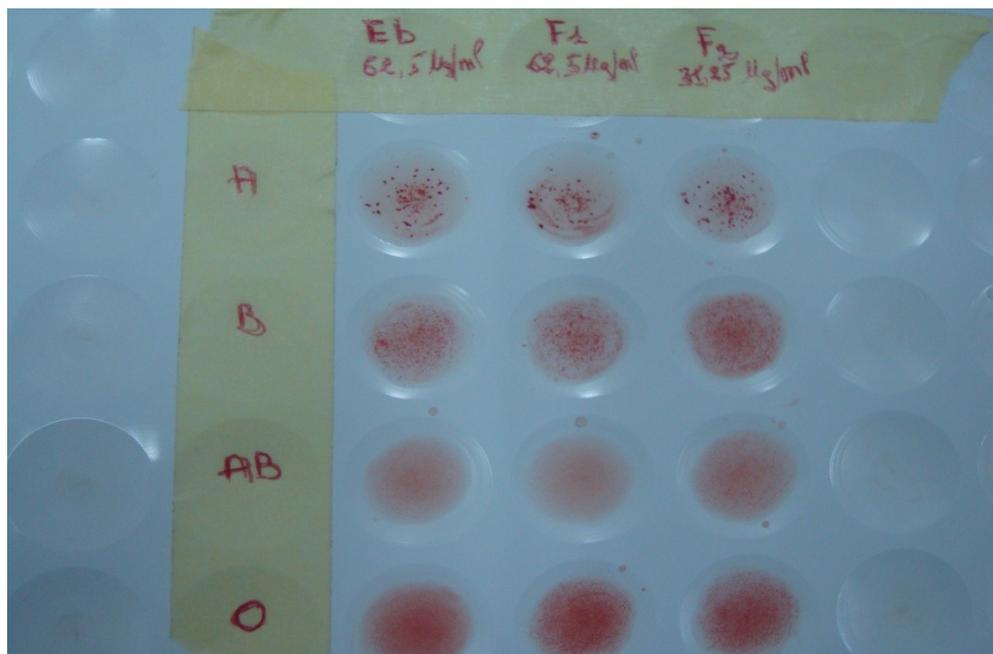


Photo 7 : Activité des lectines anti-A1 ; anti-H et des anticorps monoclonaux à anti-A ; anti-B ; anti-AB sur les groupes sanguins A, B, AB et O.

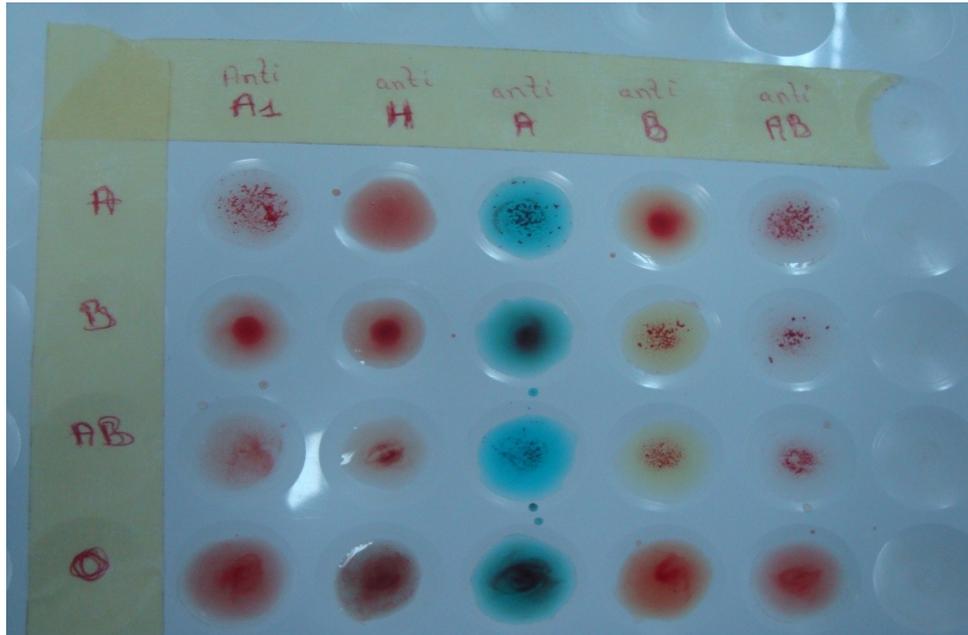


Photo 8 : Activité des lectines anti-A1, anti-H et l'extrait brut (Eb) et la fraction 1 dosés à 62,5 μ g/ml et de la fraction 2 dosée à 31,25 μ g/ml.

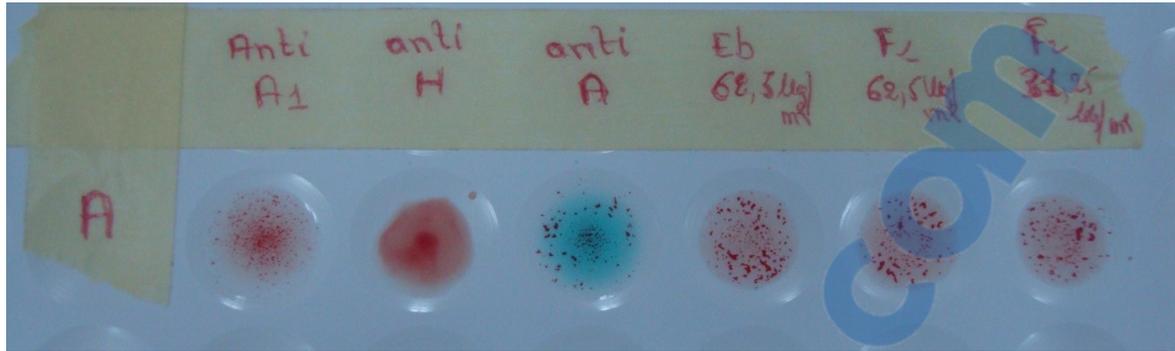


Photo 9 : Activité de l'extrait brut non purifié sur le groupe A en une minute d'incubation.



Fiche Signalétique:

Nom :

Ramata

Prénom : NADIO
Titre de la Thèse : Etude de l'activité Hémagglutinante des lectines isolées de la graine d'*Abrus precatorius*
Année : 2009-2010
Ville de soutenance : Bamako
Pays d'origine : Mali
Lieu de dépôt : Bibliothèque Faculté de médecine, de Pharmacie et d'ontostomalogie
Secteur d'intérêt : Immunologie, Hématologie, Phytochimie

RESUME :

Abrus precatorius est une liane de la famille des légumineuses très répandue dans les régions tropicales comme le Mali. Les lectines extraites de ces graines ont donné une forte sélectivité et activités hémagglutinante sur les hématies du groupe A.

La purification par filtration sur gel suivit de la dialyse a efficacement amélioré la qualité de nos extraits. Ce qui fait que la dernière fraction purifiée a été active a une concentration proche de celle de *Dolichos biflorus*.

Sur 100 échantillons d'hématies choisie au hasard, ont été opérés des tests avec nos trois extraits ; les anticorps monoclonaux Anti-A ; Anti-B ; Anti AB et les lectines du *Dolichos biflorus* (Anti-A1) et *Ulex europaeus* (Anti-A2). Ces tests nous ont permis de constater que les extraits de *Abrus precatorius* ont les mêmes pouvoirs et degré d'activité que les anticorps monoclonaux avec les mêmes durées d'incubations de 2 minutes. Lorsqu'on dépasse les 2 minutes d'incubation, les autres hématies ont été agglutinées provoquant ainsi une polyagglutination. Les extraits n'ont montré aucune capacité à distinguer le groupe A en sous groupe A1 et A2 puisqu'ils ont agglutiné les hématies A aux mêmes degrés.

Mots-clés : *Abrus precatorius*, Lectines, Hématies humaines, Hémagglutination, Purification