

50376
1986
217

50376
1986
217

N° d'ordre : 1340

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Edgar ZENTENO-GALINDO



**ETUDES SUR LES LECTINES DU CACTUS
MACHAEROCEREUS ERUCA ET DES GRAINES
D'AMARANTHUS LEUCOCARPUS : CARACTERISATION
PHYSICOCHIMIQUE ET SPECIFICITE**

Exemplaire corrigé après avis du jury

Soutenue le 19 Juin 1986 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :
Rapporteur :
Examineurs :

M. J. MONTREUIL
M. M. MONSIGNY
Mlle G. SPIK
M. G. STRECKER

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur
Henri DEBRAY dans le Laboratoire de Chimie Biologique
(Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université
des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire Associé
au C.N.R.S. No. 217: Relations structure-fonction des
constituants membranaires) .

A la mémoire de ma mère et à la tendresse de mon père,
avec toute mon affection et ma profonde gratitude
A ma soeur Dalia,

A Veronica, Israel et Edgar,
avec tout mon amour

A monsieur le Professeur J. Montreuil,

Vous avez bien voulu m'accepter et m'intégrer dans votre laboratoire. Vous m'avez permis de partager la vie du C-9 et de bénéficier, de votre haute compétence scientifique. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude et mon respectueux attachement.

A monsieur H. Debray,

Votre ardeur au travail et votre dynamisme ont été pour moi un exemple. Croyez en ma sincère reconnaissance et en mon amitié.

A monsieur le Professeur M. Monsigny,

Vous me faites l'honneur de bien vouloir être rapporteur de cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A mademoiselle G. Spik,

Je suis honorée de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

A monsieur G. Strecker,

Je vous remercie vivement ainsi que tout votre groupe pour votre importante collaboration à la réalisation de cet travail. Je suis heureux que vous ayez bien voulu juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à

Messieurs Miguel Martinez et José Luis Ochoa par leur aportation du matériel biologique utilisé dans cet travail " y sobre todo por su amistad".

Messieurs B. Fournet et S. Bouquelet pour leur amicale et fructueuse collaboration.

Messieurs Y. Leroy et P. Boulanger pour leur précieuse collaboration.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à P. Delannoy et R. Cecchelli pour les conseils et pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée.

Madame Jo Celen pour tous les travaux de relieure et à Mademoiselle L. Loustalot pour sa coloboration dans la préparation de ce mémoire.

La réalisation de cet travail a été possible grâce à la bourse otorgé par le Conseil National de Sciences et Technologies (CONACyT) et le Comité d'études sur la formation d'Ingenieurs (CEFI) dans le cadre du Programme GEIF-8 México-Francia

A tous ceux qui m'ont accordé leur collaboration, leur aide et leur amitié.

INTRODUCTION	p	1
I GENERALITES		5
Historique		6
Definition des lectines		8
Spécificité des lectines		11
a) Spécificité sérologique		11
b) Spécificité chimique		14
Activité mitogène		28
Agglutination des cellules tumorales		34
Rôle biologique des lectines		37
Application des lectines		46
Purification des lectines		57
TRAVAUX PERSONNELS		66
II PURIFICATION ET CARACTERISATION DES LECTINES DE <u>Machaerocereus eruca.</u>		66
1. Préparation des lectines de <u>Machaerocereus eruca</u>		67
A Matériel		67
B Extraction de la lectine		67
2. Purification de la lectine		67
- Précipitation au sulfate d'ammonium		67
- Chromatographie d'affinité sur mucine- sépharose		68
- Chromatographie d'interaction hydrophobe		69
- Chromatographie d'affinité sur colonne de stromas d'hématies de lapin		69
a) Préparation des membranes d'hématies		69
b) Préparation de la colonne		71
c) Purification des lectines		71

3.	Méthodes d'analyse	73
a	Méthodes immunologiques	73
-	immunodiffusion	73
-	immunoélectrophorèse sur gélose	73
b	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	74
4.	Caractérisation physicochimique	75
a	Dosage des protéines	75
b	Dosage des sucres	75
c	Détermination des rapports molaires de sucres	76
d	Composition en acides aminés	78
e	Détermination de la masse moléculaire	78
f	Détermination du point isoélectrique	78
5.	Activité hémagglutinante	80
III	RESULTATS ET DISCUSSION	82
1	Extraction de la lectine	83
2	Activité hémagglutinante	83
3	Purification des lectines de <i>Machaerocereus eruca</i> par chromatographie d'affinité	86
4	Méthodes d'analyse	88
5	Conclusions	96
6	Purification des lectines de <i>Machaerocereus eruca</i> par chromatographie hydrophobe	99
7	Caractérisation physicochimique	101
8	Conclusions	109
IV	PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DES LECTINES F I ET F II DE <u>Machaerocereus eruca</u>	112
1	Introduction	113
A	Stabilité thermique	113

B	Stabilité à différents pH	113
C	Effet des ions sur l'activité agglutinante	113
D	Effet de la concentration en NaCl	114
E	Effet des agents dénaturants	114
2	Résultats et discussion	115
3	Conclusion	122
V	SPECIFICITE DES LECTINES F I ET F II DE <u>Machaerocereus eruca</u>	124
A	Préparation des glycanes et glycosylpeptides des glycosylprotéines	125
1.	Matériels	125
2.	Méthodes de purification	125
-	Purification des glycanes de la fêtuine	126
-	Purification des glycanes des hématies	127
-	Purification des glycanes de mucine d'estomac de porc	127
3.	Résultats et discussion sur la préparation des glycanes	130
B	Spécificité des lectines	143
1.	Matériels	143
2.	Inhibition de l'activité hémagglutinante	143
3.	Résultats et discussion	147
4.	Conclusions	
VI	PURIFICATION DES LECTINES D' <u>Amaranthus leucocarpus</u>	153
1.	Préparation de l'extrait de <u>Amaranthus leucocarpus</u>	154
2.	Purification de la lectine	154
3.	Caractérisation chimique de la lectine	155

a	Dosage de protéines	155
b	Dosage de sucres	155
c	Détermination des rapports molaires en sucres	155
d	Contrôle de l'homogénéité des fractions	155
e	point isoélectrique	155
4.	Activité hemagglutinante	156
5.	Spécificité des lectines	156
7.	Résultats et discussion	157
a	Extraction de la lectine	157
b	Activité hémagglutinante	157
c	Purification de la lectine	157
d	Caracterisation chimique de la lectine	159
e	Spécificité des lectines	162
f	Propriétés physicochimiques des lectines	171
8.	Conclusions	171
VII	CONCLUSIONS GENERALES	175

I N T R O D U C T I O N

Les lectines, protéines ou glycoprotéines qui réagissent et se lient aux glycoconjugués des surfaces cellulaires et qui, dans certains cas provoquent l'agglutination des cellules, se retrouvent dans pratiquement tous les organismes vivants. Les lectines les plus familières et les mieux caractérisées du point de vue de la structure chimique et des propriétés de reconnaissance des sucres sont celles extraites de plantes, connues aussi sous le nom de phytoagglutinines, phytohémagglutinines ou hémagglutinines. Les lectines des plantes ont été étudiées exhaustivement du fait de la grande variété de leurs activités biologiques et chimiques; elles sont utilisées comme réactifs biologiques en biologie cellulaire, moléculaire et pour le diagnostic clinique.

En particulier, elles sont d'une grande utilité dans l'étude des substances à activité de groupe sanguin, la détermination des groupes sanguins et l'étude des mécanismes de la réponse immune agissant de manière spécifique sur les cellules impliquées dans la réponse à médiation cellulaire, la phagocytose, et provoquant la transformation blastique des lymphocytes.

Mais si toutes ces propriétés ont provoqué un grand intérêt pour

ces protéines, l'observation de la capacité de certaines lectines de reconnaître de façon spécifique les cellules tumorales en font des outils précieux pour identifier les changements de l'architecture de la surface des cellules ayant subies une transformation maligne et pour étudier les modifications des structures glycaniques de la surface des cellules soumises à un processus de différenciation.

Généralement l'étude des lectines peut être divisée en deux parties principales:

- a) la caractérisation des propriétés chimiques et biochimiques de ces protéines in vitro,
- b) l'étude des fonctions biologiques in vivo.

Notre travail a consisté à identifier de nouvelles lectines au niveau de deux espèces végétales représentatives de la flore mexicaine typique: les cactus et les amaranthacées. Nous avons pris comme exemple le cactus Machaerocereus eruca et les graines de Amaranthus leucocarpus (sin. hypocondriacus). Nous avons effectué leur caractérisation chimique, et étudié leur spécificité vis à vis de structures glycaniques.

Cette étude est réalisée dans un double but:

- l'identification de nouvelles sources de lectines,
- l'utilisation potentielle de ces produits comme réactifs biologiques qui permettrait l'exploitation de ces végétaux qui jusqu'à

maintenant, n'ont été utilisés que comme éléments décoratifs et qui représentent l'espèce la plus abondante de la flore désertique ou dans le cas des graines d'Amaranthus leucocarpus, qui malgré leur potentiel nutritif ne sont utilisées que pour la confection de certains gateaux mexicains typiques.

Nous décrirons successivement les travaux réalisés pour identifier des lectines dans certaines variétés de cactus les études effectuées sur la lectine du Machaerocereus eruca, sa purification, sa caractérisation physico-chimique, l'étude de la spécificité de cette lectine ainsi que l'isolement, la caractérisation physicochimique et la spécificité de la lectine d'Amaranthus leucocarpus.

Nous avons fait précéder l'exposé de nos travaux par un chapitre de généralités où sont résumées les connaissances actuelles sur les lectines: leur histoire, leur définition, leur spécificité, leur activité biologique, les méthodes de reconnaissance et de purification, leur rôle biologique dans les plantes, etc.

Notre travail sur les lectines a fait l'objet des publications suivantes:

- STUDIES ON THE SUGAR SPECIFICITY OF Machaerocereus eruca ISOLECTINS In: Lectins, Biology-Biochemistry-Clinical Chemistry, Vol 5, T. C. Bog-Hansen and E. Van Driessche (eds.), de Gruyter, Ber-

lin, 1986, p. 147-154.

- ISOLATION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF TWO LECTINS FROM Machaerocereus eruca.

En préparation.

I G E N E R A L I T E S

HISTORIQUE.

C'est en 1888 que H. Stillmark travaillant alors sur l'étude de certaines graines qui empoisonnaient le bétail, montra que les extraits d'huile de Ricinus communis étaient capables d'agglutiner les globules rouges de certains animaux (Stillmark, 1888). Ces observations ont été confirmées quelques années plus tard quand R. Kobert relata également ce type d'activité dans les extraits d'autres plantes fortement toxiques, Croton tiglium et Abrus precatorius, (Kobert, 1906). A cette époque, Paul Ehrlich avait montré que la ricine (nom donné à l'extrait de Ricinus communis) n'était pas seulement toxique et capable d'agglutiner les hématies, mais était aussi un très bon antigène et, pour cette raison, il l'utilisait comme modèle dans son travail fondamental sur la tolérance immunitaire (Ehrlich, 1902).

Dans un premier temps, on considérait que l'activité toxique de ces plantes était le résultat de l'activité hémagglutinante mais Karl Landstainer mit en évidence que les deux activités pouvaient être portées par des substances différentes. En effet, il caractérisa la présence d'une activité agglutinante dans les extraits

d'autres plantes non toxiques. (Landstainer et Raubitscheck, 1908)

Dès leur découverte, ces substances ont trouvé une application comme modèle d'étude de la réponse immunitaire. En effet, leur préparation posait relativement moins de difficultés que celle des toxines bactériennes utilisées dans un but similaire. Cependant au fur et à mesure de la mise au point des techniques de préparation de ces toxines bactériennes, l'étude et l'utilisation des agglutinines végétales tombaient en désuétude et ceci malgré les observations initiales de Stillmark sur la propriété de l'extrait de Ricinus d'agglutiner de manière sélective les globules rouges de certaines espèces animales. (Stillmark, 1888).

Après la découverte de la ricine, plusieurs extraits de plantes ont été testés afin d'y rechercher une activité hémagglutinante. La première agglutinine purifiée a été la Concanavaline A (Con A), isolée d'une légumineuse: Cannavalia ensiformis, et cristallisée par Sumner en 1919 (Sumner, 1919). Sumner et Howell (1936) ont également observé que la Con A était capable de réagir avec le glycogène. Cette observation fut la première montrant que l'hémagglutination pouvait être la conséquence d'une interaction avec les sucres présents sur la surface cellulaire.

Cette propriété hémagglutinante fut par la suite caractérisée dans différentes autres graines telles que la lentille, Lens culinaris et le haricot rouge, Phaseolus vulgaris (Rigas et al; 1955). En

1948, les agglutinines trouvèrent une application scientifique et commerciale dans le domaine biomédical avec la découverte d'extraits possédant une spécificité de groupe sanguin humain (Renkonen, 1948). En effet, il fut montré que des extraits de haricots de lima, Phaseolus limmensis et de fève; Vicia cracca, étaient capables de reconnaître et d'agglutiner de façon spécifique les globules rouges des individus de groupe sanguin A, alors que les cellules des individus de groupe B ou O (H) n'étaient pas agglutinées. Les extraits de Cytisus sessifolius, Laburnum alpinum et Lotus tetragonobulus, par contre, étaient capables de reconnaître préférentiellement les globules rouges de groupe O plutôt que les groupes B ou A (Sharon et Lis, 1972).

Ces découvertes, indiquant une spécificité relativement étroite des agglutinines, ont relancé l'intérêt pour ces substances et le terme d'hémagglutinine ou plutôt phytohémagglutinine, qui les désignait a été remplacé par le terme de lectine (du Latin "legere": élire ou choisir), proposé par Boyd et Sharpleigh (1954).

DEFINITION DES LECTINES

En général, la définition des lectines avait considéré ces molécules comme exclusives du Règne Végétal, d'où leur nom de phytoagglutinines, phytohémagglutinines ou agglutinines (Lis et Sharon, 1973). Cependant, la mise en évidence de ce type de macromolécules

de nature protéinique dans d'autres organismes vivants: bactéries (Neter, 1956; Gilboa-Garber, 1972); animaux vertébrés (Prokop et al, 1967; Stockert, 1974) et invertébrés (Prokop et al, 1965; - - Hammarstrom et Kabat, 1965), possédant la propriété de réagir de façon spécifique avec des résidus oligosaccharidiques nécessita l'élaboration d'une définition qui excluait dans cette catégorie d'autres substances, également capables de réagir avec des oligosaccharides. En 1980, (Goldstein et al, 1980), les lectines ont été définies comme "des protéines ou glycoprotéines qui ne sont pas synthétisées par le système immunitaire, capables de réagir -- avec les sucres sans les modifier et de plus, capables d'aggluti-- ner des cellules et de précipiter les glycoconjugués". Cette définition a été adoptée en 1981 par le Comité International de Nomenclature en Biochimie (Nomenclature Committee of I.U.B. and I.U.B.- I.U.P.A.C., Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1981).

Dans cette définition sont été éliminées toutes les protéines capables aussi de réagir avec les sucres telles que les enzymes, les substances de transport, les hormones, les toxines et les immunoglobulines. D'autres propriétés biologiques des lectines sont résumées dans le tableau No: 1. Il est important de remarquer que la quasi totalité de ces activités ont comme dénominateur commun la reconnaissance d'un récepteur oligosaccharidique qui, comme nous le verrons plus tard, déclenche différents processus biologiques.

T A B L E A U I

EFFETS BIOLOGIQUES DES LECTINES ⁺

1. AGGLUTINATION DES GLOBULES ROUGES ET AUTRES TYPES DE CELLULES
 2. STIMULATION MITOGENIQUE DES LYMPHOCYTES
 3. INHIBITION DES PHAGOCYTOSES
 4. EFFETS IMMUNOSUPPRESSEURS
 5. TOXICITE
 6. INHIBITION DE LA CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES
 7. INHIBITION DE LA MIGRATION DES CELLULES TUMORALES
 8. INDUCTION DE LA SECRETION D'INSULINE PAR LES CELLULES PANCREATIQUES
 9. EFFETS SIMILAIRES A L'INSULINE DANS LES ADIPOCYTES
 10. INHIBITION DE LA CROISSANCE DE CHAMPIGNONS.
-



⁺ Lis et Sharon, 1977;

SPECIFICITE DES LECTINES

A. SPECIFICITE SEROLOGIQUE.

Après l'observation faite par Stillmark (1888) de l'activité agglutinante de la ricine vis à vis de globules rouges de plusieurs espèces animales, confirmée plus tard par Landstainer et Raubishek (1908), la recherche de lectines capables d'agglutiner un seul groupe sanguin, donc sérologiquement spécifique, était initiée. Cette étude a permis de réunir des informations sur l'activité agglutinante de quelques centaines (ou plutôt milliers) d'extraits de plantes de plusieurs genres, espèces et variétés. En général, les lectines trouvées ne sont pas sérologiquement spécifiques car elles agglutinent les hématies humaines sans distinction de groupe, et dans certain cas, sont capables de réagir et de précipiter des substances solubles possédant une activité de groupe sanguin (telles que les antigènes de sécrétion) (Mäkela, 1957; Tobiska, 1964; Bird, 1959; Boyd, 1963; Sharon et Lis, 1972).

Certaines lectines, cependant, présentent une spécificité pour les hématies du groupe A ou O (H), mais il existe peu d'exemples connus de lectines capables de réagir d'une façon spécifique avec les hématies du groupe B, mise à part la lectine de Bandereia sim-

plicifolia, capable de reconnaître les groupes A et B. Dans ce cas particulier, le fait que les hématies du groupe B soient agglutinées plus fortement (Murphy et Goldstein, 1977) a permis de montrer qu'il s'agissait d'un mélange de deux isolectines ayant chacune une spécificité dirigée vers un groupe sanguin (Bird, 1959). Généralement, les lectines possédant une spécificité de groupe sanguin reconnaissent le ou les sucres qui forment la partie active du déterminant antigénique du groupe sanguin (Watkins et Morgan, 1952). Par exemple, les lectines spécifiques du groupe sanguin A réagissent avec la N-acétyl-D-galactosamine et ses dérivés glycosidiques alors que les lectines spécifiques du groupe sanguin O (H) réagissent préférentiellement avec le L-fucose (Goldstein et Hayes, 1978; Sharon et Lis, 1972). Bien que de nombreuses lectines isolées n'aient pas de spécificité sérologique, la plupart possède une spécificité pour des résidus monosaccharidiques (Mäkelä, 1957; Tobiska, 1964). Dans ce cas, on parle de spécificité chimique et, comme nous verrons dans le chapitre suivant, les lectines sont capables de reconnaître d'autres structures contenant le résidu de sucre qui leur est spécifique.

Les exemples les plus connus sont ceux de la lectine de soja (Lis et al, 1970), de la ConA (Goldstein et So, 1965; So et Goldstein, 1968; Goldstein, 1976) et de la lectine de lentille (Debray et al, 1981; Kornfeld et al, 1981); ces lectines sont capables de reconnaître des structures bien déterminées mais sont également capables de reconnaître les hématies humaines sans distinction de groupe. La complexité exis-

tant entre la spécificité sérologique des lectines et la nature chimique de leurs récepteurs cellulaires est encore plus évidente quand les hématies sont soumises à l'action des enzymes protéolytiques telles que la pronase, la trypsine ou la papaïne (Makela, 1957; Pardoe et al, 1970). Dans le cas de la lectine de soja, par exemple, les hématies traitées avec des enzymes protéolytiques sont agglutinées par des concentrations 200 fois plus faibles en lectine que les hématies non traitées (Lis et al, 1970).

Ce phénomène pourrait s'expliquer par le démasquage de certains sites récepteurs de la lectine sous l'effet du traitement protéolytique. D'autres exemples ont été publiés (Gordon, 1972; Inbar et Sachs, 1969; Sela et al, 1970), mais certaines expériences effectuées à l'aide de lectines radioactives montrent que les cellules natives et les cellules traitées par les enzymes protéolytiques possèdent environ le même nombre de sites récepteurs pour ces lectines (Inbar, 1971; Ozanne et Sambrook, 1971). Pour cette raison, on considère actuellement que l'augmentation de l'agglutinabilité cellulaire est provoquée par des modifications dans la distribution topographique des récepteurs à la surface cellulaire et par des modifications de la fluidité de la membrane qui permettent le regroupement des récepteurs à l'un des pôles de la cellule (connu sous le nom de phénomène de polarisation des récepteurs) (Nicolson, 1971). D'autre part, les observations publiées par Krüpe (1954) et Mäkela (1957) sur des lectines ayant besoin de certains additifs (comme l'albumine ou le polyéthylène-glycol) pour réussir

à provoquer l'agglutination, ont été expliquées plus tard par Pollack et Heckel (1977), qui ont montré que ces additifs neutralisent en partie la charge électrique de la surface cellulaire qui empêche le rapprochement des cellules du fait des répulsions électrostatiques.

Certaines lectines ne sont actives qu'en présence d'ions métalliques agissant comme cofacteurs, et qui provoquent la mise en conformation du site récepteur de la lectine (Hardmann, 1979; Kalb et Levitzki, 1968). Dans le tableau II sont présentés quelques exemples de lectines possédant une spécificité sérologique.

B. SPECIFICITE CHIMIQUE: SPECIFICITE DES LECTINES POUR LES SUCRES.

Les observations faites sur la Con A, capable de précipiter le glyco-gène en solution et dont l'activité hémagglutinante est aussi inhibée par ce sucre (Sumner et Howell, 1936) avaient suggéré que l'interaction des lectines avec les hématies se faisait par la reconnaissance des résidus saccharidiques de la membrane érythrocytaire. L'inhibition des lectines par des sucres simples fut décrite pour la première fois par Watkins et Morgan (1952). Leurs observations ont été confirmées plus tard par Krüpe (1956) qui étudiait les effets de 23 oligosaccharides de faible masse moléculaire sur l'action des lectines et qui montra qu'un certain nombre de lectines possédant une spécificité sérologique présentait également

T A B L E A U II

LECTINES POSSEDANT UNE SPECIFICITE SEROLOGIQUE

LECTINE	ANTIGENE DE GROUPE SANGUIN HUMAIN
<i>Phaseolus limensis</i>	A
<i>Phaseolus lunatus</i>	A
<i>Vicia peregrina</i>	A
<i>Vicia cracca</i>	A
<i>Vicia villosa</i>	A ₁
<i>Dolichos biflorus</i>	A ₁ /A ₂
<i>Crotalaria fulcata</i>	A
<i>Crotalaria aegyptiaca</i>	A
<i>Lathyrus sylvestris</i>	A
<i>Hyptis suaveolens</i>	A
<i>Clitocybe nebularis</i>	A
<i>Sophora japonica</i>	A+B
<i>Coronilla varia</i>	A+B
<i>Calpurina aurea</i>	A+B
<i>Crotalaria usaraemensis</i>	A+B
<i>Crotalaria striata</i>	A+B
<i>Bandereia simplicifolia</i>	A+B
<i>Caragena frutex</i> var. <i>latifolia</i>	B
<i>Bandereia simplicifolia</i>	B
<i>Marasmus oriades</i>	B



T A B L E A U II

LECTINES POSSEDANT UNE SPECIFICITE SEROLOGIQUE (suite)

LECTINE	ANTIGENE DE GROUPE SANGUIN HUMAIN
---------	--------------------------------------

<i>Polyporus fomentarius</i>	B
<i>Cytissus sessilifolius</i>	H
<i>Laburnum alpinum</i>	H
<i>Lotus tetragonobulus</i>	H
<i>Tetragonobulus purpureus</i>	H
<i>Ulex europeus</i>	H
<i>Ononis spinosa</i>	H
<i>Xylaria polymorpha</i>	M
<i>Vicia graminea</i>	N
<i>Bauhinia purpurea</i>	T
<i>Arachis hypogaea</i>	T



une spécificité pour des sucres simples, alors que pour des lectines non sérologiquement spécifiques, la spécificité pour des sucres était moins étroite, c'est à dire qu'il existait plus d'un sucre capable de s'associer avec ces lectines.

Dans l'intéressant travail publié par Mäkela (1957) qui étudiait la spécificité sérologique de 52 lectines de légumineuses, l'utilisation de différents sucres dans le but d'inhiber l'activité agglutinante vis à vis d'hématies humaines et de différentes espèces animales, permit de montrer qu'en général, les lectines reconnaissent les sucres en configuration pyranique, et il a proposé une classification de ces aldopyranoses en quatre groupes d'inhibiteurs en fonction de la configuration des carbones 3 et 4 (figure 1). Sur la base de cette classification à l'exception du groupe IV dans lequel le D-idose, le D-gulose et le L-xylose et pour lequel aucune lectine n'a été caractérisée, quelques exemples ont été donnés: la lectine de Lotus tetragonobulus (Morgan et Watkins, 1953) et Ulex europaeus (Matsumoto et Osawa, 1971) sont inhibés pour les sucres du groupe I (L-fucose); les lectines de Sophora japonica (Krüpe, - 1956), Ricinus communis (Krüpe, 1956; Nicolson et Blaustein, 1972) et Bandereia simplicifolia I (Goldstein et Hayes, 1978) sont inhibées par les sucres du groupe II, et les sucres du groupe III inhibent les lectines spécifiques du mannose et du glucose comme Lens culinaris (Young et al, 1972) ou Pisum sativum (Mäkela, 1959). Cependant, l'utilisation de cette classification reste limitée du fait de l'existence de certaines lectines ne présentant pas de spé-

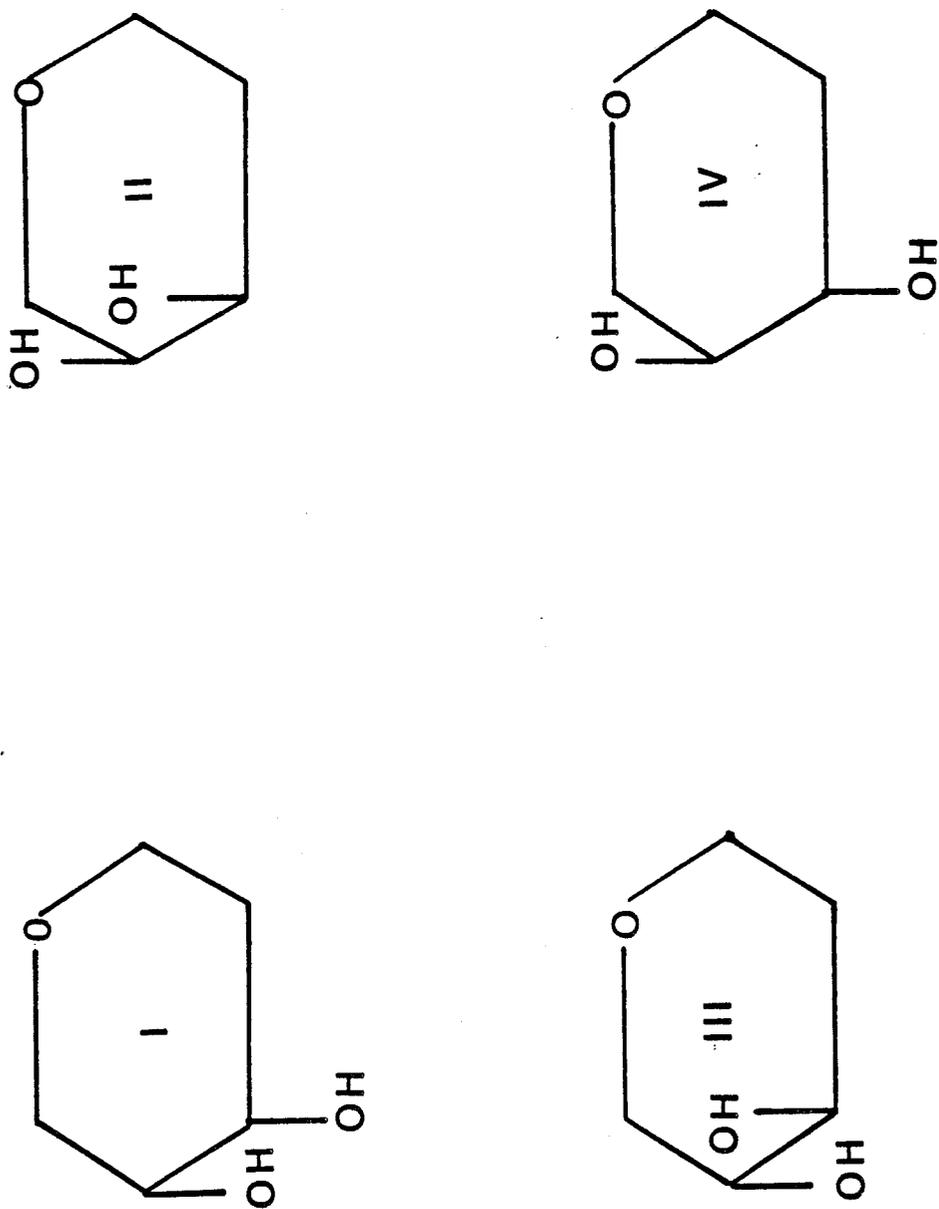


FIGURE 1

CLASSIFICATION DES ALDOPYRANOSSES POSSEDANT UNE ACTIVITE INHIBITRICE
DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE DES LECTINES

cificité vis à vis de sucres simples (lectines considérées comme non-spécifiques par Mäkela, 1957) ou encore ayant plus d'affinité pour des résidus di-ou-trisaccharidiques que pour les alkylglycosides, ce qui semble indiquer que les sucres en position terminale non réductrice pouvaient contribuer uniquement à lier la lectine sur un complexe de sucres (Shankar et al, 1976) comme dans le cas de la lectine de cacahuète (Pereira et al, 1974).

Comme nous l'avons préalablement mentionné, les lectines reconnaissent les sucres dans la configuration pyranique, mais, de plus certaines lectines ont une spécificité configurationnelle et pour des structures bien définies. Par exemple, au niveau du carbone 1, la Con A ou la lectine de Lens culinaris ont une spécificité très importante vis à vis des sucres en configuration anomérique et sont capables de reconnaître les α mannosides.

Inversement, d'autres lectines comme Helix pomatia, sont capables de reconnaître les formes anomériques α ou β (Sikder et al, 1983; Gallagher, 1984) avec pratiquement la même affinité. Certaines lectines comme la Con A sont capables de reconnaître de petites variations au niveau du carbone 2; en effet, la glucose est un inhibiteur plus faible par rapport au mannose qui inhibe l'activité de la lectine à des concentrations 20 fois plus faibles que le glucose (Loontjens et al, 1975). Comme l'avait remarqué Mäkela (1957), de nombreux exemples indiquent que les lectines reconnaissent des variations structurales au niveau des carbones 3 et 4, ce qui permet d'avoir des lectines spécifiques du galactose et de la N-acétyl-

D-galactosamine ou du glucose et de la N-acétyl-D-glucosamine. Dans d'autres cas, la présence d'un groupement acétamido au niveau du carbone 2 joue un rôle important dans le mécanisme de reconnaissance. C'est en particulier le cas de la lectine de soja (spécifique de la N-acétyl-D-galactosamine) et de la lectine de germe de blé (**spécifique** des résidus de N-acétyl-D-glucosamine comme le N-acétyl-chitobiose). Il existe également un petit groupe de lectines (par exemple Ulex europeus I et l'agglutinine du sérum d'anguille) qui présente une grande spécificité pour un sucre de conformation L (L-fucose) et qui ne sont pas inhibées par son énantiomère de conformation D (Springer et al, 1964; Pereira et Kabat, 1974) ou ses méthylglycosides.

Le meilleur exemple de lectines capables d'interagir avec l'acide sialique est celui de la lectine de l'hémolymphe de Limulus polyphemus qui reconnaît préférentiellement le dérivé glycolyl de l'acide sialique. Apparemment, la région acyclique de la molécule n'a aucune influence dans l'interaction avec la lectine (Maget-Dana et al, 1981), dans certains cas, comme pour la lectine du germe de blé (Gallagher et al, 1983; MonSIGNY et al, 1980) le groupement N-acétylneuraminique permet l'interaction de cette lectine avec des structures plus complexes renfermant ces résidus d'acide sialique. Des expériences d'inhibition d'hémagglutination ont permis également de mettre en évidence que l'interaction des lectines avec des glycoconjugués est dirigée vers des séquences très spécifiques que l'on trouve dans des chaînes oligosaccharidiques relativement complexes (Debray et al, 1979; 1981;

1983; Kornfeld et al, 1981; Gallagher, 1984).

Le tableau III regroupe, à titre d'exemple un certain nombre de lectines possédant à la fois une affinité pour des sucres simples et pour des structures oligosaccharidiques. Ce dernier type d'interaction peut être le fait de deux mécanismes distincts: soit, dans le cas le plus simple, la lectine ne reconnaît que l'un des constituants monosaccharidiques de la chaîne; soit, pour un deuxième type de mécanisme, elle interagit simultanément avec plusieurs monosaccharides organisés dans une séquence parfaitement déterminée. Dans le premier cas, l'inhibition de l'activité de la lectine, peut être obtenue avec de faibles concentrations en sucres simples (Con A, Lens, cacahuete) mais dans le deuxième mécanisme, l'inhibition de l'activité n'est possible qu'en présence de fortes concentrations en sucres simples ou d'une façon effective, en utilisant des chaînes oligosaccharidiques. L'un des meilleurs exemples est celui de la phytohémagglutinine de haricot rouge (Phaseolus vulgaris), (Borberg et al, 1966; Kornfeld et Kornfeld, 1969; 1970; Hammarstrom et al, 1982; Serafini-Cessi et al, 1979). En général (figure 2), l'étude de la spécificité des lectines se fait en mesurant la capacité des monosaccharides ou des alkylglycosides à inhiber l'agglutination provoquée par les lectines.

Apparemment, l'interaction des lectines avec des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides est plus complexe qu'avec des sucres simples, mais ces expériences d'inhibition utilisant des

T A B L E A U III

SPECIFICITE DES LECTINES POUR DES OLIGOSACCHARIDES.

LECTINES	OLIGOSACCHARIDES	REFERENCE
<i>Arachys hypogaea</i>	D-Gal β 1, 3 D-GalNac \rightarrow D-GalNH ₂ = α -D-Galp	Dahr et al, 1979
<i>Ricinus communis</i> I	β D-Galp \rightarrow α -D-Galp = Gal β 1, 4 GlcNac	Adair et Kornfeld, 1974
<i>Aplysia</i> sp.	D-Galp	Gilboa-Garber et al, 1984
<i>Actinomyces viscosus</i>	D-Galp	Heeb et al, 1985
<i>Cytisus scoparius</i>	D-Galp	Young et al, 1984
<i>Abrus precatorius</i>	β D-Galp \rightarrow β D-Galp	Olsnes et al, 1974
<i>Maackia amurensis</i> L	β Gal 1, 4 GlcNac β 1, 2 Man	Kagwagachi et al, 1974
<i>Geodia cydonium</i>	D-Gal β 1, 3 GlcNac = D-Gal β 1, 4 D-Gal	Bretting et al, 1981
<i>Maclura pommifera</i>	D-Galp, D-GalNac	Cawley et al, 1967
<i>Crotalaria juncea</i>	D-Galp	Ersson et al, 1973
<i>Bandereia simplicifolia</i> I	α D-Galp \rightarrow α -D-GalNac = GalNac α 1, 3 D-Gal	Shankar et al, 1976
<i>Dictyostelium discoideum</i>	D-Galp	Rosen et al, 1973

T A B L E A U III

SPECIFICITE DES LECTINES POUR DES OLIGOSACHARIDES (suite)

LECTINES	OLIGOSACCHARIDES	REFERENCE
Clerodendrum trichotomum	D-GalNacp	Kitagachi <u>et al</u> , 1985
Phosphocarpus tetraglonobulus A	D-GalNacp	Kort,1985
Phosphocarpus tetraglonobulus B	D-GalNacp	Higuchi et Igwai, 1985
Glycine max	α -D- GalNac \gg β -D-GalNac \gg α -D-Galp	Etzler et Kabat, 1970
Helix pomatia	α -D-GalNacp $>$ β -D-GalNacp	Hammarström,1972
Phaseolus limensis	α -D-GalNacp $>$ α -D-Galp	Galbraith et Goldstein,1972
Dolichos biflorus	D-GalNac α 1,3 Gal (α Fuc 1,2) β 1,4GlcNac	Etzler et Kabat,1970
Vicia villosa	-D-GalNacp $>$ -D-Galp $<$ (GalNac α 1,3 Gal)	Goldstein et Hayes,1978
Vicia cracca	D-GalNacp	Rüdiger,1977
Vicia gramminea	Gal β 1,3 GalNac	Duk et Lisowska,1982
Bauhinia purpurea	Gal β 1,3 GalNac $>$ Gal α 1,6Gal	Wa et al,1980
Aegopodium podagraria	D-GalNac	Peumans <u>et al</u> ,1985



T A B L E A U III



SPECIFICITE DES LECTINES POUR DES OLIGOSACCHARIDES (suite)

LECTINES	OLIGOSACCHARIDES	REFERENCE
<i>Erythrina cristagalli</i>	D-GalNacp	Iglesias <u>et al</u> , 1982
<i>Maclura pommifera</i>	Gal β 1,3 GalNac > GalNac α 1,6 Gal	Sarkar <u>et al</u> , 1981
<i>Maackia amurensis</i> E	Gal β 1,3 (NeuAc α 1,6) GalNac	Kawagachi <u>et al</u> , 1974
<i>Wistaria floribunda</i>	GalNac α 1,6 Gal > α -D-GalNacp	Osawa et Toyoshima, 1972
<i>Agaricus bisporus</i>	Gal β 1,3 GalNac	Presant et Kornfeld, 1971
<i>Sophora japonica</i>	Gal β 1,3 GalNac > β -D-GalNacp > β -D-Galp	Balding et Gold, 1973
<i>Homarus americanus</i>	D-GalNacp	Hall et Rowlands, 1974.
<i>Onobrychis viciifolia</i>	α -D-Man, α -D-Glc	Hapner et Robbins, 1979
<i>Lathyrus ochrus</i>	α -D-Man, α -D-Glc	Debray et Rougé, 1984
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man α 1,2 Man α 1,2 Man α GlcNac β 1,2 Man	Allen <u>et al</u> , 1976
<i>Lens culinaris</i>	Man α 1,6 (Man α 1,3) Man β 1,4 (Fuc α 1,6) GlcNac-Asn	Debray <u>et al</u> , 1981 Kornfeld <u>et al</u> , 1981
<i>Pisum sativum</i>	α -D-Man > α -D-Glcp	Allen <u>et al</u> , 1976

T A B L E A U III

SPECIFICITE DES LECTINES POUR DES OLIGOSACCHARIDES (suite)

LECTINES	OLIGOSACCHARIDES	REFERENCE
Vicia faba	α -D-Man \rightarrow α -D-Glcp \rightarrow α -D-GlcNacp	Perera et Frumin, 1966 Ziska, 1976
Vicia cracca	α -D-Man, α -D-Glcp	Mäkela, 1957
Vicia ervilia	α -D-Man, α -D-Glcp	Bird, 1951
Triticum vulgare	β -D-GlcNac1,4 β -D-GlcNac β 1,4 GlcNac \rightarrow β -D-GlcNac 1,4 β -GlcNac	Goldstein <u>et al</u> , 1975 Ebisu <u>et al</u> , 1977, Monsigny <u>et al</u> 1980
Aaptos papillata	D-GlcNacp \rightarrow D-NeuAcP	Goldstein et Hayes, 1978
Bandereia simplicifolia II	β -D-GlcNacp = α -D-GlcNacp	Watkins et Morgan, 1962
Datura stramonium	GlcNac β 1,4(GlcNac β 1,4) ₂ GlcNac \rightarrow GlcNac β 1,4 GlcNac β 1,4 GlcNac	Kilpatrick et Yeoman, 1978.
Phytolacca americana	Man α 1,4 GlcNac β 1,4 GlcNac \rightarrow GlcNac β 1,4(GlcNac β 1,4) ₆ GlcNac	Yokoyama <u>et al</u> , 1976
Solanum tuberosum	-D-GlcNac β 1,4 GlcNac β 1,4(GlcNac β 1,4) ₂ β -D-GlcNac	Allen et Neuberger, 1973
Oryza sativa	-D-GlcNac	Tabary et Frenoy, 1985
Lycopersicum esculentum	-D-GlcNac	Kilpatrick, 1980





SPECIFICITE DES LECTINES POUR DES OLIGOSACCHARIDES (suite)

LECTINES	OLIGOSACCHARIDES	REFERENCE
<i>Cytisus sessilifolius</i>	β -D-GlcNAC 1,4 β D-GlcNAC	Koulumies, 1949
<i>Ulex europeus</i> II	β -D-GlcNAC 1,4 β D-GlcNAC	Matsumoto et Osawa, 1971
<i>Laburnum alpinum</i>	-D-GlcNAC	Osawa, 1966
<i>Ulex europeus</i> I	α L-Fucp, L-Fuc α 1,2 Gal β 1,4 GlcNAC	Osawa et Matsumoto, 1972
<i>Anguilla anguilla</i>	α -L-Fucp, 3-O-Me-D-Fucp, 3-O-Me-D-Galp	Springer et al, 1964
<i>Lotus tetragonobulus</i>	α -L-Fuc 1,2 Gal β 1,4 GlcNAC	Pereira et Sharon, 1974
<i>Cepaea hortensis</i>	NeuAc	Horm et al, 1985
<i>Apholema</i> sp.	NeuAc	Vasta et Cohen, 1984
<i>Limulus polyphemus</i>	NeuAc	Roche et Monsigny, 1974
<i>Homarus americanus</i> I	NeuAc	Hall et Rowlands, 1974

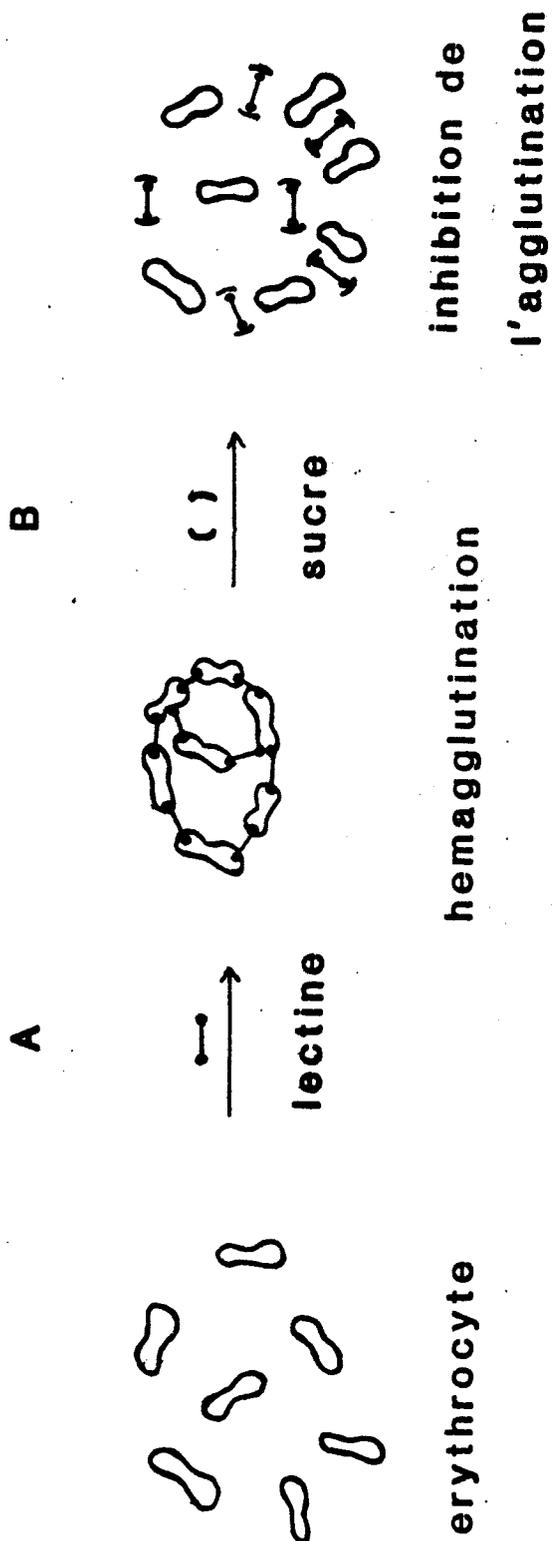


FIGURE 2

- A. MODELE DE L'AGGLUTINATION DES CELLULES PAR LES LECTINES
- B. MODELE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE PAR DES SUCRES



mono ou des oligosaccharides et leurs dérivés, sont applicables à l'étude de l'inhibition par des oligosaccharides plus complexes (Goldstein et Hayes, 1978; Kornfeld et Ferris, 1975; Debray et al 1981).

ACTIVITE MITOGENE

En 1960, P.C. Nowel (Nowel, 1960) caractérisait le pouvoir mitogène de certaines lectines, montrant qu'elles étaient capables d'induire la transformation blastique, de transformer les lymphocytes en lymphoblastes et d'en induire la mitose. Cette propriété a permis de mieux connaître plusieurs mécanismes Biochimiques impliqués dans le processus de transformation d'une cellule en phase de repos en une cellule en croissance. Certaines lectines sont capables de stimuler uniquement les lymphocytes T (dérivant du thymus) et d'autres, les lymphocytes B (dérivant de la moelle osseuse).

Par exemple, les lectines de haricot rouge (Phaseolus vulgaris), la lentille (Lens culinaris) et Con A stimulent les Lymphocytes T et pas les lymphocytes B (Tableau IV). Il est important de noter que bien qu'elles aient des effets différents sur les deux types cellulaires, les lectines se fixent sur les deux types cellulaires qui possèdent pratiquement la même nombre des sites récepteurs (Bauminger et al, 1972), ce qui semblerait signifier que la non-réponse aux effets de la lectine de certaines populations de lympho-

T A B L E A U IV

LECTINES POSSEDANT UNE ACTIVITE MITOGENE

LECTINES	LYMPHOCYTES	
Abrus precatorius	B	T
Canavalia ensiformis		T
Lens culinaris		T
Phaseolus vulgaris		T
Phytolaca americana	B	T
Robinia pseudoacacia	B	T
Glycine max		T
Ulex europeus		T
Phaseolus limensis	B	
Phaseolus coccineus		T
Homarus americanus	B	



cytes est provoquée par d'autres facteurs qui régulent la transformation blastique. En réalité, les lymphocytes B ne peuvent être stimulés que dans certains cas particuliers, lorsque la lectine est adsorbée sur une matrice polysaccharidique telle que le sephadex ou par des formes multimériques de la lectine (Greaves et al, 1972). L'explication de ce phénomène peut venir du fait que la stimulation des cellules B par les lectines nécessite un grand nombre de molécules de lectine réagissant simultanément sur la surface cellulaire du lymphocyte (Lis et al, 1973) . Il existe certaines lectines non mitogènes capables, cependant, de réagir avec les lymphocytes confirmant ainsi l'hypothèse que la transformation blastique n'était pas simplement provoquée par la simple fixation des molécules de lectine sur la membrane cellulaire (Schenebli et Dukor, 1972) .

Plus récemment, Kern et ses collaborateurs (Kern et al, 1985) ont montré que d'autres cellules comme les monocytes ou les macrophages (considérées comme des cellules accessoires) jouent un rôle fondamental dans la prolifération des cellules stimulées par des mitogènes (comme Phaseolus vulgaris) , soit en apportant des substances activatrices (interleukines), soit en stimulant la formation de récepteurs (antigène Ia sur le macrophage) permettant l'interaction lymphocyte-interleukine, et induisant la prolifération cellulaire.

La stimulation induite par les lectines mitogènes peut être inhibée par le ou les sucre(s) spécifique(s) de la lectine (Borberg,

1968; Toyoshima et al, 1971; Greaves et al, 1972). Ceci nous montre que la stimulation est bien le résultat de la liaison entre la lectine et le ou les sucres de la surface cellulaire. Cette hypothèse fut également confirmée en montrant que certaines glycosidases qui modifient la surface lymphocytaire, augmentent de ce fait la réponse cellulaire induite par les lectines. Par exemple, l'agglutinine du soja ne stimule la transformation blastique de lymphocytes de souris que si ceux-ci sont préalablement traités par la neuraminidase (Novogrodski et Kalchalski, 1973) . Le traitement a pour effet d'augmenter le nombre de récepteurs pour cette lectine la lectine du soja étant capable de reconnaître les résidus de galactose démasqués par l'élimination des résidus d'acide sialique, (Lis et al, 1970). Par contre, le traitement de ces cellules désialylées par la β -galactosidase, rend la cellule insensible à l'action mitogène de la lectine, ces cellules pouvant encore être stimulées par d'autres lectines ayant une spécificité différente (Novogrodsky et al , 1975). Le phénomène de la transformation blastique est un processus complexe qui peut être modulé par différents effecteurs comme le schématisé la figure 3. Cependant, le mécanisme exact par lequel les lectines stimulent les lymphocytes demeure encore énigmatique.

Il est maintenant admis que l'internalisation de la lectine avec le récepteur cellulaire est le premier signal qui déclenche plusieurs événements biochimiques au niveau membranaire et qui provoque l'apparition d'un deuxième messager (peut être l'adénosine monophospha-

SYSTEME IMMUNITAIRE

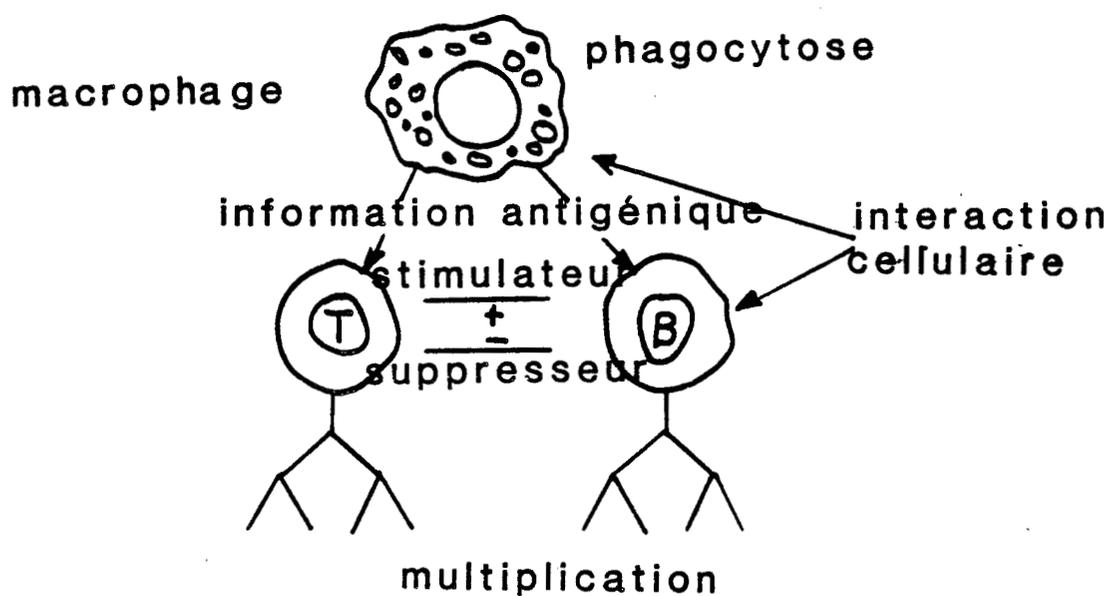


FIGURE 3

MECANISMES DE REGULATION DU SYSTEME IMMUNOLOGIQUE ET DE LA TRANSFORMATION BLASTIQUE DES LYMPHOCYTES.

te cyclique; AMPc) à l'intérieur de la cellule et qui provoque la croissance de la cellule et la prolifération cellulaire (Granges et al, 1975; Lis et Sharon, 1977). L'interaction de la lectine avec la membrane cellulaire n'est pas un phénomène passif.

L'utilisation de lectines conjuguées à la fluorescéine a permis de confirmer les observations faites par Singer et Nicolson sur le modèle de la " mosaïque fluide" de la membrane cellulaire dans lequel la membrane est composée de protéines et de glycoprotéines qui flottent dans une matrice lipidique (Singer, 1971; Singer et Nicolson, 1972). Ces études, utilisant des lectines (et des anticorps) marquées, ont permis de montrer que la membrane cellulaire n'était pas une couche rigide, mais un système dynamique, par exemple l'utilisation de la Con A fluorescente a permis de montrer que dans un premier temps, les récepteurs de la lectine sont répartis sur toute la surface du lymphocyte; après une courte incubation à 37°C, les récepteurs se déplacent sur la surface membranaire pour se regrouper en présentant une distribution plus homogène (patching) et finalement, tous ces récepteurs fusionnent à un des pôles de la cellule (phénomène du capping). Ce mouvement dynamique des récepteurs est dépendant de certains facteurs comme la température, la concentration en lectine, etc. (Sharon et Lis, 1975). D'autre part, tous les lymphocytes ne subissent pas ces processus d'aggrégation des récepteurs. Dans le cas de certains lymphomes testés avec la Con A fluorescente, ce regroupement des récepteurs n'a pas pu être mis en évidence, ce qui montre que la mobilité des récepteurs

de ces cellules est plus faible que dans les lymphocytes normaux (Inbar et Sachs, 1973). Par contre, pour d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes, la mobilité des récepteurs de la Con A est augmentée lors de la transformation maligne (Jacobson et al, 1976; Zagjansky et Edidin, 1976).

AGGLUTINATION DES CELLULES TUMORALES

La découverte remarquable faite par Aub en 1963 et confirmée plus tard par Inbar et Sachs en 1969 qui montrait la plus grande susceptibilité de certaines cellules malignes vis-à-vis de l'agglutination par les lectines, a ouvert une nouvelle voie pour les lectines comme d'outils d'investigation des modifications membranaires associées à la transformation maligne. De nombreuses lectines sont capables d'agglutiner d'une façon préférentielle les cellules en culture qui ont été transformées soit par un virus oncogène ou par des substances carcinogéniques, ainsi que celles qui se sont transformées de façon spontanée (Inbar et al, 1967; Inbar et Sachs, 1969; Sela et al, 1970). Ces observations ont permis de montrer que la surface d'une cellule tumorale était différente de celle des cellules normales du même type (Aub et al, 1963; Burger, 1969). Par exemple, les cellules normales, faiblement reconnues par la lectine de germe de blé, voient leur agglutinabilité augmenter lorsqu'elles sont traitées par des enzymes protéolytiques et cette augmentation est comparable à celle observée pour les cellules transformées. De

plus, il semble que la nature chimique des récepteurs soit la même pour ces deux types de cellules (Aub et al,1963; Burger,1969).

Mais à cette époque une question restait posée: Les cellules tumorales exposent elles un seul type de structures saccharidiques sur leur surface membranaire? la réponse est non. Car on a montré que des lectines avec des spécificités similaires sont capables de réagir avec différents résidus d'un même chaîne oligosaccharidique sur la membrane cellulaire (Burger, 1968; Jansons, 1971). Dans un premier temps, on a vu que la différence entre les cellules capables d'être agglutinées et les cellules qui ne l'étaient pas, était due au nombre de récepteurs, mais il fut prouvé grâce à l'utilisation de lectines radioactives qu'il n'y a aucune corrrélation entre le nombre de molécules de lectine liées et la capacité d'agglutiner les cellules tumorales (Ozanne et Sambrook, 1971; Cline et Livingston, 1971; Inbar et al,1971).

Il est très courant que les cellules transformées comme les cellules normales ainsi que les cellules traitées par des enzymes protéolytiques fixent approximativement le même nombre de molécules de lectines (Agrawal, 1967). En conclusion, on peut dire que l'agglutinabilité des cellules tumorales n'est pas uniquement fonction du nombre de récepteurs, mais aussi de leur distribution, celle ci étant associée à la fluidité de la membrane cellulaire comme nous venons de le mentionner. Dans le tableau V sont regroupés certains facteurs nécessaires ou jouant un rôle dans l'interaction lectine-

T A B L E A U V

FACTEURS QUE AFFECTENT L'AGGLUTINATION CELLULAIRE PROVOQUEE

PAR LES LECTINES ⁺

A. PROPRIETES DES LECTINES.

- nombre des sites de liaison avec de sucres
- force de liaison des sucres
- charge électrique
- taille moléculaire

B. STRUCTURE CHIMIQUE DES RECEPTEURS SUR LA SURFACE CELLULAIRE

C. PROPRIETES DE LA SURFACE CELLULAIRE

- nombre, accessibilité et distribution des sites récepteurs.
- mobilité (fluidité) des sites
- charge électrique
- rigidité de la surface
- architecture de la surface cellulaire (microvillosités)



D. COMPOSANTS CYTOPLASMIQUES

- protéines périphériques de la membrane
 - système microtubules-microfilaments
-

⁺ Nicolson, 1974.

cellule et induisant l'agglutination cellulaire.

ROLE BIOLOGIQUE DES LECTINES

Généralement, les lectines les plus connues et les mieux caractérisées du point de vue de leur structure chimique, et de leurs propriétés biologiques sont les lectines végétales, mais beaucoup d'efforts ont été effectués pour l'identification des lectines dans les bactéries, les animaux invertébrés et vertébrés et plusieurs exemples de substances considérées comme des protéines endogènes capables de se lier à des résidus oligosaccharidiques ont été données (Simpson et al, 1978). En général, les études effectuées sur les lectines membranaires des mammifères par exemple, sont dirigées sur la fonction de reconnaissance cellulaire de ces lectines (Barondes, 1981; Simpson et al, 1978). Mais en considérant que le but de notre travail est orienté vers des lectines d'origine végétale, ce chapitre sera consacré à ce type de substances.

Les lectines se retrouvent dans une grande variété d'espèces végétales dans la quasi-totalité de plantes supérieures qui fleurissent (Allen et Brilliantine, 1969; Toms et Western, 1971), mais on les retrouve également dans un grand nombre de plantes inférieures (Etzler, 1985). Un nombre élevé de plantes et leurs différents tissus ont été testés d'une façon systématique en mesurant leur capacité à agglutiner les globules rouges.

Le fait qu' une lectine soit capable d'agglutiner des cellules signifie d'un point de vue opérationnel que la lectine est au moins divalente, c'est-à-dire qu'elle possède au moins deux sites capables de se lier avec des résidus de sucre et c'est cette propriété qui est utilisée comme base pour la détection et quantification de l'activité des lectines. Mais bien que ces essais d'agglutination soient d'une grande utilité pour identifier les lectines, ils ne permettent pas d'identifier des lectines inactives ou monovalentes. Parfois, ce type de tests peut donner des résultats faussement positifs. Ceci est provoqué par l'action des lipides (Tsevia et Sharon 1981) ou par des tanins ou polyphénols (Mäkela, 1957; Krüpe, 1956), éléments très abondants dans les tissus végétaux.

D'autre part, un test d'agglutination négatif peut signifier que la plante renferme une lectine non détectable, car n'ayant aucune spécificité vis-à-vis des structures glucidiques de la cellule testée. C'est le cas d'une lectine récemment découverte dans les graines de soja, qui a une spécificité pour l'acide 4-O-méthyl glucuronique (Donbrink-Krutzman et al, 1983). Cette lectine a été identifiée dans un test d'agglutination bactérien alors que des essais classiques effectués sur des hématies se soldaient par des résultats négatifs du fait de l'absence de récepteurs pour la lectine sur le globule rouge.

En général, les lectines végétales d'un groupe taxonomique ont des propriétés qui les différencient des autres groupes même s'ils

sont très proches. Dans le tableau VI sont présentées quelques lectines représentatives de ces groupes et certaines de leurs caractéristiques.

La présence de lectines n'est pas particulière à un tissu ou à un organe végétal; les progrès des techniques biochimiques et immunologiques ont permis l'identification de substances possédant les caractéristiques des lectines dans plusieurs parties de la même plante. Généralement les lectines les plus étudiées ont été obtenues à partir des graines, comme on peut le constater dans les exemples présentés dans le tableau VI. La raison vient du fait que dans ce tissu, et l'exemple des graminées est remarquable, les lectines constituent en général 10 % des protéines solubles des graines matures. Dans ce cas, les études d'immunolocalisation par microscopie électronique ont montré que les lectines se trouvent tout d'abord dans les corpuscules protéiques des cotylédons (Etzler, 1985); curieusement, la concentration en lectines diminue quand les cotylédons sont adsorbés pendant la germination de ces graines. Il existe plusieurs exemples où la concentration de la lectine et d'autres protéines diminuent également en fonction de l'âge des cotylédons, comme dans les graines de Dolichos biflorus (Talbot et Etzler, 1978), de petit pois (Rougé, 1976), de cacahuète (Pueppke, 1969) et de Bandereia (Lamb et al, 1983).

Les lectines ont été également identifiées dans d'autres tissus de nombreuses légumineuses, solanacées, etc., mais dans tous les cas,



CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES LECTINES DE DIVERSES FAMILLES VEGETALES

FAMILLE	LECTINE REPRESENTATIVE	SPECIFICITE	COMPOSITION CHIMIQUE
LEGUMINOSEAE			
Subfamille: Papilionaceae			
Tribe: Diocleae	Concanavalline A	α -D-mannose (α -D-D-glucose)	Riche en Asx, Ser. Non cysteine Non sucre.
Tribe: Viciae	Favin	α -D-mannose (α -D-D-glucose)	Riche en Asx, Thr, Non Met ou Cys; 3 % sucre
Tribe: Phaseolae	Soja	α -D-GalNAC	Riche en Asx, Ser, Thr, non Cys. 7 % sucre
Tribe: Loteae	Lotus tetragonobulus	α -L-fucose	Riche en Asx, Ser, Thr, Non Cys 8 % sucre
Tribe: Hedysareae	cacahuete	β -D-Gal 1,3 GalNac	Riche Asx, Ser, Thr, non Cys Non sucre.
Subfamille: Caesalpinioideae			
	Bandereia simplicifolia	α et β -D-GlcNAC	Riche en Ser, Asx, Thr, Gly, Leu 4 % sucre.

T A B L E A U VI

CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES LECTINES DE DIVERSES FAMILLES VEGETALES (suite)

FAMILLE	LECTINE REPRESENTATIVE	SPECIFICITE	COMPOSITION CHIMIQUE
Subfamille: Euphorbeaceae	Ricinus communis	β -D-galactose	Riche en Asx, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, 12 % sucre
SOLANACEAE	pomme de terre	β -D-glcNAC 1,4 β -D-glcNAC	Riche en Hydroxiproline Cys, Gly, 50 % Sucre.
GRAMINACEAE	gérme de blé	β -D-glcNAC 1,4 β -D-glcNac	Riche en Cys, Gly, non sucre.

+ Etzler, 1985.



les concentrations trouvées sont plus faibles que celles que l'on trouve dans les graines (Etzler, 1985). Dans la majorité des cas, les lectines trouvées dans une autre partie de la plante sont très semblables aux lectines trouvées dans les graines de la même plante (Hapner et Robins, 1979) mais certains exemples montrent que les lectines d'autres tissus ne sont pas toujours identiques aux lectines des graines de la même plante, comme dans le cas des racines de petit pois (Gatehouse et al, 1980) ou pour les lectines de racine , de la tige et les feuilles de Dolichos biflorus (Quinn et Etzler, 1983; Talbot et Etzler, 1978).

Les différences de structure entre les lectines trouvées dans une même plante peuvent être dues à l'expression des multiples gènes qui codent pour chaque lectine ou encore représentent les différentes modifications postranslationnelles d'un seul gène codant pour une lectine. Il n'existe, malheureusement que peu d'information sur la localisation subcellulaire dans les tissus végétaux. Certaines études sur Dolichos biflorus indiquent qu'il existe une grande proportion de lectines sur la paroi cellulaire des feuilles et de la tige (Etzler et al, 1984); par contre, dans le soja, les lectines se retrouvent à la surface des racines de la plante.

Jusqu'à présent, ces quelques informations ne permettent pas d'établir de relation entre les lectines tissulaires et leurs homologues provenant des graines (Etzler, 1985), mais d'autre part, l'abondance de ces molécules dans le règne végétal, suggère fortement que -

ces molécules ont un rôle primordial chez les plantes. En principe, la diversité de structure et la distribution des lectines dans un même organisme semblerait signifier que, lors de l'évolution de la plante, plusieurs lectines ont pu s'adapter à une même fonction.

Dans les graines de légumineuses par exemple, la forte concentration de lectines trouvée dans les graines et la particularité déjà mentionnée, d'augmenter ou de diminuer en concentration ou même de disparaître en fonction de l'âge de la graine, permettent de supposer qu'elles jouent un rôle important, soit dans la germination (Howard et al, 1972) , soit dans la maintenance de l'homogénéité de la graine (Peumans et al, 1983). Dans ce contexte, plusieurs rôles ont été proposés pour les lectines comme celui de permettre le stockage des protéines (Boyd, 1963) ou des autres composés glycoprotéiques (Weber et al, 1980); dans ces deux exemples, la localisation subcellulaire des lectines est compatible avec les rôles proposés.

Le fait que les lectines présentent un effet mitogène sur des cellules lymphoïdes animales a suggéré la possibilité que les lectines pourraient fonctionner comme des agents mitogènes sur les cellules embryonnaires végétales (Howard et al, 1972), malheureusement, parmi les lectines étudiées en présence des cellules végétales, certaines montrent une faible ou aucun effet mitogène (Del campillo, 1981; Nagl, 1972).

Certains auteurs ont associé les lectines au mécanisme de défense

de la plante; en effet, un certain nombre d'exemples montrent que les lectines peuvent avoir un effet protecteur contre des bactéries (Jones, 1964) des champignons (Mirelman, 1975; Rozensweig et al, 1985) ou certains virus (Partridge et al, 1976) pendant la germination et le développement des graines.

L'hypothèse faite en 1956 par Krüpe, sur la participation des lectines dans la symbiose entre la racine des légumineuses et une bactérie du genre Rhizobium, et malgré les références en faveur de cette théorie (Goldstein et Hayes, 1978), est encore un sujet de polémique et est une fonction qui n'a pas encore été clarifiée (Etzler 1985).

Plus récemment, la possibilité que les lectines puissent avoir une activité enzymatique spécifique pour certains oligosaccharides a été envisagée, du fait de la découverte dans certains légumineuses de glycosidases capables de produire l'agglutination des globules rouges (Hankins et Shanon, 1978; Del Campillo et Shanon, 1982). Il est possible que les propriétés agglutinantes de ces molécules soit le résultat d'une hydrolyse partielle de la surface cellulaire; en effet, il ne faut pas oublier que malgré l'activité agglutinante, les enzymes ont été exclus de la classification des lectines (Shanon, 1982; Goldstein et al, 1980).

Le rôle des lectines a été suggéré dans plusieurs autres mécanismes cellulaires, incluant l'extension de la paroi cellulaire (

Klaus et Glaser, 1974), la reconnaissance cellulaire (Knox et al, 1976), la régulation de la croissance (Howard et al, 1972) et le transport de sucres (Krüpe, 1956; Boyd, 1963). En général, tous ces rôles sont compatibles avec les données actuellement existantes sur les lectines dans les végétaux, mais doivent encore être exploités.

Enfin, il ne faut pas oublier que toutes les hypothèses sur la fonction des lectines sont basées sur les propriétés de reconnaissance des sucres; mais il existe d'autres activités non spécifiques dans ces molécules qui peuvent avoir une signification fonctionnelle tout aussi importante. Quelques lectines, et en particulier les lectines de légumineuses (Yang et al, 1974; Edelman et Wang, 1978), l'agglutinine du germe de blé, de pomme de terre (Roberts et Goldstein, 1983) et de graines de ricin (Houston, 1980) possèdent des sites de liaison hydrophobe. Certaines données montrent que l'activité de ces sites pourrait être indépendante des sites lectiniques (Edelman, 1972; Roberts et Goldstein, 1982 et 1983). La mise en évidence de l'affinité de certains dérivés de l'adénine (Roberts et Goldstein, 1983) et de l'acide indol-acétique (Edelman, 1972) pour ces sites hydrophobes a permis de supposer que, lors de l'évolution des lectines, la conservation de ces sites joue un rôle fonctionnel important dans le métabolisme des plantes. C'est pour cela qu'il est nécessaire d'associer la présence de ces sites hydrophobes ainsi que d'autres activités liées à la structure des lectines à la capacité de fixer les sucres si l'on veut trouver une

explication aux rôles des lectines végétales.

APPLICATIONS DES LECTINES

La spécificité des lectines est dirigée d'une façon exclusive vers les sucres, et leur application dans la purification et caractérisation des glycoprotéines est très courante. Les lectines offrent des avantages nombreux par rapport à l'utilisation d'autres ligands tels que les anticorps, par exemple: tout d'abord les lectines peuvent être obtenues en grandes quantités; ensuite, le complexe lectine-glycoprotéine peut être dissocié facilement grâce aux monosaccharides spécifiques de la lectine utilisée et enfin, la dissociation de ce complexe peut être faite à pH neutre sans endommager ni la structure ni l'activité biologique de la glycoprotéine en question (Goldstein et Hayes, 1978).

La technique de chromatographie d'affinité utilisant des lectines immobilisées est utilisée pour la purification des glycoprotéines solubles et membranaires et permet simultanément d'obtenir des informations sur la structure de ces molécules (Lotan, 1977; Kristiansen, 1974; Kornfeld et Ferris, 1975; Baenziger et Fiete, 1979; Debray et al, 1979; 1981). Le fait que certaines lectines soient capables de reconnaître la partie oligosaccharidique des glycoprotéines membranaires préalablement solubilisées par des détergents a permis la caractérisation de certains récepteurs cellulaires et

d'autres composants de la membrane de la cellule (tableau VII), (Lotan 1977; Hedo, 1984).

Les lectines ont été utilisées comme des indicateurs de l'existence d'anomalies du développement ou de transformation cellulaire dans certaines maladies. Par exemple, la Con A immobilisée sur une matrice polysaccharidique comme l'agarose (Toftager-Larsen et al, 1980; Breborowicz et al, 1982) est utilisée pour étudier les modifications glycaniques de l' α -foetoprotéine du liquide amniotique des femmes enceintes entre la 14^{ème} et la 28^{ème} semaine de gestation. Le pourcentage d' α -foetoprotéine du liquide amniotique ne réagissant pas avec la lectine immobilisée est sensiblement plus faible dans les cas anormaux, toujours associés à des malformations congénitales du tube neural, que dans les cas normaux, (Breborowicz et al, 1982; Ishiguro et al, 1985; Norgaard et al, 1980).

En général l' α -foetoprotéine est présente dans le sérum des adultes en faible concentration. Cette quantité augmente et sa détermination est routinière dans les cas de maladies comme l'hépatite, l'hépatome ou la cirrhose (Kelleher, 1979) cette α -foetoprotéine produite est pratiquement indistinguable dans chaque maladie par des méthodes immunologiques, mais grâce à l'utilisation des lectines, il est possible de détecter des variations importantes et significatives dans chaque cas, ce qui permet l'utilisation des lectines pour le diagnostic différentiel de ces trois maladies (Kelleher, 1979; Breborowicz et al, 1982).

T A B L E A U VII

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE DE RECEPTEURS MEMBRANAIRES SUR DES
LECTINES IMMOBILISEES[†]

RECEPTEUR	SOURCE	LECTINE	DETERGENT
Récepteur de l'acétyl choline	cerveau de rat	Con A, Ricine I germe de blé	Triton X100
Facteur de croissance	placenta humain	Con A, lentille Ricine, cacahuète haricot rouge	Nonidet p 40
Facteur de croissance	fibroblastes de souris	Germe de blé Con A, lentille Ricine I	Nonidet P 40
Facteur de croissance	placenta humain	Lentille, Ricine germe de blé	Triton X100
IgE	Cel; leucémique rat	Lentille, Ricine Germe de blé	Triton X100
Insuline	foie de rat	Con A, Germe de blé	Triton X100
Insuline	foie de rat	Con A	Triton X100
Insuline	placenta humain	Con A	Triton X100
Insuline	lymphocytes humains	Con A, lentille petit pois, ricine germe de blé	Triton X100 Triton X100
Hormone lutéotrope	ovaire de rat	Con A	Lubröl Px
Prolactine	foie de rat	Con A	Triton X100



[†]Hedo, 1984.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'utilisation des lectines pour l'identification et la caractérisation des structures présentant une activité de groupe sanguin (Sharon et Lis, 1972; Boyd, 1963) est un domaine très étudié. La grande spécificité des lectines a permis par exemple de montrer l'arrangement stéréo-chimique des oligosaccharides de ces antigènes.

D'autre part, dans le domaine de la biologie cellulaire, d'importantes découvertes sur l'architecture de la membrane cellulaire comme la distribution, la nature de certaines glycoprotéines membranaires ont été obtenues grâce à l'utilisation des lectines radioactives ou liées à la fluorescéine (Goldstein et Hayes, 1978; Lis et Sharon, 1981). une autre méthode basée sur le couplage d'enzymes à une lectine, a été utilisée dans un but similaire. Par exemple, la peroxydase couplée à une lectine permet, en mesurant l'activité enzymatique liée à une cellule, de calculer le nombre de récepteurs cellulaires pour la lectine. Dans le cas des hématies ont été calculés environ 10^6 - 10^7 récepteurs par cellule et pour les lymphocytes environ 10^5 à 10^6 récepteurs pour certaines lectines (Lis et Sharon, 1972).

Du fait que les cellules possèdent différents types de récepteurs à leur surface, une importante application des lectines est précisément, en se basant sur ces différences, de réussir à séparer certains types cellulaires d'une façon spécifique.

Plusieurs classes et sous-populations de lymphocytes ont été identifiées par cette méthode (Reisner et al, 1976; Boldt, 1984; Sharon,

1980; Sharon, 1982), Il existe plusieurs méthodes pour séparer différentes populations cellulaires en fonction de leurs caractéristiques morphologiques comme la taille, la densité, la charge électrique, etc., ou encore, les caractéristiques particulières de la membrane plasmique. Dans le premier cas, il faut utiliser des méthodes comme la sédimentation en gradient de densité, l'électrophorèse, ou encore la lyse cellulaire sélective (comme la prednisone qui lyse sélectivement les lymphocytes B) ou la fixation des cellules sur une matrice non-spécifique comme la laine de verre. Dans le deuxième cas, il faut utiliser les récepteurs spécifiques de chaque groupe cellulaire comme les anticorps ou les lectines.

Dans cet exemple, les lectines sont utilisées de deux façons: soit en solution, soit sous forme insoluble. En solution, l'utilisation de la lectine de germe de blé, capable d'agglutiner les lymphocytes B à des concentrations 5 fois plus faibles que les lymphocytes T, la lectine de cacahuète ou de soja capables de réagir avec des sous populations de lymphocytes T matures ou immatures permettent une récupération cellulaire supérieure à 60 % et une viabilité cellulaire de 90%, ce qui montre les avantages de cette technique par rapport aux autres méthodes utilisées dans le même but (Reisner et al, 1976). Dans l'autre exemple, la Con A fixée sur la laine de verre et l'agglutinine d'Helix pomatia fixée sur sépharose permettent la purification des lymphocytes T et B avec d'excellents résultats.

La reconnaissance et l'agglutination préférentielle des cellules tu-

morales par rapport aux cellules normales pouvait être intéressante surtout si la lectine possède également une activité cytotoxique (Sumner, 1936). Quelques lectines sont capables d'induire la mort des cellules en culture à des concentrations très faibles, de l'ordre de 1 ng/ml et des animaux à des concentrations de 1-3 ng/Kg (Shohan, 1970). C'est le cas de la ricine et de l'abrine, dont la structure et le mécanisme d'action ont été étudiés. On sait maintenant que les deux lectines sont formées par deux chaînes liées par des ponts disulfures. Les chaînes B se lient aux structures glycaniques de la membrane cellulaire ce qui permet à la chaîne A d'être internalisée et de bloquer la synthèse des protéines en inhibant la transcription du code génétique, ce qui provoque la mort de la cellule (Olsnes, 1976; Jiménez et Vazquez, 1986).

Les propriétés anti-cancéreuses de certaines lectines par un mécanisme similaire à celui de l'abrine et de la ricine furent l'objet d'un intérêt particulier dans le but d'utiliser ces lectines comme agents anti-cancéreux (Phils, 1977; Gabius et al, 1985). Dans certains cas, des résultats positifs ont été obtenus sur des cellules en culture et apparemment, la toxicité de ces lectines est très sélective (Nicolson, 1974), peut-être parce que les cellules malignes sont beaucoup plus sensibles aux effets toxiques des lectines.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les lectines ont été utilisées pour isoler des glycoprotéines et des polysaccharides et sont des outils importants pour l'étude des composants saccharidiques de la surface

cellulaire et du glycocalix. Les données obtenues dans ces études ont contribué à la compréhension de la structure et de la fonction de la membrane. Les lectines ont été très efficaces pour étudier les glycoconjuguées des cellules normales ou transformées et lors de la différenciation embryonnaire (Boyd, 1963; BROWN, 1978; Sharon et Lis, 1972; Sharon, 1975; Weir, 1980).

Récemment, les techniques de couplage sur des lectines, de plusieurs substances qui permettent leur visualisation par microscopie optique ou électronique (par exemple la ferritine, l'or colloïdal, la fluorescéine etc.), ont permis un nouveau type d'utilisation des lectines comme réactifs histologiques permettant l'identification et la localisation des résidus saccharidiques directement sur des coupes histologiques (Nicolson, 1978; Raedler et Raedler, 1985). Dans les laboratoires d'analyses médicales, l'utilisation des lectines comme marqueurs histochimiques permet d'identifier un grand nombre de types cellulaires (Howard, 1982). Par exemple, ces substances sont utilisées pour déterminer l'évolution clinique de malades atteints de carcinomes hormono-sensibles et non sensibles dans le cancer de la glande mammaire (Klein et al, 1982). Le tableau VIII résume les différentes interactions lectine-tissu récepteur et bien qu'il soit difficile d'interpréter ces résultats du fait de leur complexité, provoqué en partie par les différentes méthodes utilisées, il est possible de tirer certaines conclusions:

Il existe des changements cytochimiques au niveau des sites de liaison des lectines lors de la différenciation embryonnaire, la matura-

T A B L E A U VIII

LOCALISATION DES RECEPTEURS LECTINIQUES SUR DES TISSUS HUMAINS +

TISSUE	LC	PHA	ConA	RCA	SBA	PNA	UEA	DBA	WGA	LPA	LTA	BS I	BS II
<u>1. Sanguin:</u>													
Hématies			+		+	+			+				
Lymphocytes			+						+				
Neutrophiles			+										
Eosinophiles			+										
Basophiles			+										
<u>Cellules leucémiques</u>													
Myéloblastes			+										
Myélocytes			+										
Histiocytes			+						+				
<u>Nodules Lymphatiques</u>													
Petits Lymphocytes	+	+	+	+	+	+			+				+



T A B L E A U VIII (suite)

TISSUE LC PHA ConA RCA SBA PNA UEA DBA WGA LPA LTA BS I BS II

4. VAGIN + +

5. CAVITE ORALE

Muqueuse + +

6. APPAREIL DIGESTIF

Carcinome du colon + +

7. SYSTEME RESPIRATOIRE

Bronches + + + + +

8. EPIDERMES + + + +

9. GLANDE MAMMAIRE

Papillomes +

Carcinome I,II,II +

10. CERVEAU (Neuroglie) +

+ Alroy et al,1984 . LC, Lens culinaris; PHA, Phaseolus vulg.; ConA,Concanavaline A; RCA, Ricinus communis
SBA,soja agglutinine;PNA,cacahuète. UEA, Ulex europeus;DBA,Dolichos biflorus, WGA, Blé ; LPA, limulus po-
liphemus; LTA, Lotus tetragonobulus; BS, Bandereia simplicifolia I et II.



tion cellulaire, après une stimulation hormonale, des altérations métaplasiques et une transformation maligne. Pendant la différenciation embryonnaire et la maturation cellulaire, par exemple, on observe une augmentation du nombre et de la diversité des résidus saccharidiques situées en position terminale, mais par contre le nombre de récepteurs semble être diminué dans des cellules âgées. Dans certains cas de vieillissement cellulaire ou de transformation maligne, il apparaît une délétion de quelques résidus saccharidiques provoquant l'apparition de sucres sub-terminaux préalablement masqués (Alroy, 1984). Un exemple typique est celui des globules rouges âgés perdant leurs résidus d'acide sialique et qui présentent alors des résidus de galactose, ce qui permet à la lectine hépatique de les reconnaître (Barondes, 1981).

Dans le même ordre d'idée, Bird en 1954 avait publié les résultats de l'étude des réactions entre les agglutinines et les érythrocytes de malades présentant un problème de polyagglutination. Initialement, le fait que certaines agglutinines spécifiques du groupe sanguin A (comme Phaseolus lunatus) présentaient une affinité augmentée pour les cellules de ce type de maladie a permis de supposer qu'il existait un antigène lié aux hématies du groupe A, mais, en réalité il fut montré que l'antigène T découvert sur des hématies occasionnellement contaminées par des bactéries est la cause de cette augmentation de l'agglutination; plus tard, Krüpe (1957), en utilisant des hématies fermentées (terme utilisée dans le texte original) par des bactéries du groupe vibrio, a pu montrer que l'antigène T n'était

pas lié à l'antigène du groupe sanguin, car d'autres lectines spécifiques du groupe sanguin A comme Dolichos biflorus, étaient incapables de réagir avec les cellules modifiées par la bactérie, et par contre, des agglutinines dirigées contre les groupes B et O étaient capables d'agglutiner les cellules traitées. Bird (1951; 1974) en utilisant la lectine de cacahuète, spécifique pour des résidus de galactose et la plus spécifique de l'antigène T, a pu montrer que l'apparition de l'antigène T, était le produit de l'action d'enzymes du type neuraminidase sécrétées par les bactéries et par les virus.

La mise en évidence des caractéristiques chimiques et de la nature de l'antigène T par des lectines posait d'autre part une nouvelle question. Est ce que les bactéries et les virus ont besoin de certains récepteurs de type oligosaccharidique à la surface cellulaire pour pouvoir l'infecter?. La recherche de récepteurs de type oligosaccharidique pour les bactéries a permis d'obtenir quelques résultats suggérant cette possibilité (Sharon, 1984) et résumés dans le tableau IX .

PURIFICATION DES LECTINES

La capacité qu'ont les lectines de réagir d'une façon spécifique et réversible avec les sucres permet leur isolement et leur purification en utilisant des dérivés de sucres immobilisés sur une matrice inerte. Chaque lectine présente des caractéristiques particulières

T A B L E A U IX

ROLES DES SUCRES DANS L'ADHERENCE BACTERIENNE⁺

SUCRE	ORGANISME
Mannose	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonellae</i>
	<i>Shigellae</i>
	<i>Citrobacter frundii</i>
	<i>Klebsiellae</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Serratia maraxeus</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>
Gal α 1,4 Gal	<i>Escherichia coli</i>
L-fucose	<i>Vibrio cholerae</i>
Galactose	<i>Actinomyces viscosus</i>
	<i>Actinomyces naeslundii</i>
Acide sialique	Mycoplasme
N-acétyl-D-galactosamine	<i>Clamylia psitacci</i>
	<i>Chlamylia trachomatis</i>
Gal β 1,3 GalNAc β 1,3 Gal	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

⁺ Sharon, 1984.



mais, en général, la purification des lectines par chromatographie d'affinité n'est pas différente de celle utilisée pour la purification d'autres molécules possédant des sites de fixation spécifiques comme les anticorps ou les enzymes.

Les lectines possèdent en général une constante d'affinité élevée, de l'ordre de $10^2-10^4 \text{ mol}^{-1}$, mais la désorption d'une lectine d'une colonne d'affinité peut être obtenue par l'addition de son sucre le plus spécifique. Plusieurs adsorbants bio-spécifiques ont été utilisés dans ce but et sont divisés en 3 groupes principaux :

1. Des polysaccharides, soit sous une forme native ou modifiée.
2. Des glycoprotéines ou glycopeptides attachés sur une matrice inerte
3. Des mono ou disaccharides attachés sur une matrice .

Dans le premier groupe, les plus utilisés sont la sépharose (ou agarose) et le séphadex (un polymère de dextran). Le séphadex permet de purifier des lectines ayant une spécificité pour le glucose comme la Con A ou la lectine de lentille; des lectines spécifiques du galactose ont été purifiées sur sépharose, mais l'utilisation du sépharose n'est pas possible pour la purification de toutes les lectines spécifiques du galactose. En effet, il est nécessaire que ces lectines puissent réagir avec des résidus internes de la chaîne polysaccharidique. Dans certains cas, la capacité du sépharose peut être amplifiée par l'augmentation du nombre de résidus en position terminale après une hydrolyse acide douce qui permet la rupture des chaînes de galactanes sans dégrader totalement le gel (Ersson et al, 1973). Les capacités de ce type de supports peuvent être également

augmentées d'une façon moins drastique par l'addition, en présence d'un catalyseur chimique comme l'épichlorhydrine ou le divinylsulfone, de résidus de galactose apportés par les arabinogalactanes ou les galactomannanes (Longren et al, 1976; Young et Leon, 1978). Ce type de couplage peut être également réalisé sur des polymères d'acrylamide (Horisberg, 1977).

La chitine, un polymère de N-acétyl-D-glucosamine, est un autre exemple de polysaccharide utilisé pour la purification par chromatographie d'affinité de la lectine de germe de blé (Bloch et Burger, 1974). D'une façon générale, ce type de support d'affinité réagit uniquement avec des lectines qui reconnaissent un seul déterminant saccharidique, mais dans certains cas, où la spécificité est dirigée vers des structures plus complexes, la matrice d'affinité peut être obtenue par couplage d'une glycoprotéine, d'un glycopeptide ou d'un dérivé synthétique de sucre. Une glycoprotéine peut posséder plus d'un déterminant saccharidique reconnu par des lectines de spécificités différentes, ce qui confère à ces ligands un caractère moins spécifique. Par exemple, la fétuine immobilisée sur sépharose a été utilisée pour purifier les lectines de germe de blé (spécifique des résidus d'acide sialique et de N-acétyl-D-glucosamine), la Con A et la lectine de Pisum sativum (glucose et mannose), la lectine de Limulus polyphemus (acide sialique) et d'autre part, des glycopeptides de la substance A+H de la mucine porcine ont été utilisés pour purifier la lectine de soja (galactose spécifique), de haricot de lima (N-acétyl-D-galactosamine) et de Dolichos biflorus (galac-

tose- N-acétyl-D-galactosamine) (Sharon et Lis, 1972; Lis and Sharon, 1977; Sharon, 1980).

Il existe un groupe très particulier de lectines qui ne réagissent pas avec des sucres simples. Pour ce type de protéines, on peut utiliser comme support d'affinité des membranes d'hématies, soit immobilisées sur une matrice ou encore en suspension. En principe, ce type de support peut être utilisé pour toutes les lectines capables d'agglutiner les érythrocytes et de ce fait, cette méthode peut être considérée comme universelle. Cependant, pour les lectines qui ne sont pas spécifiques d'un sucre particulier, la désorption ne peut se faire que par des tampons de pH acide (tampon glycolle/ HCl pH 2,8, par exemple). L'utilisation de ce type d'adsorbants présente certains inconvénients, car l'adsorption des lectines sur la membrane érythrocytaire peut faire intervenir des réactions secondaires non-spécifiques comme les interactions hydrophobes.

Le troisième type d'adsorbants utilisés pour la purification des lectines est constitué par des matrices substituées avec des mono ou des disaccharides. La plupart de ces supports d'affinité utilise le sépharose comme matrice, en particulier pour les sucres aminés qui peuvent être conjugués après activation du gel par le bromure de cyanogène qui permet la liaison entre la fonction amine du sucre et la sépharose activée (Sundbergh et Porath, 1974). Cependant, la fixation des résidus saccharidiques directement sur la sépharose rend parfois le ligand inaccessible au site lectinique. Pour cette raison,

l'utilisation d'espaceurs comme la 6 amino-hexylamine ou l'acide ϵ -aminocaproïque (Shaper et al, 1973; Gordon et al, 1972) permet une meilleure interaction de la lectine avec son récepteur. Quatre exemples de dérivés glycosidiques sont présentés dans la figure 4. Il s'agit de dérivés O et S-glycosides, N-acétylglycosylamines et N-acyl-aminosucres qui sont les plus utilisés.

Ces dérivés glycosidiques couplés dans un premier temps sur un espaceur sont ensuite immobilisés sur une matrice inerte par différentes méthodes: par exemple, par le bromure de cyanogène (Sundbergh et Porath, 1974) ou la divinylsulfone (Porath et Sundbergh, 1972); ces différents ligands peuvent également être couplés sur des gels de polyacrylamide (Horejsi et Kocourek, 1973; Pipoka et al, 1978) ou sur biogel (Gray, 1974).

En conclusion, la purification d'une lectine peut être effectuée par différentes méthodes comme le montrent les tableaux X et XI, la lectine de germe de blé et la lectine de cacahuète étant choisies comme exemples (Lis et Sharon, 1981).

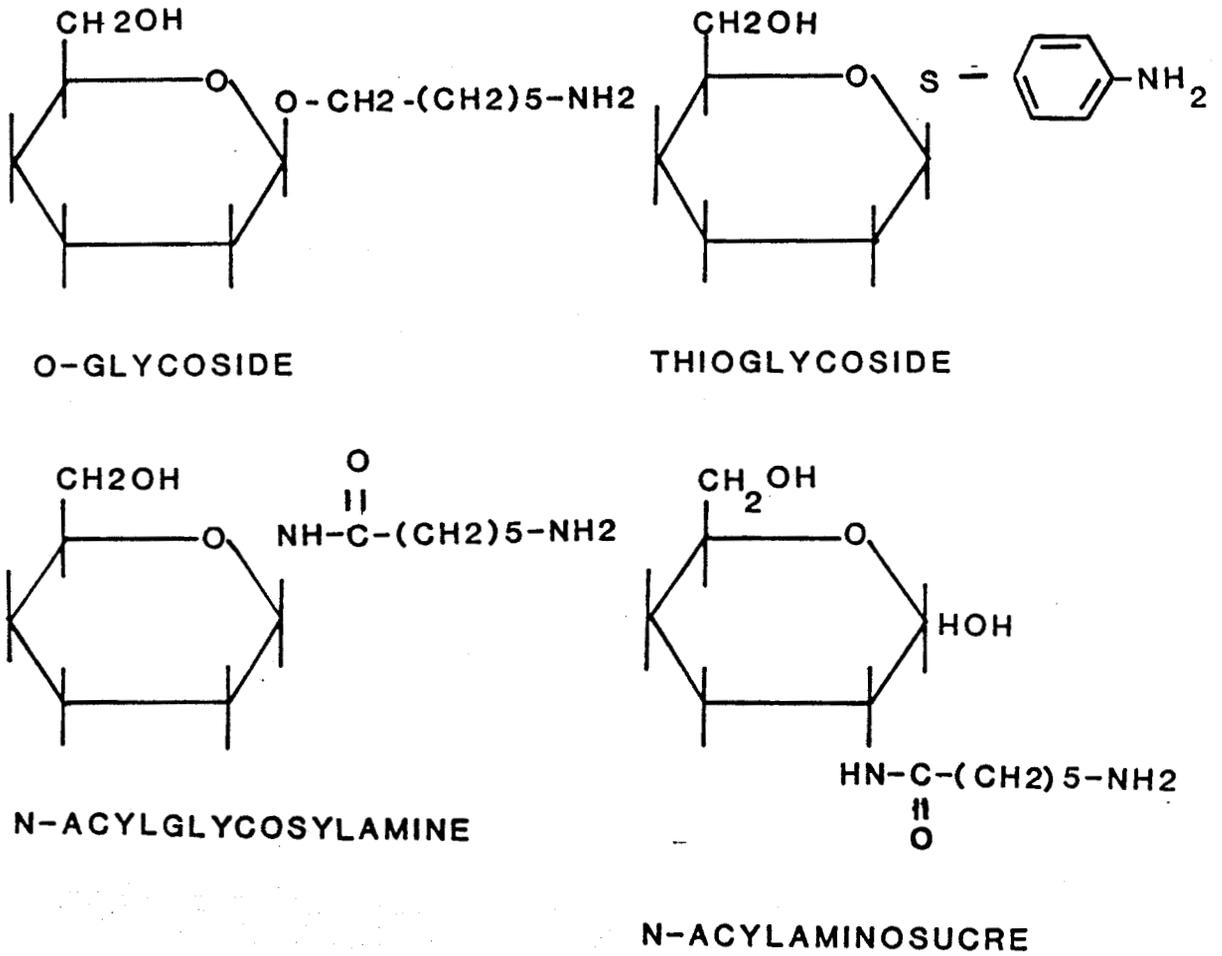


Figure 4

DERIVES GLYCOSIDIQUES LES PLUS UTILISES POUR LA PREPARATION
D'ADSORBANTS BIO-SPECIFIQUES POUR LA PURIFICATION DES LECTINES

(Lis et Sharon 1981),



T A B L E A U X

METHODES DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE UTILISEES DANS LA PURIFICATION
DE LA LECTINE DE CACAHUETE (Arachys hypogaea)[†]

MATRICE	LIGAND	METHODE DE COUPLAGE
Guaranne	-	-
Arabinogalactanne	-	-
Stromas d'hématies désialylées	-	-
Sépharose	Fétuine désialylée	bromure de cyanogène
Sépharose	N-glycosylamide de galactose	Bromure de cyanogène
Sépharose activé par le divinilsulfone	Galactose	couplage direct (à pH basique)
Aminoethyl-polyacry- lamide	Lactose	Réduction par le cyano-borohydrure
acrylamide	Alkyl glycoside de galactose	copolymérisation



[†] Sharon, 1981

T A B L E A U X I

METHODES DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE UTILISEES DANS LA PURIFICATION DE L'AGGLUTININE DE GERME DE BLE (*Triticum vulgare*)

MATRICE	LIGAND	METHODE DE COUPLAGE
Chitine	-	Bromure de cyanogène
Kieselguhr	ovomucoïde	Bromure de cyanogène
Sépharose	ovomucoïde	Bromure de cyanogène
	glycopeptide de mucine stomacale porcine	
	dérivé ϵ - aminocaproyl N-glycosamine de la N-acétyl-D-glucosamine	
	derivé 6-aminohexyl-O-glycoside de la N-acétyl-D-glucosamine	
CH-sépharose	glucosamine	carbodiimide
Epoxy-sépharose	N-acétyl-D-glucosamine	couplage direct (pH basique)
	Asparaginyl-N-acetyl-glucosamine	carbodiimide
Aminoethyl-polyacrylamide	N-acétylchitobiose	réduction par le cyano-borohydrure
Ultrogel A 4	p-Aminobenzyl 1-thioglycoside de N-acétyl-D-glucosamine	carbodiimide
Copolymères d'acrylamide et acide acrylique.	6-aminohexyl-N-acetyl-D-glucosamine	copolymérisation
Hématies formalinisées	-	-

⁺ Sharon, 1981.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

II P U R I F I C A T I O N E T C A R A C T E R I S A T I O N D E S L E C T I N E S

D E Machaerocereus eruca .

I. PREPARATION DES LECTINES DE Machaerocereus eruca .

A. MATERIEL.

Le cactus a été collecté dans le désert de la Basse Californie Mexique et identifié selon le Manuel Taxonomique des Cactus (Bravo-Hollis, 1980).

B. EXTRACTION DE LA LECTINE.

Le jus d'un kilogramme de tige de cactus, obtenu par centrifugation, est filtré sur papier Whatman No; 2 et dialysé contre un tampon phosphate 0,02 M/ NaCl 0.9 % pH 7,4 .

C. PURIFICATION DE LA LECTINE.

1; Précipitation au sulfate d'ammonium.

Les protéines de l'extrait de M.eruca dialysé contre le tampon phosphate sont ensuite précipitées par l'addition d'une solution de sulfate d'ammonium saturée. Afin d'identifier la concentration optimale nécessaire pour précipiter l'activité agglutinante, différentes concentrations de sulfate d'ammonium ont été utilisées:

- a. Le sulfate est ajouté, d'abord pour obtenir 33% de saturation; le précipité est recueilli par centrifugation et le surnageant est amené à 66% de saturation par addition de sulfate d'ammonium.
- b. Le sulfate d'ammonium a été ajouté pour obtenir 66% de saturation

c) Enfin, addition de sulfate d'ammonium pour obtenir directement 80% de saturation.

Les précipités recueillis par centrifugation sont redissous dans un volume de tampon phosphate pH 7,4. Ces fractions ainsi que les surnageants sont dialysés exhaustivement contre le tampon phosphate à 4°C. Ultérieurement, la concentration en protéine et l'activité sont déterminées

2. Chromatographie d'affinité sur mucine-sépharose.

La fraction obtenue par précipitation avec le sulfate d'ammonium à 66% de saturation (F-66) est filtrée sur une colonne (1x 17 cm) de mucine d'estomac de porc immobilisée sur sépharose 4 B (5 mg de mucine par ml de gel) activée par la méthode de March et al, 1974, et préparée au laboratoire par H. Debray.

Le gel est équilibré dans un tampon phosphate 0,02 M NaCl 0,9% pH 7,4 (PBS). Les protéines, non retenues sur le support d'affinité, sont d'abord éluées avec le tampon phosphate jusqu'à ce que la densité optique A_{280} soit descendue en dessous de 0,01. Une partie des protéines retenues sur le support est d'abord désorbée par addition d'eau distillée (Fraction I) et une autre fraction est ensuite éluee par addition d'un tampon glyco-colle/ HCl 0,2 M pH 2,5 (Fraction II). Le débit de la colonne est de 9 ml/heure et des fractions de 2,1 ml sont collectées. La force ionique et le pH sont ajustés par addition de 0,21 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 7,4, avant de mesurer la densité optique $A_{280 \text{ nm}}$ et l'activité agglutinante.

3. Chromatographie d'interaction hydrophobe.

Une aliquote de la fraction précipitée au sulfate d'ammonium (F-66) est filtrée sur une colonne (1x27 cm) contenant la phényl-sépharose CL-4B, équilibrée avec une solution de sulfate d'ammonium 0,5 M. Le matériel non retenu par la phényl-sépharose est élué avec la solution de sulfate d'ammonium 0,5 M jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm soit descendue jusqu'à 0,01. Plusieurs fractions sont obtenues par diminution de la force ionique en utilisant des solutions de sulfate d'ammonium 0,25; 0,12; 0,06 et avec de l'eau distillée. Des fractions de 2,1 ml sont collectées à un débit de 9 ml/heure et la force ionique de chaque fraction est ajustée à 0,5 M en sulfate d'ammonium, et la densité optique à 280 nm ainsi que l'activité agglutinante sont mesurées.

4. Chromatographie d'affinité sur une colonne de stromas d'hématies de Lapin.

a. Préparation des membranes d'hématies.

Pour préparer les membranes d'hématies , nous sommes partis de sang humain du groupe A⁺, ou de sang de lapin et d'âne. Cette préparation nécessite l'utilisation de sang frais (moins d'une semaine), dans le cas contraire, il est impossible d'éliminer totalement l'hémoglobine.

Les membranes d'hématies sont préparées suivant la méthode de Dodge, (Dodge et al, 1963); après plusieurs lavages en milieu isotonique pour éliminer le plasma, les hématies sont lysées par choc osmotique

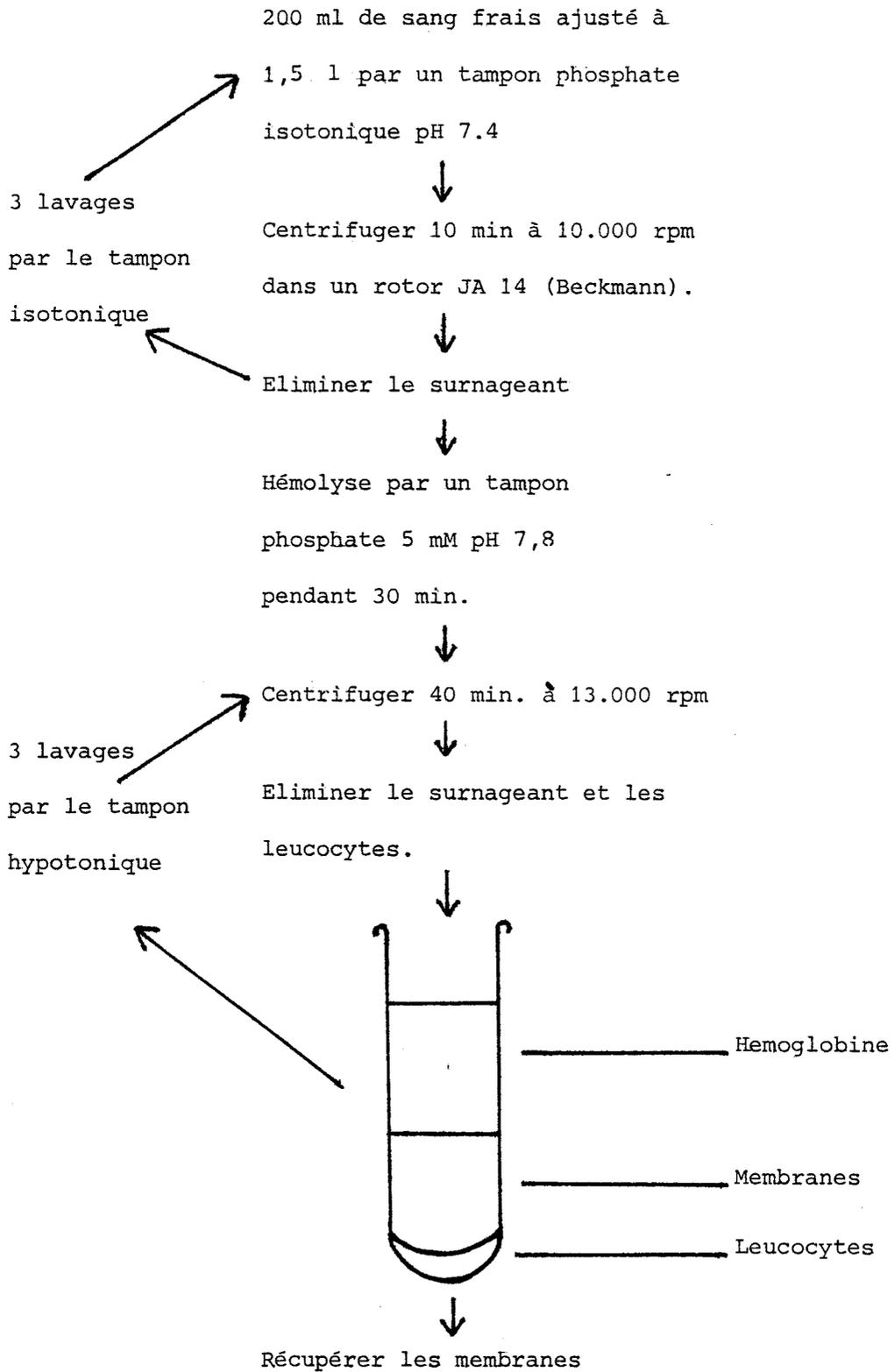


Figure 5

PREPARATION DES STROMAS D'HEMATIES,

et on récupère les membranes par centrifugation. Toutes les étapes s'effectuent à 4°C. Le déroulement des opérations est schématisé sur la figure 5. Les membranes sont récupérées et lyophilisées.

B. Préparation de la colonne de stromas d'hématies.

D'abord, les stromas d'hématies sont désialylés selon la méthode décrite par Monsigny (Monsigny et al, 1980) en utilisant une neuraminidase de *Vibrio cholerae*. 1,5gr de stromas d'hématies de lapin désialylées sont polymérisés avec 100 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 1 % dans le PBS pendant une nuit à 4°C et sous agitation constante, le pH 7,4 est ajusté par l'addition de KOH 1 M. Les stromas sont ensuite lavés plusieurs fois avec le PBS. finalement, les fonctions aldéhydes restées libres sur les stromas sont bloquées par addition de 10 volumes de glycolle 1 M et incubation pendant 3-4 h à 4°C. Les stromas ainsi polymérisés sont resuspendus dans 10 ml du PBS, puis mélangés avec 10 volumes de séphadex G-25 superfine et l'ensemble est ensuite introduit dans une colonne selon le schéma présenté à la figure 6.

Avant d'être utilisée, la colonne est rincée avec 4 à 5 volumes de colonne des tampons utilisés dans la purification des lectines: eau distillée, glycolle/ HCl 0,2 M pH 2,5 et le tampon phosphate pH 7,4. La capacité de fixation de la colonne est calculée en fonction du nombre d'unités agglutinantes éluées après saturation de la colonne (Ochoa et Kristiansen, 1979).

c. Purification des lectines.

Les fractions obtenues par chromatographie sur colonne de phényl - sépharose et présentant une activité hémagglutinante sont ensuite

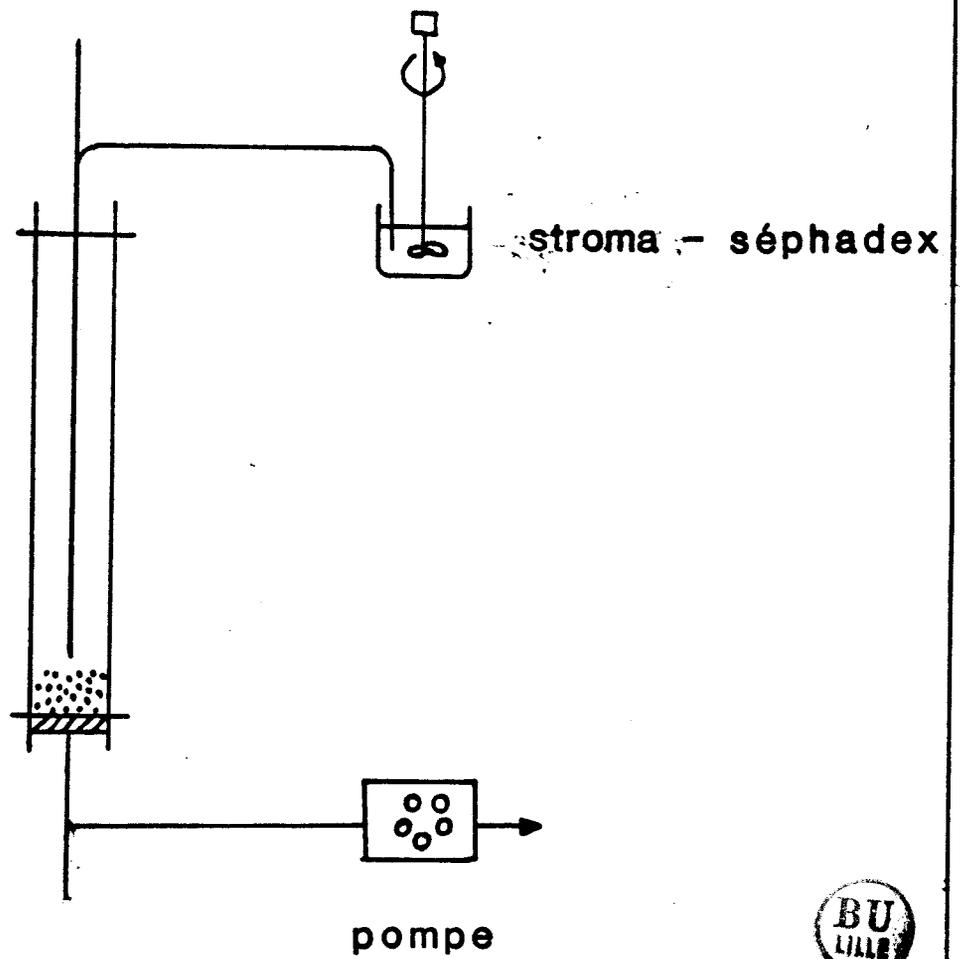


Figure 6

SCHEMA DE REMPLISSAGE D'UNE COLONNE DE STROMAS D'HEMATIES.

purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de stromas d'hématies de lapin desialylées, préparée selon le protocole précédent. La colonne (2,5x 12 cm), est équilibrée avec du PBS à un débit de 9 ml/heure. Une fraction non retenue sur la colonne est éluée avec le PBS, puis toute l'activité agglutinante est éluée par l'eau distillée. Comme précédemment, la force ionique de chaque fraction de 2,1 ml est ajustée et la densité optique à 280 nm ainsi que l'activité agglutinante sont mesurées.

D. METHODES D'ANALYSE.

La pureté des préparations de lectines de Machaerocereus eruca a été vérifiée par l'application de différentes méthodes.

1. Méthodes immunologiques:

a. Technique d'immunodiffusion.

La méthode d'immunodiffusion double (Ouchterlony, 1949) permet de déterminer les relations antigéniques qui peuvent exister entre les différentes fractions de M.eruca. Les solutions antigéniques sont introduites dans des puits de dépôts (2 mm de diamètre) sur une plaque d'agarose à 1,5 % (1x3 cm) et diffusent pendant 12 heures en chambre humide contre un immunsérum déposé dans un puits central. L'immunsérum utilisé étant ici un sérum de lapin anti-lectine F I de Machaerocereus eruca .

b. Immunélectrophorèse sur gélose.,

Les immunoélectrophorèses sont effectuées selon la méthode de Gra-

bar et Williams (1955) modifiée par Scheidegger (1955). L'électrophorèse sur gélose à 1,5 % effectuée dans un tampon véronal pH 8,2 et sous tension de 30 v pendant 180 minutes, est suivie d'une diffusion de 12 heures contre un sérum de lapin anti-lectine F I de M. eruca. La révélation des protéines est réalisée par le réactif à l'amidoschwartz.

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Les différentes étapes de la purification des lectines sont suivies par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique de Kerkaert (1978) qui utilise une variante du système tampon discontinu de Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli et Favre, 1973). Nous utilisons un gradient d'acrylamide de 5 à 25% ponté par 2,5 % de N,N'-méthylènebisacrylamide..

La migration pour une plaque de 15 cm x 10 x 1,5 mm d'épaisseur, dure environ 6 heures sous un courant de 30 mA. Les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

Tampon d'électrophorèse utilisé:

Tris		3 g
Glycocolle		14,4 g
S.D.S.		1,3 g
H ₂ O	q.s.p.	1,3 l

Préparation des échantillons:

Les protéines sont dissoutes dans la solution suivante:

Tris/HCl 3 M, pH 8,9 1 ml

S.D.S.	5 ml
Glycérol	2 ml
H ₂ O + bleu de bromophéno	2,5 ml
Mercaptoéthanol	0,5 ml

E. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE.

1. Protéines.

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la technique employée par Lowry (Lowry et al, 1951).

a; Préparation des solutions

Solution A : Na₂CO₃ 2% dans NaOH 0,1 N

Solution B : sulfate de cuivre, 5 H₂O, 0,5% dans le tartrate de Na,K 1%

Solution C : 50 ml de la solution A + 0,5 ml de la solution B

b; Dosage

A 1 ml de la solution de protéines sont ajoutés 5 ml de la solution C, le mélange est agité, puis laisse au repos pendant 10 minutes.

Puis 0,5 ml de réactif de Folin-ciocalteu , préalablement dilué au demi avec de l'eau, sont ajoutés. La solution, ainsi préparée est laisse 30 minutes à l'obscurité. Ce dosage se fait également sur des solutions témoins de sérum albumine à différentes concentrations; la lecture se fait à 700 nm.

2. Sucres.

Le dosage des oses neutres est réalisé par la méthode au phénol -

sulfurique décrite par Dubois (Dubois et al, 1956).

a; Préparation des solutions.

Solution A : Phénol redistillé 5 g.

Eau bidistillée q.s.p. 100 ml

Solution B : Acide sulfurique pur.

b; Dosage

Dans des tubes à essais très propres, on introduit 1 ml de la solution à doser contenant 10 à 70 ug d'oses totaux et 1 ml de la solution de phénol. Les tubes sont agités, puis 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à l'aide d'une burette dont le jet tombe brutalement sur la surface du liquide. Les tubes sont incubés pendant 5 minutes à 100°C et puis refroidis à température ambiante. Ce dosage se fait également sur des solutions témoins de lactose à différentes concentrations. La mesure de la densité optique est effectuée à 492 nm .

3. Dosage des sucres et détermination des rapports molaires par chromatographie en phase gazeuse.

Les sucres sont analysés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation suivant la méthode de Zanetta et al, (1972).

Une masse déterminée du produit est méthanolysée par le mélange $\text{CH}_3\text{OH}/ \text{HCl } 0,5 \text{ N}$ pendant 24 heures à 80°C. Un témoin interne, le mésoinositol, est introduit préalablement en quantité connue au mélange initial. Par la suite, les produits sont trifluoroacétylés

par le mélange dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique (100 ul/ 100 ul). Les rapports molaires sont déterminés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse, VARIAN Aérograph 1400, gaz vecteur N₂, phase stationnaire OV 210 à 5 % ϕ colonne de 3 m, porosité 100-200 mesh). La température du four est programmée de 100 à 220°C à raison de 2°C par minute. Nous avons utilisé aussi la technique de Clamp (Clamp et al, 1967) modifiée par Fournet et Leroy (communication interne): 10 microgrammes de glycane et 1 microgramme de méso-inositol (témoin interne) sont lyophilisées dans un tube so- virel. Les produits sont méthanolysés 24 heures à 80°C comme dans la méthode précédente par addition de 250 microlitres de méthanol/ HCl 0,5 N. Les glycannes sont ensuite refroidis, neutralisés par du carbonate d'argent (pH 7) et N-réacétylés par 10 microlitres d'an- hydride acétique 10 heures à l'abri de la lumière. Le tube est ensuite centrifugé et le surnageant délipidé par deux extractions à l'heptane (2x250 microlitres), Le méthanol est ensuite évaporé sous azote et le résidu sec est repris par 50 microlitres de pyri- dine et 50 microlitres de BSTFA (bisilyl trifluoro acetamide). 0,1 microlitres sont alors injectés dans un colonne capillaire de silicone: OV 101 (0,3 mmx 25 m), la température du détecteur et de l'injecteur étant de 220°C. Le gradient de température allant de 120°C à 240°C [soit 2°C/minute], Le gaz vecteur est l'hélium à 0,05 Bar .

4. Composition en acides aminés⁺

La composition en acides aminés est déterminée à l'auto-analyseur Bechman- Multichrom S-120 E, après hydrolyse acide des protéines selon la méthode décrite par Spackman et al (1958) et modifiée par Charet et al (1973). L'hydrolyse des protéines s'effectue en tubes scellés sous vidè, par l'acide chlorhydrique bidistillé 6 N, pendant 24,48 et 72 heures dans une étuve à 105°C..

5. Détermination de la Masse moléculaire.

La masse moléculaire des lectines est déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Le gradient de gel de polyacrylamide de 5% à 25% en présence de SDS est préparé dans les conditions précédemment décrites (p 74). 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 utilisons 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 trypsique du soja (20,100) et du lysozyme (14,400).

6. Détermination du point isoélectrique.

Cette méthode est réalisée en gel de polyacrylamide dans des conditions

+

Nous remercions Melle A. Martinage et Monsieur P. Sautière pour la réalisation de cette étude.

non dénaturantes selon la technique de Catsimpoilas (1968) en utilisant des ampholines (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Suède) suivant le protocole suivant;

Pour 1 tube (0,5 x 10 cm) renfermant 2,16 ml de solution:

Solution d'acrylamide-Bisacrylamide 28,38/1,62%	--0,31 ml
Triton X-100 1% (dans l'eau v/v)	--0,85 ml
Echantillon dissous dans H ₂ O	--0,85 ml
Solution d'ampholines pH 3,5-10 40% (dans l'eau)	-0,11 ml
Temed	-- 5 µl
Solution de persulfate 10% (dans l'eau)	--35 µl

Tampon d'électrophorèse utilisé

H₃PO₄ 5% (dans l'eau v/v) à l'anode

NaOH 2% (dans l'eau p/v) à la cathode.

La migration dure 14 heures à 4°C, sous un voltage de 600.V. Après migration électrophorétique, les gels d'acrylamide sont sortis des tubes en verre; le détergent et les ampholines sont éliminés et les protéines fixées par incubation des gels dans du méthanol à 50% dans l'eau pendant 12 heures, puis les protéines sont colorées par le bleu de coomassie 0,1% dans l'éthanol à 25 %).

Le gradient de pH est établi après l'isofocalisation en mesurant le pH sur des gels témoins (sans solution de protéine) de la façon suivante:

Les gels sont coupés transversalement en tranches de 0,4 cm. d'épaisseur qui sont incubées dans 0,5 ml d'eau distillée dégasée pendant une nuit à 4°C.; puis on mesure le pH de ces solutions.

5. Activité Hémagglutinante.

L'agglutination est la plus simple manifestation de l'interaction d'une lectine avec les cellules. Pour qu'une lectine soit agglutinante, il faut qu'elle possède plus d'un site de liaison dans sa molécule (valence de lectine). Pour déterminer ce pouvoir agglutinant, on place une suspension d'hématies en présence de l'agglutinine, soit sur une lame de verre, soit dans un tube. Les cellules agglutinées flocculent et le phénomène peut être observé directement ou à l'aide du microscope (Inbar et Sachs, 1969; Sela et al, 1970). Cet test, schématisé dans la figure 1, peut être utilisé de façon quantitative pour mesurer le pouvoir agglutinant d'une lectine.

On ajoute 25 µl de tampon phosphate 0,02 M pH 7,4 (PBS) ou une solution saline isotonique dans chaque puits d'une plaque de microtitration. Un volume égal de lectine est ajouté dans le premier puits, mélangé et ensuite, le même volume est prélevé et ajouté au puits suivant. On réalise ainsi une double dilution sériée de la lectine. On ajoute enfin le même volume d'une suspension d'hématies à 2% dans le PBS (environ 2×10^6 cellules/ml). On laisse en contact pendant 1 heure à température ambiante et on détermine le pouvoir agglutinant par observation directe.

Le résultat est exprimé par le titre d'agglutination représenté soit par la dernière dilution de la lectine présentant une activité agglutinante ou soit par l'inverse du \log_2 . Dans ce travail, nous utilisons la première forme d'expression des résultats. Le nombre d'unités hémagglutinantes est considéré comme le titre par millilitre de lec-

tine; il faut pour cela multiplier le titre d'activité agglutinante par 40 pour mesurer l'activité agglutinante de chaque fraction. L'activité spécifique de la lectine est définie étant comme le nombre d'unités hémagglutinantes par milligramme de protéine.

Dans ces essais d'agglutination, on utilise des hématies préalablement lavées par centrifugation avec un tampon phosphate 0,02 M pH 7,4. Des hématies traitées par la trypsine (ED.3.4.21.4.11,800 BA EE) ont également été utilisées. Des hématies désialylées ont également été utilisées . Elles ont été préparées en utilisant la méthode décrite par Monsigny (Monsigny et al, 1980): incubation de 100 ml d'une suspension d'hématies à 2% dans un tampon acétate de sodium pH 5,5 avec 50 U de neuraminidase de *Vibrio cholerae* pendant 45 minutes à 37°C. L'enzyme est éliminée par plusieurs lavages avec le tampon PBS, puis la concentration des hématies est ajustée à 2% pour le test d'agglutination .

III RESULTATS ET DISCUSSION

1. EXTRACTION DE LA LECTINE.

Les tiges du cactus Machaerocereus eruca possèdent une grande quantité d'eau. Des essais bromatologiques préliminaires ont montré qu'environ 94% du poids du matériel de départ est représenté par de l'eau, comme cela est indiqué dans le tableau XII; le matériel résiduel renferme principalement des sucres, des lipides et des protéines qui représentent 1% du cactus frais et environ 17% du matériel sec. Dans le jus collecté, on obtient 25% du matériel protéique total contenu dans le cactus, soit 1,7 g environ de protéines par kilogramme de tige.

2. ACTIVITE AGGLUTINANTE.

L'extrait brut de Machaerocereus eruca est capable de provoquer l'agglutination des hématies de différentes espèces animales à l'exception des hématies de l'espèce bovine, tableau XIII. L'activité agglutinante de ce cactus ne présente pas de spécificité sérologique pour les groupes sanguins humains, mais le pouvoir agglutinant est augmenté de 32 fois lorsque les agglutinines sont mises en présence d'hématies d'âne.

D'autre part, le traitement enzymatique des hématies par la trypsine ou la neuraminidase augmente sensiblement ce pouvoir agglutinant; tableau XIII.

Ceci a été également observé pour plusieurs lectines (Lis et Sharon

T A B L E A U X I I

COMPOSITION CHIMIQUE DU CACTUS Machaerocereus eruca. +

	POIDS FRAIS	POIDS SEC
	(%)	
PROTEINES	0,66	16,68
LIPIDES	1,03	16,57
SUCRES	3,37	54,15
CENDRE	1,24	19,94
HUMIDITE	93,76	-

+
Zenteno et Ochoa, 1984 .



T A B L E A U XIII

ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DE L'EXTRAIT TOTAL DE
Machaerocereus eruca

HEMATIES	TITRE		
	Natives	Traitées par: Trypsine	Neuraminidase
HUMAIN GROUPE A	32	256	128
HUMAIN GROUPE B	16	128	256
HUMAIN GROUPE O	32	256	256
ANE	4096	32768	32768
LAPIN	256	4096	2048
MOUTON	8	128	128
RAT	4	64	32
SOURIS	16	64	64
HAMSTER	64	ND	ND
COBAYE	128	ND	ND
POULE	4	ND	ND
VACHE	0	ND	16

ND, NON DETERMINEE



1977; Goldstein et Hayes, 1978), Cette amélioration de la susceptibilité à l'agglutination est attribuée à la combinaison de plusieurs facteurs: d'abord, une diminution de la répulsion électrostatique entre les cellules, résultat de l'élimination des résidus d'acide sialique (Pollack et Reckel, 1977); ensuite, l'exposition de récepteurs lectiniques qui étaient masqués (Sela et al, 1970); et enfin par le réarrangement des récepteurs à la surface cellulaire (Ochoa, 1979) chacun de ces facteurs peut augmenter l'agglutinabilité des cellules par les lectines.

3. PURIFICATION DES LECTINES DE Machaerocereus eruca.

A. Précipitation par le sulfate d'ammonium.

L'ensemble du matériel qui possède une activité agglutinante est précipité par addition de sulfate d'ammonium, soit en augmentant progressivement la concentration en sel dans le milieu de 0 à 33% de saturation et ensuite de 33 jusqu'à 66% de saturation. Le matériel qui n'est pas précipitable à cette concentration ne possède aucune activité agglutinante. L'addition de sulfate d'ammonium de 0 à 66% ou de 0 à 80% en saturation permet de récupérer 100% de l'activité agglutinante initiale, tableau XIV.

En considérant que toute l'activité agglutinante est précipitée par addition de sulfate d'ammonium à 66% de saturation, les méthodes de purification que nous allons décrire avaient comme matériel de départ cette fraction. Bien que le phénomène d'agglutination puisse

FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BRUT DE Machaerocereus eruca PAR

PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

% SULFATE D'AMMONIUM	UHA		% DE		PROTEINE (mg)	% DE RECUPERATION	ACTIVITE SPECIFIQUE
	TOTALES	RECUPERATION	RECUPERATION	RECUPERATION			
EXTRAIT TOTAL	415000	100	1680	100	247,02		
0----- 66	415000	100	1008	60	411,7		
66----- 100	0	0	168	10	0		
0----- 33	112050	27	386,4	23	290		
33----- 66	290500	70	638,4	38	455,04		
66----- 100	0	0	168	10	0		
0----- 80	415000	100	1394	83	297,7		
80----- 100	0	0	75,6	4,5	0		

être induit par d'autres substances non protéiques comme les tanins ou les polyphénols, mais comme l'activité agglutinante du cactus est précipitée par le sulfate d'ammonium, ceci nous permet de supposer à priori, qu' effectivement nous sommes en présence de substances protéiques de type lectine.

B. Purification par chromatographie d'affinité.

Après la précipitation par le sulfate d'ammonium, la fraction obtenue au 66% de saturation est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de mucine immobilisée sur sépharose. Cette méthode nous permet d'obtenir deux fractions qui possèdent une activité agglutinante: l'une est éluée par de l'eau distillée et une autre est éluée par l'addition d'un tampon glycoColle/ HCl 0,2 M pH 2,5, figure 7. Cette méthode permet la récupération de 70% de l'activité agglutinante déposée sur la colonne et une augmentation de l'activité spécifique de 6 fois par rapport à celle de l'extrait brut pour la fraction I, éluée par l'eau et de 22,6 fois pour la fraction II éluée par le glycoColle. Les résultats de cette purification sont résumés dans le tableau XV.

4. METHODES D'ANALYSE.

A. Contrôle de l'homogénéité des fractions.

L'application des techniques décrites p 73,74, aux différentes fractions obtenues montre que:

- L'immunoélectrophorèse des deux fractions purifiées de Machaeroce-

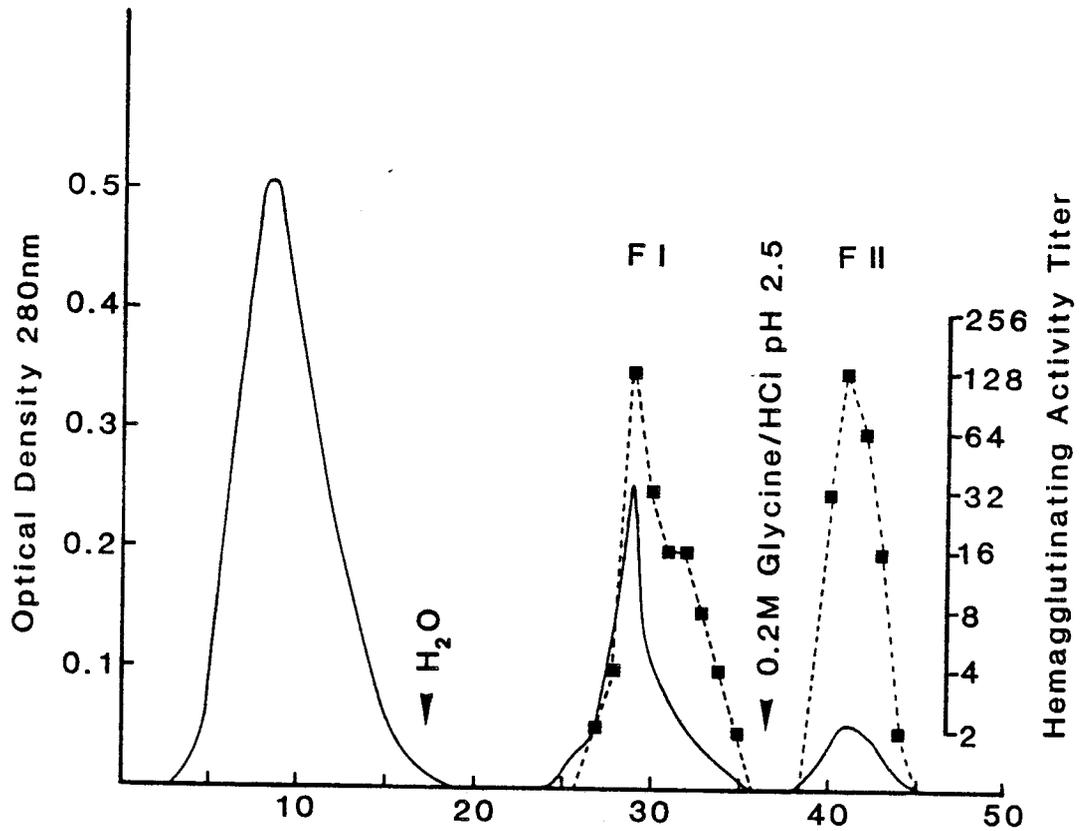


Figure 7

Profil d'elution des lectines de Machaerocereus eruca sur colonne de mucine immobilisée sur sépharose. 114 mg de protéine de l'extrait précipité par le sulfate d'ammonium sont déposés sur la colonne. La fraction non retenue est éluée par le PBS; la lectine F I est désorbée par l'eau distillée et la lectine F II est désorbée par un tampon glycolle/HCl pH 2,5. La densité optique à 280 nm (—) et l'activité agglutinante avec des erythrocytes groupe A (■ — ■) sont mesurées.

PURIFICATION DES LECTINES DE Machaerocereus eruca⁺ PAR
 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR MUCINE- SEPHAROSE.

FRACTION	PROTEINE		ACTIVITE AGGLUTINANTE		FACTEUR DE PURIFICATION
	(mg)	RENDEMENT (%)	UNITES TOTALES	RENDEMENT (%)	
EXTRAIT TOTAL	1680	100	415000	100	247,02 1
PRECIPITE AU SUL- FATE D'AMMONIUM 0-66	1008	60	415000	100	411,7 1,6
NON RETENUE SUR MUCINE	860	51	0	0	0 0
F I	50,4	3	124500	30	2470 10
F II	10	0,6	166000	40	9326 37,7.

⁺ A PARTIR DE 1 Kg de tige de cactus frais.



reus eruca par chromatographie d'affinité ne donne qu'un seul arc de précipitation en présence d'un sérum de lapin anti-fraction I de M.-eruca. Le degré de migration est aussi identique pour les deux fractions, figure 8.

- L'immunodiffusion double (Ouchterlony, 1948), montre que les arcs de précipitation présentent une identité totale pour les deux lectines, figure 9.

- L'électrophorèse en gel d'acrylamide, figure 10, nous montre l'homogénéité des fractions purifiées, les deux fractions migrant en une seule bande révélabile au bleu de coomassie et possédant un poids moléculaire d'environ 35,000 Daltons.

B. Caractérisation chimique.

L'application des méthodes de dosage colorimétrique montre que les deux lectines sont des glycoprotéines; la lectine F I renferme 30% de sucres alors que la lectine F II n'en renferme que 24%. Dans les deux cas, les rapports molaires indiquent que les lectines ne possèdent pas d'acide sialique, ni de N-acétyl-D-galactosamine. Dans le tableau XVI, est indiqué le pourcentage des sucres neutres comprenant principalement du glucose, du galactose et du rhamnose, de faibles concentrations en xylose, mannose et des traces de N-acétyl-D-glucosamine. La seule différence dans la composition en sucres entre les deux lectines semble être la présence d'arabinose (0,5%)

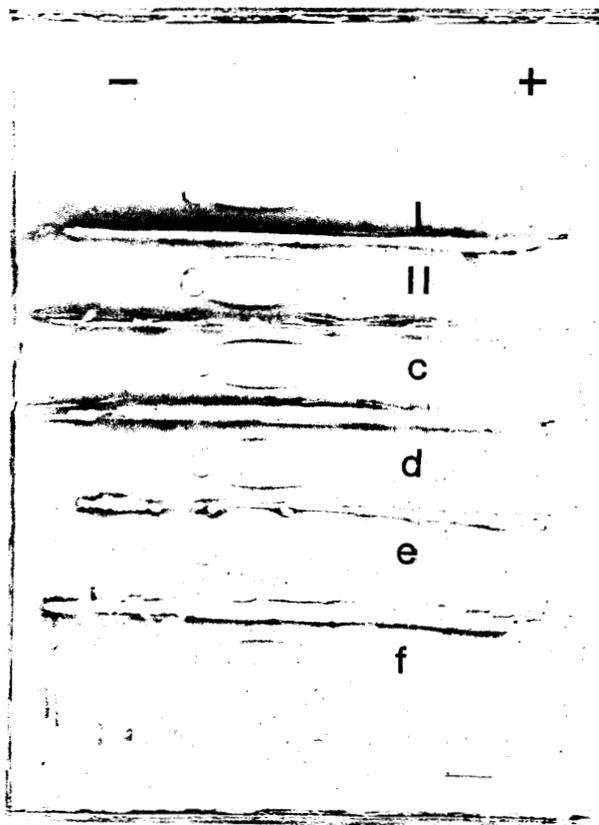


Figure 8

Immunoélectrophorèse des lectines de Machaerocereus eruca purifiées par chromatographie d'affinité sur mucine immobilisée sur sépharose (F I et F II), et sur phényl-sépharose puis par chromatographie d'affinité sur stromas d'hématies de lapin (fractions C,D,E et F). Ligne centrale, immunsérum de lapin contre la lectine F I de M.eruca.

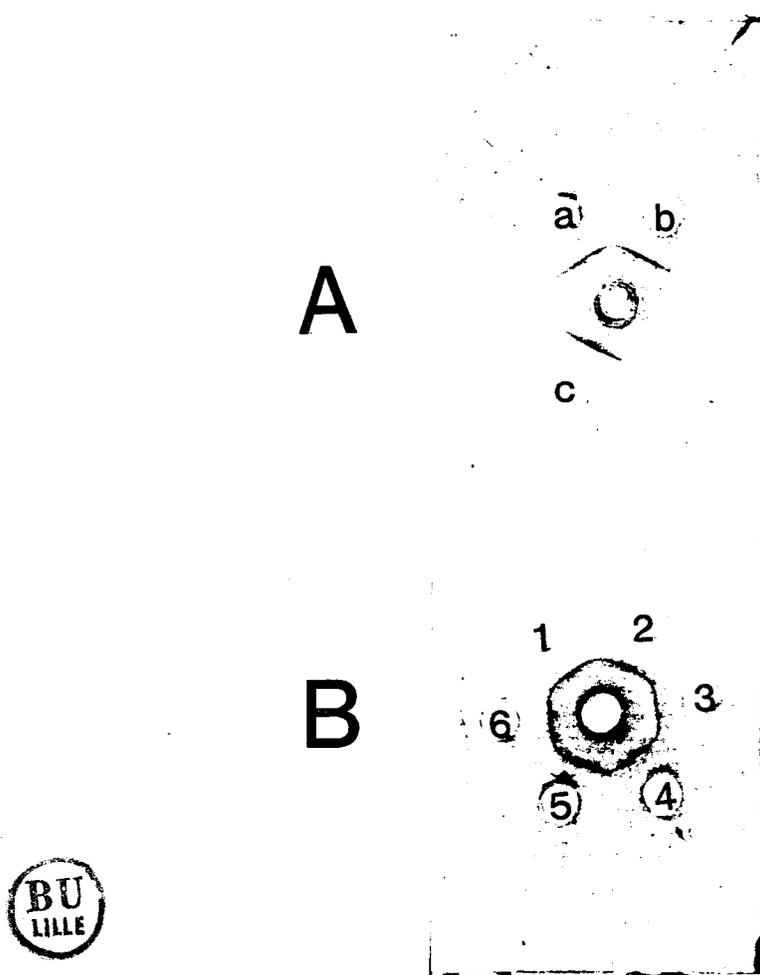


Figure 9

Immunodiffusion des différentes lectines de Machaerocereus eruca purifiées par chromatographie d'affinité sur mucine immobilisée sur sépharose: lectine F I, a) plaque A et 1) plaque B; lectine F II b) plaque A et 2) plaque B; c) plaque A, extrait brut de M. eruca, et des différentes fractions obtenues par chromatographie hydrophobe puis par chromatographie d'affinité sur stromas d'hématies de lapin: puits 3-6) correspondant aux fractions C-F (figure 12). puits central dans les deux plaques:immunsérum de lapin contre la lectine F I de M. eruca.

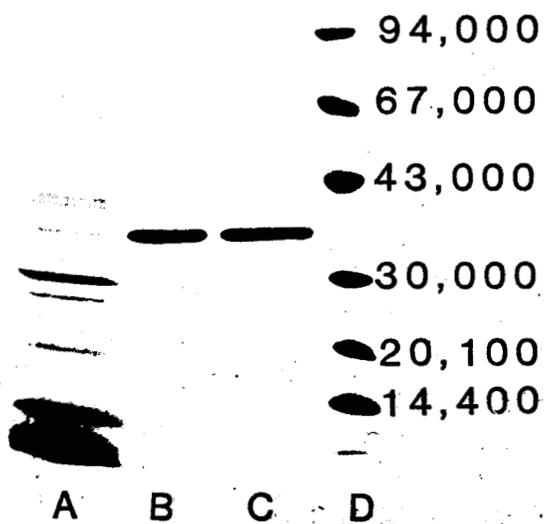


Figure 10

Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des lectines de Machaerocereus eruca purifiées par chromatographie d'affinité sur mucine immobilisée sur sépharose: A. 30 µg d'extrait total de M.eruca; B. 20 µg fraction F I; C 20 µg fraction F II; D. témoin de masse moléculaire.

T A B L E A U XVI

COMPOSITION EN OSES⁺ DES LECTINES F I ET F II DE Machaerocereus
eruca PURIFIEES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR MUCINE-SEPHAROSE.

NATURE DES MONOSACCHARIDES	LECTINE	
	F I	F II
Rhamnose	17,5	18,4
Arabinose	0,5	0
Xylose	19,0	7,3
Fucose	0	0
Galactose	16,1	17,4
Mannose	2,5	0,4
Glucose	45,4	56,3
N-acétyl-D-Galactosamine	0	0
N-acétyl-D-Glucosamine	TRACES	TRACES
Acide sialique	0	0



⁺ Représentée en % de la masse totale .

dans la lectine F I et d'autre part une concentration en xylose 2,5 fois plus élevée dans cette fraction par rapport à la lectine F II.

La composition en acides aminés montre pour les deux lectines une composition très semblable avec beaucoup de glycolle, sérine et acide glutamique et une absence en cystéine et méthionine; tableau XVII.

- La masse moléculaire calculée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, indique que les deux lectines possèdent une masse moléculaire d'environ 35,000 Daltons, comme le montre la figure 10 .

- La détermination du point isoélectrique sur des gels de polyacrylamide en présence des ampholines pH 3,5-10, montre que la lectine F I est composée de trois espèces moléculaires (isolectines) possédant des pI de 3,6; 4,1 et 4,6, et que par contre, la lectine F II ne renferme que deux isolectines de pI 3,5 et 4,1; figure 11 .

5. CONCLUSIONS.

L'utilisation de la chromatographie d'affinité sur colonne de mucine immobilisée sur sépharose nous a permis d'obtenir deux fractions éluées de ce support d'affinité avec de l'eau et par abaissement du pH du milieu. Les deux fractions, possédant une même masse moléculaire, sont des glycoprotéines renfermant les mêmes monosaccharides

T A B L E A U XVII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES⁺ DES LECTINES F I ET F II DE Machaerocereus
eruca PURIFIEES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR MUCINE-SEPHAROSE.

ACIDES AMINES	LECTIN	
	I	II
AC. ASPARTIQUE	5,87	6,95
THREONINE	5,99	4,50
SERINE	12,88	16,97
AC. GLUTAMIQUE	18,11	16,16
PROLINE	2,86	3,80
GLYCOCOLLE	17,75	22,98
ALANINE	10,40	8,58
VALINE	5,47	3,77
METHIONINE	0	0
ISOLEUCINE	2,85	2,36
LEUCINE	4,89	3,50
TYROSINE	2,21	1,73
PHENYLALANINE	2,24	1,57
HISTIDINE	2,58	2,69
ARGININE	2,14	1,47
CYSTEINE	0	0

+
Représentée en moles % .

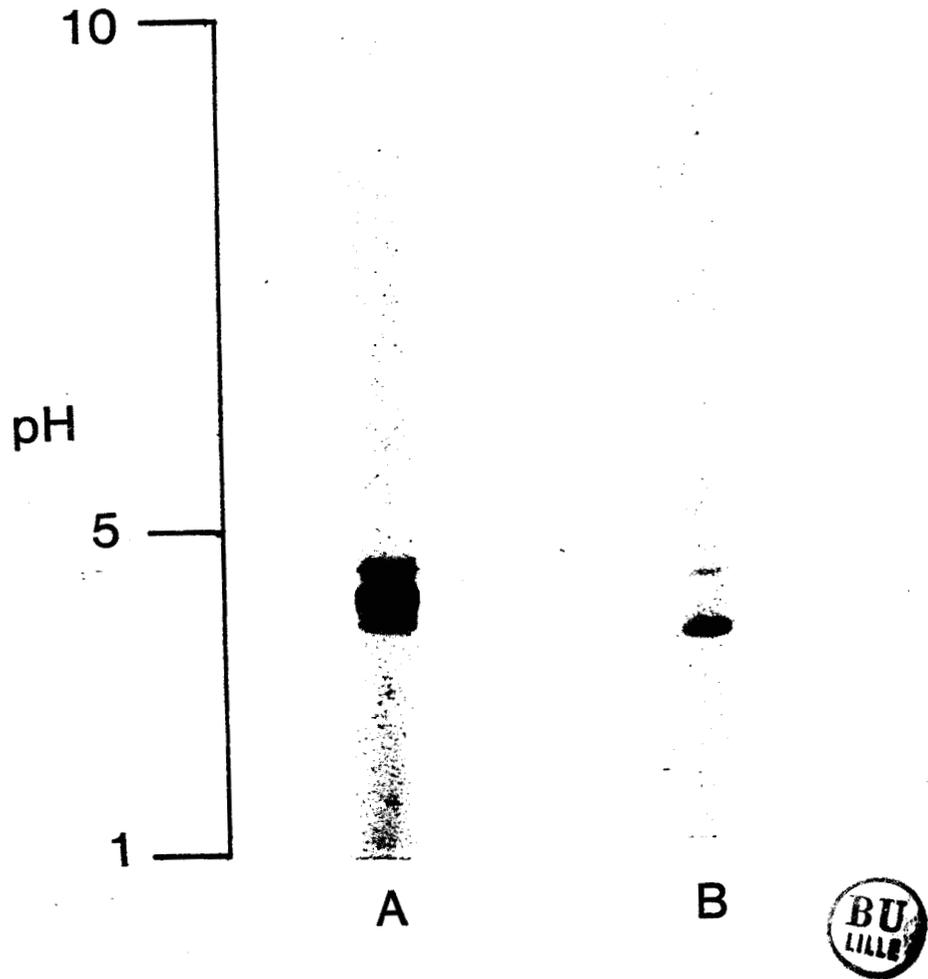


Figure 11

Isofocalisation sur gel de polyacrylamide gradient de pH de 3,5 à 10 des lectines de Machaerocereus eruca. A) 15 μ g lectine F I et B) 10 μ g de lectine F II ont été déposés .

mais en concentrations différentes. D'autre part, les deux lectines possèdent la même composition en acides aminés. Ces caractéristiques permettent d'expliquer pourquoi les deux lectines possèdent le même déterminant antigénique présenté à la figure 9, qui montre une identité totale en présence des anticorps de lapin anti-lectin F I et qui indique que les deux lectines son immunologiquement identiques.

La focalisation isoélectrique nous indique que la lectine F I possède de 3 composants moléculaires principaux (de pI 3,6; 4,1 et 4,6) alors que la lectine F II n'en renferme que deux (pI 3,5 et 4,1). Ceci constitue la seule différence existant entre les deux lectines. D'autre part, le profil d'élution de la colonne d'affinité (figure 7) nous indique qu'en dépit de caractéristiques physicochimiques similaires, l'interaction des deux lectines avec la matrice d'affinité implique des mécanismes de reconnaissance différents, peut être une interaction de type hydrophobe pour la lectine F I alors que la lectine F II présenterait une bonne affinité pour la mucine immobilisée.

6. PURIFICATION DES LECTINES DE Machaerocereus eruca PAR CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE.

D'autre part, la fraction de M. eruca précipitée par le sulfate d'ammonium a été chromatographiée sur une colonne de phényl-sépharose équilibrée avec du sulfate d'ammonium 0,5 M. On peut constater (figure 12) que la diminution de la concentration du sel du milieu permet l'obtention de quatre fractions présentant une activité agglutinante.

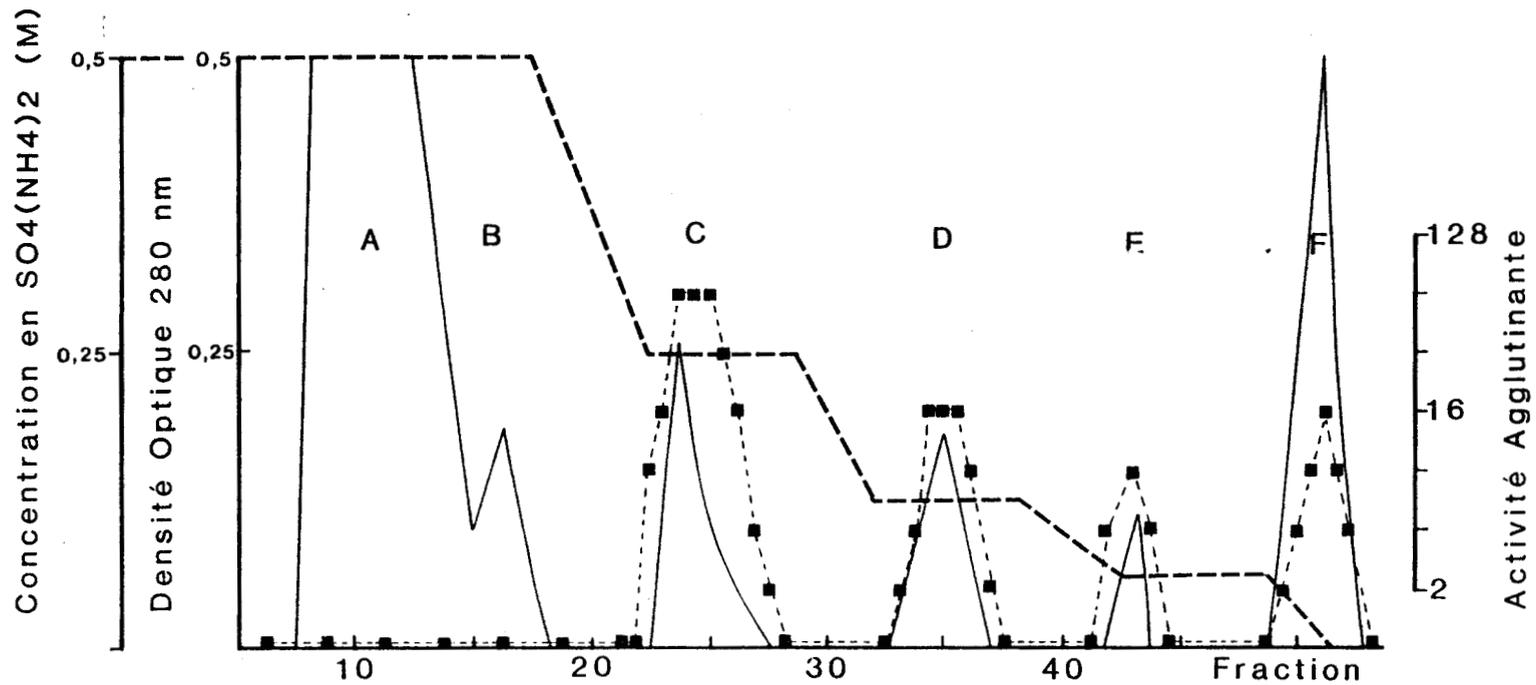


Figure 12

Profil d'élution des lectines de *Machaerocereus eruca* sur une colonne de phenyl-sépharose : 160 mg de protéine de la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium sont déposés sur la colonne. Les fractions non retenues (A et B) sont éluées par le sulfate d'ammonium 0,5 M; les différentes fractions sont obtenues par diminution de la molarité en sulfate d'ammonium (- - - -). La densité optique à 280 nm (—) et l'activité agglutinante avec des erythrocytes groupe A (■—■) sont mesurées.



Ces fractions représentent 81% environ de l'activité agglutinante appliquées sur la colonne. Cette méthode de purification est résumée dans le tableau XVIII.

Cette méthode de purification des lectines de M. eruca implique l'utilisation d'un autre support d'affinité, constitué par des stromas d'hématies de lapin désialylés, pour purifier les fractions obtenues avec la colonne de phényl-sépharose. Dans la figure 13, est représenté le processus de purification des fractions C et F. Ces deux fractions présentent des activités agglutinantes plus élevées par rapport à celles des fractions D et E, et par leurs comportements à l'élution, les deux fractions C et F représentent deux groupes moléculaires avec différentes caractéristiques hydrophobes.

L'élution des deux lectines de la colonne de stromas est effectuée par l'addition d'eau distillée avec un rendement d'environ 70 %. Le protocole de purification est résumé dans le tableau XIX.

7. Caractérisation Physico-chimique.

Comme dans le cas des lectines purifiées par chromatographie d'affinité, les quatre fractions purifiées par chromatographie hydrophobe, puis par chromatographie d'affinité sur colonne de stromas sont de nature glycoprotéinique. La détermination centésimale en sucres de ces fractions obtenues par chromatographie hydrophobe (tableau XX) indique une augmentation progressive de la concentration en sucres

T A B L E A U XVIII

PURIFICATION DES LECTINES DE Machaerocereus eruca[†] PAR CHROMATOGRAPHIE
HYDROPHOBE SUR PHENYL-SEPHAROSE.

FRACTION	PROTEINE		ACTIVITE AGGLUTINANTE		ACTIVITE SPECIFIQUE	FACTEUR DE PURIFICATION
	(mg)	RENDEMENT (%)	UNITES TOTALES	RENDEMENT (%)		
EXTRAIT TOTAL	1680	100	415000	100	247,2	1
PRECIPITE AU SULFATE D'AMMONIUM 0-66	1008	60	415000	100	411,7	1,6
A	35,6	20	0	0	0	0
B	28,53	16	0	0	0	0
C	37,4	21	207500	50	5542	13,5
D	14,26	8	12865	3,1	902	2,1
E	7,13	4	12865	3,1	1803	7,3
F	35,66	20	103750	25	2909	11,7

[†] A PARTIR DE 1 Kg De TIGE DE CACTUS.



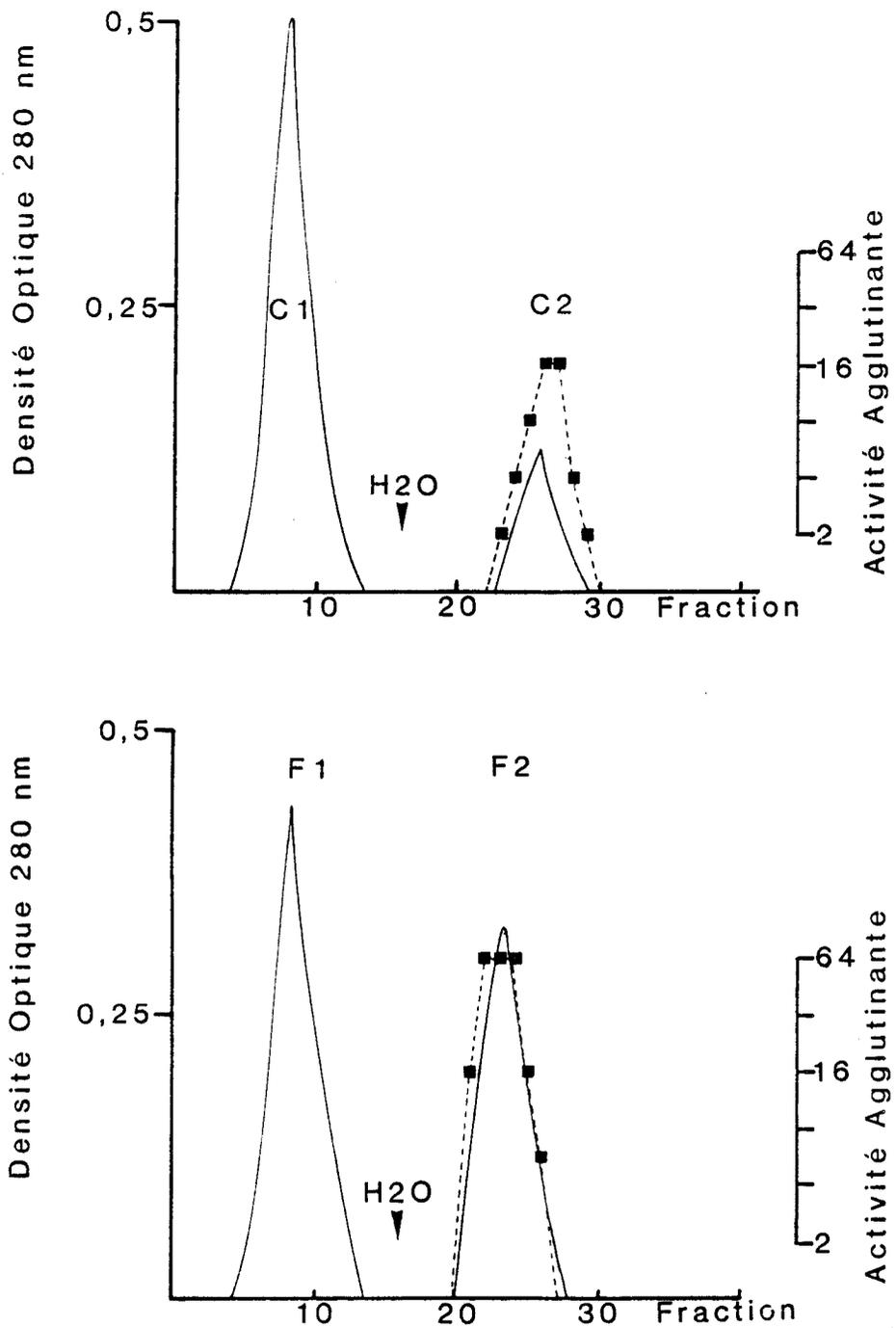


Figure 13

Profil d'élution des lectines de Machaerocereus eruca préalablement purifiées par chromatographie hydrophobe, sur colonne de stromas d'hématies de lapin desialylées. A. 37,4 mg de la fraction C et B. 35,6 mg de la fraction F sont déposés sur la colonne. La fraction non retenue (C_1 et F_1) est éluée par le PBS. L'élution de l'activité agglutinante est obtenue par l'addition d'eau (C_2 et F_2). La densité optique à 280 nm (—) et l'activité agglutinante avec des erythrocytes groupe A (■—■) sont mesurées.

T A B L E A U XIX

PURIFICATION DES FRACTIONS C ET F⁺ DE Machaerocereus eruca PAR
 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE STROMAS D'HEMATIES DE LAPIN.

FRACTION	PROTEINE (mg)	RENDEMENT (%) ⁺⁺	UNITES TOTALES	RENDEMENT (%) ⁺⁺	ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE	ACTIVITE SPECIFIQUE	FACTEUR DE PURIFICATION
C-NON RETENUE	4,12	0,2	0	0	0	0	0
C 2	20,36	1,2	155002	37,3	7613	18,5	
F- NON RETENUE	4,3	0,2	0	0	0	0	
F 2	23,5	1,4	72625	17,5	3090	7,5	

+ Obtenues par chromatographie hydrophobe

++ Par rapport à l'extrait brut,, voir tableau XVIII.



T A B L E A U XX

COMPOSITION CHIMIQUE DES LECTINES DE Machaerocereus eruca
ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE.

FRACTION	% DE + PROTEINE	++ SUCRES
EXTRAIT TOTAL	23	77
A	70	30
B	88	12
C	59	41
D	50	50
E	41	59
F	18,3	81,7



⁺Déterminée par la méthode de Lowry (1951)

⁺⁺Déterminée par la méthode de Dubois (1956)

dans ces différentes fractions en fonction de leur hydrophobicité, avec 41% de sucres pour la fraction C, la moins hydrophobe, et 81% pour la fraction F, la plus hydrophobe. La détermination des rapports molaires indique la présence de glucose, de galactose et de rhamnose principalement et en quantité moindre, de mannose, et de xylose, ainsi que des traces d'hexosamines. L'acide sialique est absent et les fractions les plus hydrophobes renferment plus d'arabinose. tableau XXI. Après purification, les fractions C et F renferment respectivement 20% et 34% de sucres et le rapport molaire indique la présence des sucres précédemment mentionnés, mais l'arabinose n'est présent qu'à l'état de traces dans la fraction F, tableau XXII.

L'immunodiffusion double, montre que les fractions purifiées par chromatographie hydrophobe, puis par chromatographie d'affinité forment un arc de précipitation en présence des anticorps contre la lectine F I obtenue par chromatographie d'affinité sur mucine-sépharose; ce qui indique que les fractions purifiées par chromatographie hydrophobe présentent les mêmes caractéristiques antigéniques que les lectines purifiées par chromatographie d'affinité (figure 9°). L'immunoélectrophorèse de ces fractions ne donne qu'un seul arc de précipitation en présence de sérum de lapin anti-fraction I de M. eruca, le degré de migration est identique à celui des fractions purifiées par chromatographie d'affinité sur mucine-sépharose, figure 8 .

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS nous

T A B L E A U XXI

COMPOSITION EN OSES⁺ DES LECTINES DE Machaerocereus eruca

OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE,

NATURE DES MONOSACCHARIDES	FRACTION			
	C	D	E	F
Rhamnose	36	32	31	26,3
Arabinose	0,2	5	9,9	21,08
Xyløse	2,6	3,2	3,1	3,2
Fucose	1	2	2,6	4
Galactose	19	24	21,1	18
Mannose	2	3	2,8	2
Glucose	39	30	28,7	25
-N-acétyl-D-galactosamine	0	0	0	0
N-acétyl-D-glucosamine	TRACES	TRACES	TRACES	TRACES
Acide sialique	0	0	0	0

⁺
Représentée en % de la masse totale.

T A B L E A U XXII

COMPOSITION EN OSES ⁺ DES LECTINES C ET F DE Machaerocereus eruca
PURIFIEES SUR STROMAS IMMOBILISES D'HEMATIES DE LAPIN

NATURE DES MONOSACCHARIDES	LECTINE	
	C	F
Rhamnose	14,8	13
Arabinose	0	TRACES
Xylose	27	11,5
Fucose	0	0,3
Galactose	6,3	12,1
Mannose	2,1	3,1
Glucose	53,6	55,9
N-acétyl-D-Galactosamine	0	0
N-acétyl-D-Glucosamine	TRACES	TRACES
Acide sialique	0	0



⁺ Représentée en % de la masse totale

montre l'homogénéité des quatre fractions purifiées par ce procédé, et qui possèdent aussi un poids moléculaire de 35,000 daltons identique à celui des fractions purifiées sur mucine-sépharose, figure 14.

8. CONCLUSIONS.

L'utilisation d'un support hydrophobe nous a permis d'obtenir quatre fractions qui sont antigéniquement identiques entre elles et avec les lectines purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de mucine immobilisée sur sépharose. Toutes ces fractions présentent un arc de précipitation avec identité totale en gel d'agarose en présence d'anticorps dirigés contre la lectine F I. Les fractions, purifiées par chromatographie d'affinité sur stromas immobilisés, présentent des caractéristiques antigéniques similaires, la seule différence entre elles se situe au niveau de leur teneur en sucres. La fraction la moins hydrophobe renferme environ 40% moins de sucres que la fraction la plus hydrophobe. Ces résultats sont semblables à ceux décrits par Misrahi et al, (1979), pour des glycoprotéines qui présentaient différents degrés d'affinité pour des matrices hydrophobes en fonction de leur concentration en sucres. Ces auteurs proposent que les résidus saccharidiques présents dans la molécule induisent une meilleure exposition des régions hydrophobes de la molécule, ce que permet aux glycoprotéines d'augmenter leur hydrophobicité.

Enfin, la purification des lectines par chromatographie d'affinité sur stromas immobilisés et leur elution avec de l'eau distillée mon-

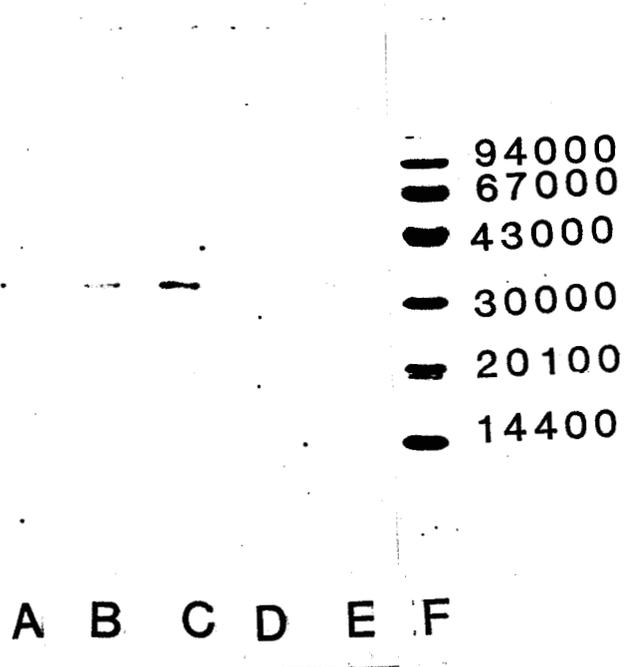


Figure 14

Électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fractions de *Machaerocereus eruca* purifiées par chromatographie hydrophobe, puis par chromatographie d'affinité sur stromas d'hématies de lapin. A) 15 ug d'extrait total; B-E) 10 ug des fractions C, D, E et F respectivement; F) témoin de masse moléculaire.

trent que les lectines de Machaerocereus eruca sont des molécules hydrophobes. Cette propriété pourrait intervenir dans les mécanismes d'interaction avec les érythrocytes au cours de l'agglutination. Les stromas immobilisés, utilisés comme support d'affinité dans la purification des lectines, peuvent présenter d'autres mécanismes d'interaction avec elles, notamment par des interactions hydrophobes (Lis et Sharon, 1981) .

1V PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES LECTINES

F I ET F II DE Machaerocereus eruca

1. INTRODUCTION

Pour cette étude, les concentrations des lectines F I et F II de Machaerocereus eruca préalablement dialysées contre une solution de NaCl 0,09% sont ajustées à un titre de 32, représentant 100% de l'activité agglutinante. Cette activité est mesurée dans différentes fractions aliquotes ayant subies un traitement chimique ou physique comme il sera décrit dans les protocoles suivants

A. Stabilité thermique.

Les lectines sont incubées de 0°C à 100°C, en augmentant la température graduellement et en prélevant une fraction aliquote tous les 10°C. Le pouvoir agglutinant de chaque fraction est ensuite mesuré après dilution.

B. Stabilité à différents pH.

Des fractions aliquotes de 2 ml de lectines sont dialysées pendant 48 heures contre des solutions de glycolle 0,01 M, dont le pH varie de 2 à 11. Avant de mesurer l'activité agglutinante, le pH de chaque fraction est ajusté à pH 7,4, soit par l'addition de NaOH 1 N ou d'HCl 6 N. Le volume final est ajusté avec du PBS.

C. Effet des ions sur l'activité agglutinante.

L'effet des cations divalents est mesuré de deux façons, d'abord en ajoutant 2,5 mM de Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} ou le mélange Ca^{++} , Mn^{++} et Mg^{++} , au tampon phosphate pH 7,4 (PBS). La lectine est diluée dans ces tampons renfermant les différents cations, puis incubée pendant deux heures avant d'ajouter la suspension d'hématies. Une autre méthode utilisée consiste à dialyser les lectines contre le PBS renfermant 0,05 M en EDTA pendant 24 heures. Puis, l'activité agglutinante de cette solution lectine-EDTA est mesurée en présence des différents cations. Un témoin est préparé avec la lectine dialysée en absence d'EDTA.

D. Effet de la concentration en NaCl sur l'activité agglutinante.

L'effet de la concentration en NaCl est étudié de deux façons: la solution de lectine est dialysée d'abord pendant 72 heures contre de l'eau distillée, puis la lectine est diluée sur une plaque de microtitration en présence de différentes concentrations en NaCl variant de 0 à 4 M. Après incubation à température ambiante, une suspension d'hématies fixées par la glutaraldéhyde à 1% (Avrameas, 1972) est ajoutée.

Un autre essai a été effectué où l'isotonicité de la solution de lectine est obtenue par addition de glucose.

E. Effet de l'urée ou du polyéthyléneglycol sur l'activité agglutinante

Des réactifs pouvant modifier la charge nette ou la conformation de la

molécule comme le polyéthylénéglycol ou l'urée ont été utilisées. Le mélange est incubé pendant 30 minutes avant d'ajouter la suspension d'hématies à 2% .

2. RESULTATS ET DISCUSSION.

A. La stabilité des lectines F I et F II aux changements de température est résumée à la figure 15 et dans le tableau XXIII. De 0 à 80°C, l'activité agglutinante des lectines n'est pas perturbée. L'incubation à 100°C provoque la dénaturation de la lectine F II, mais 25% de l'activité agglutinante est encore présente après incubation à 100°C de la fraction F I, tableau XXIII. d'autre part, lors de l'incubation d'une heure à 70°C, les deux lectines conservent encore 75% de l'activité initiale, tableau XXIII. Deux heures d'incubation à cette température inhibent complètement leur activité, ce qui semble indiquer une dénaturation des lectines.

B. La modification du pH du milieu dans lequel sont dissoutes les lectines ne modifie pas leur activité entre pH 3 et 10, comme le montre la figure 16 . Par contre, aux pH inférieurs à 2 ou supérieurs à 10, l'activité agglutinante est modifiée de façon irréversible. l'étude de l'effet du pH est difficile à interpréter parce que la détermination du pouvoir agglutinant avec des hématies non fixées n'est pas réalisée dans des conditions physiologiques; normalement les hématies n'étant stables qu'entre pH 6 et 8 (Duk et Lisowska, 1984), il est donc nécessaire d'ajuster le pH avant de faire le test d'agglu-

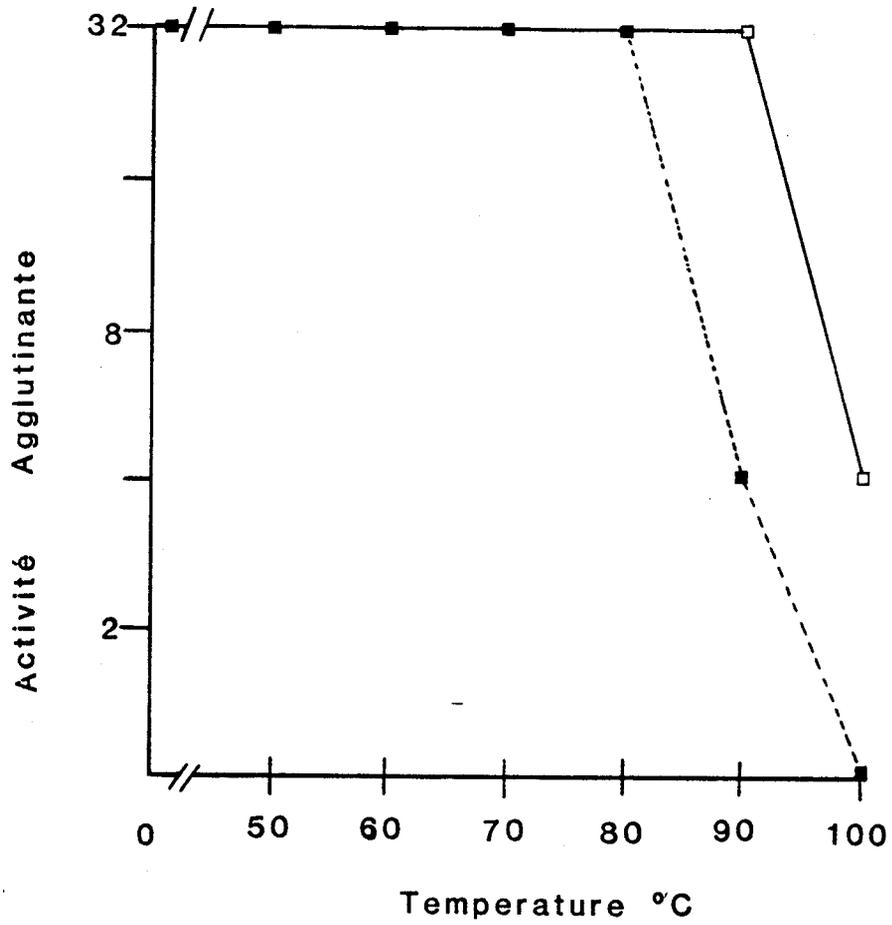


Figure 15

Effet de la température sur l'activité hémagglutinante des lectines F I (□—□) et F II (■—■) de Machaerocereus eruca .

T A B L E A U XXIII

EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES
LECTINES F I ET F II DE Machaerocereus eruca .

TEMPERATURE (° C)	TEMPS D'INCUBATION (MINUTES)	TITRE DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE	
		F I	F II
0	15	32	32
	30	32	32
	60	32	32
	90	32	32
	120	32	32
35	15	32	32
	30	32	32
	60	32	32
	90	32	32
	120	32	32
70	15	32	32
	30	32	32
	60	32	16
	90	16	8
	120	4	0
100	1	16	0
	5	0	0



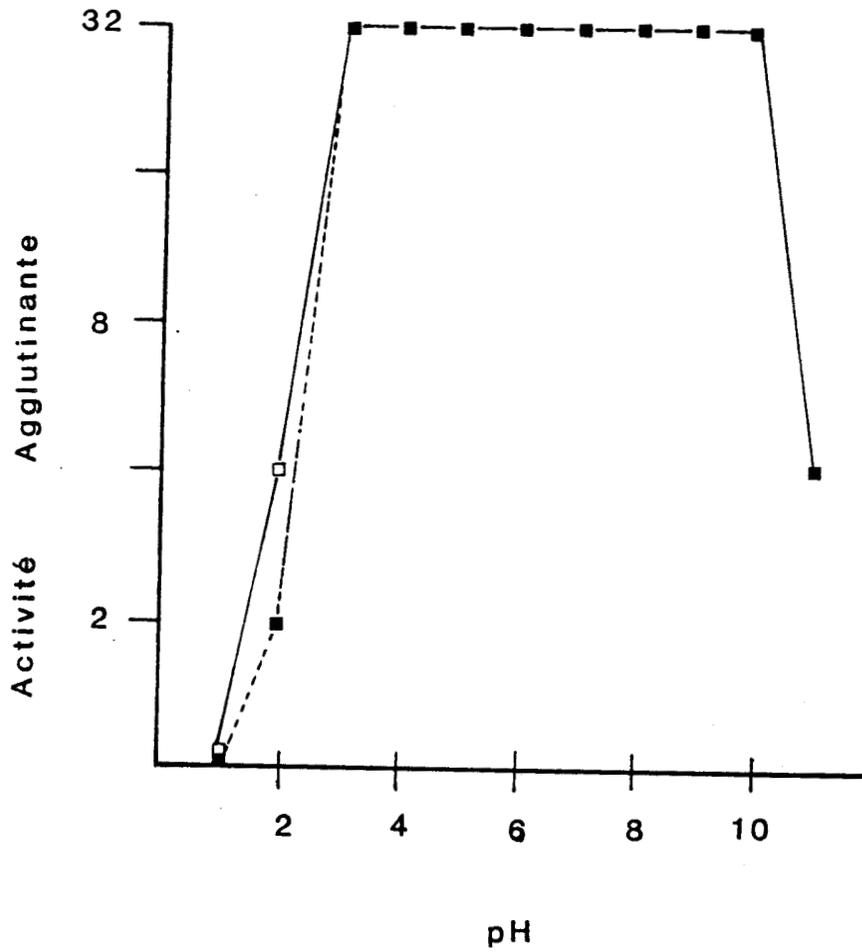


Figure 16

Effet du pH sur l'activité hémagglutinante des lectines F I (□—□) et F II (■—■) de Machaerocereus eruca .

tination. D'autre part, le traitement des hématies par la glutaraldéhyde permet d'augmenter la stabilité des cellules tout en respectant apparemment leurs récepteurs membranaires pour les lectines (Avrameas et al, 1970); en utilisant ce type d'hématies, il est possible de mesurer le titre de l'activité agglutinante en utilisant comme tampon une solution de glycolle ajustée aux différents pH. L'utilisation des deux systèmes, avec des hématies non fixées ou avec des hématies fixées par la glutaraldéhyde fournit les mêmes résultats, ce que nous permet de conclure que le pH entre 3 et 9 n'affecte pas l'activité agglutinante des deux lectines.

C. La présence d'un agent chélateur des métaux comme l'EDTA, ne modifie pas l'activité des lectines et l'addition de métaux divalents tels que le Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} ou le mélange de ces métaux ne provoque aucune modification dans le titre de l'activité agglutinante des lectines, tableau XXIV, ce qui montre que les deux lectines du cactus M. eruca ne sont pas des métalloprotéines. D'autres lectines comme la ConA ou Vicia graminea par exemple, au contraire sont particulièrement sensibles aux effets de l'EDTA, mais leurs activités agglutinantes sont restaurées par addition des cations spécifiques de chaque lectine (Lis et Sharon, 1977; Goldstein et Hayes, 1978; Duk et Lisowska, 1984).

D. L'activité agglutinante des lectines varie sensiblement quand elles sont incubées à différentes concentrations en NaCl, comme le montre la figure 17, et l'absence en sel provoque certaines modifi-

T A B L E A U XXIV

EFFETS DES AGENTS CHIMIQUES SUR L'ACTIVITE AGGLUTINANTE DES
LECTINES F I ET F II DE Machaerocereus eruca.

AGENT	CONCENTRATION	TITRE DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE	
		F I	F II
Ca ⁺⁺	5 mM	32	32
Mg ⁺⁺	5mM	32	32
Mn ⁺⁺	5 mM	32	32
Zn ⁺⁺	5 mM	32	32
EDTA (DYALISE)	10 mM	32	32
UREE	4 M	8	8
ETHYLENEGLYCOL	25 %	8	32



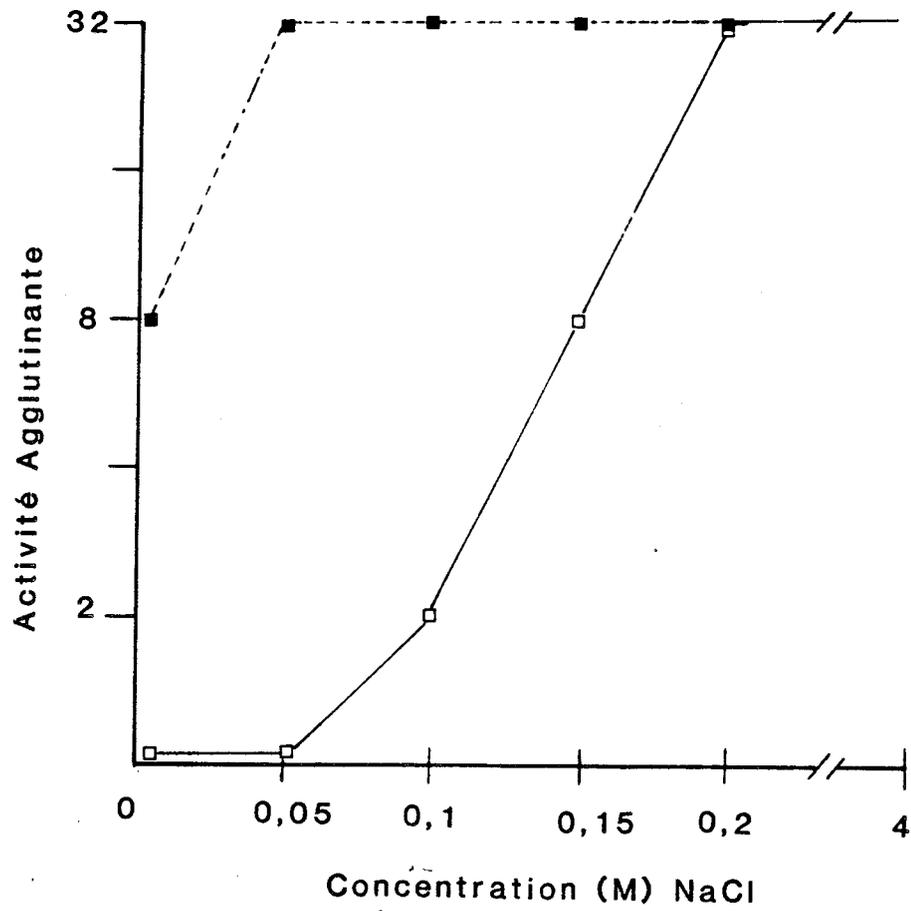


Figure 17

Effet de la concentration en NaCl sur l'activité hémagglutinante des lectines F I (□—□) et F II (■—■) de Machaerocereus eruca

cations de la molécule que ne permettent plus à la lectine de reconnaître leurs récepteurs à la surface cellulaire. Le fait d'utiliser les deux systèmes proposés permet de montrer que l'absence d'activité pour de faible concentration en NaCl de 0 à 0,005 M est due à une modification des lectines et non à une modification de leurs récepteurs. La lectine F I se montre plus sensible à l'absence de sel dans le milieu, ce qui pourrait expliquer son comportement lors de l'éluion de la colonne de mucine-sépharose, et indiquerait que la présence des groupes hydrophobes dans la molécule joue un rôle important dans le mécanisme de reconnaissance lectine-récepteurs.

E. L'addition de certains agents chimiques comme l'urée ou l'éthylène glycol, capables de modifier la structure de la molécule par la rupture des ponts hydrogènes dans le cas du polyéthylène glycol, ne modifie pas l'activité agglutinante des lectines F I et F II, tableau XXIV.

3. CONCLUSION.

Les deux lectines du cactus Machaerocereus eruca sont des protéines thermostables puisque des incubations d'une heure entre 0 et 70°C ne modifient pas leurs activités agglutinantes. Les lectines de Machaerocereus eruca peuvent être considérées comme des exemples de protéines non dépendantes des ions métalliques, car leur activité n'est pas modifiée ni par l'addition d'agents chélateurs tel que l'EDTA, ni par des ions métalliques. L'interaction d'une lec-

tine avec ses récepteurs saccharidiques est mesurée habituellement à des pH physiologiques, mais l'utilisation des hématies fixées par la glutaraldéhyde, nous a permis de prouver que l'activité agglutinante des lectines de Machaerocereus eruca est stable de pH 3 à 10.

L'absence de sel dans le milieu d'incubation des lectines modifie la capacité des lectines à réagir avec leur substrat. Ces résultats nous suggèrent que des résidus d'acides aminés avec des caractéristiques hydrophobes participent activement dans le mécanisme de reconnaissance du substrat par les lectines F I et F II. Ce type d'interaction pourrait augmenter l'affinité des lectines pour d'autres glycoprotéines possédant aussi des caractéristiques hydrophobes telles que la mucine ou la fétuine (Sachdev et al, 1979).

Les agents chimiques capables de diminuer la polarité des protéines tel que le polyéthyléneglycol ou des agents dénaturants comme l'urée augmentent la solubilité de la lectine. Dans certains cas, cet effet augmente la spécificité de la lectine (Mäkela, 1957), mais dans notre étude, ils ne provoquent aucune modification dans le titre d'activité agglutinante des lectines F I et F II.

V SPECIFICITE DES LECTINES F I ET F II
POUR LES SUCRES.

- A. PURIFICATION DE GLYCANNES ET GLYCOPEPTIDES
- B. SPECIFICITE DES LECTINES.
- C. RESULTATS ET DISCUSSION.

A. PREPARATION DES GLYCANNES ET DES GLYCOSYLPEPTIDES DES
GLYCOPROTEINES,

1. MATERIELS.

Les glycanes et les glycosylpeptides utilisés dans cette étude ont été préparés à partir de la fœtuine de serum de veau foetal, grade III et de mucine d'estomac de porc, grade II, de la firme Sigma (Sigma fine chemicals, St; Louis Mo. U.S.A.) et à partir de stromas d'hématies humaines A⁺ et d'hématies d'âne, préparés comme décrit précédemment, p 69.

2. METHODES DE PURIFICATION .

Nous avons utilisé la méthode de β élimination décrite par Carlson (1966) pour libérer les glycanes liés O-glycosidiquement ; La glycoprotéine est incubée dans une solution de NaOH 0,05 M en présence de BH_4Na 1 M pendant 24 heures à 45°C, sous agitation constante. La réaction est arrêtée en plaçant la solution dans un bain de glace et en ajoutant un peu de Dowex 50 W x 8 (forme H⁺, 200-400 mesh), jusqu'à pH 6 environ. Cette solution est déssalée sur une colonne de Dowex 50 Wx8 (H⁺) (1,6x60 cm) avec rinçage de la colonne par 5 volumes de colonne d'eau distillée. Le filtrat est collecté et concentré et l'acide borique est éliminé par évaporation au buchi sous forme de méthyl borate par addition de méthanol distillé.

Les glycanes réduits sont ensuite purifiés par gel filtration sur une

colonne (1,6 x 60 cm) de Biogel P 2 équilibrée dans de l'eau distillée; les fractions renfermant les glycanes sont concentrées par évaporation.

Le repérage des sucres est effectué par dépôt de fractions aliquotes sur plaques de silice et révélation par pulvérisation du réactif à l'orcinol-sulfurique . La composition en sucres est estimée par la méthode de Dubois et al (1956) et les rapports molaires des sucres des différentes fractions après méthanolyse selon le protocole décrit dans la p 76 .

a. Purification des glycanes de la fétuine.

Après β -élimination les glycanes et les glycopeptides dessalés sont fractionnés par gel filtration sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 (1,8 X 134 cm) équilibrée avec un tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M pH 7,4 . Le débit de la colonne est de 9 ml/heure .

- Désialylation des glycanes et des glycosylpeptides.

La fétuine native ainsi que les glycanes ou les glycosylpeptides sont désialylés par action de l'acide trifluoroacétique 0,1 M, 1 heure à 80°C. L'acide trifluoroacétique est évaporé sous courant d'azote et l'acide sialique libéré est éliminé par gel filtration sur une colonne de Biogel P 2 équilibrée dans de l'acide acétique à 1%.

- Dégalactosylation.

La fétuine et les N-glycosylpeptides préalablement désialylés sont

incubés en présence de β D-galactosidase de la fève jack (EC 1,2,3, 23)⁺; Une micromole de substrat est dissoute dans du tampon phosphate disodique 0,02 M- acide citrique 0,01 M pH 3,5. On ajoute 1 à 2 unités d'enzyme et on incube 1 heure à 37°C . La réaction est arrêtée en plaçant le mélange enzyme-substrat à 100°C pendant 1 minute. Le galactose libéré et l'enzyme sont éliminés par gel filtration sur Biogel P 2. La spécificité de l'enzyme est résumée dans le tableau XXV.

b. Purification des glycanes des hématies.

Les stromas préparés selon la technique décrite précédemment (p69) sont délipidés par extraction séquentielle dans le système chloroforme/ méthanol 2:1 (v/v) trois fois et puis chloroforme/methanol 1:2 (v/v). Après centrifugation, le surnageant est éliminé, le culot protéique séché sous courant d'azote et soumis à une β élimination. Les glycanes et les glycosylpeptides libérés sont ensuite séparé par gel filtration sur une colonne (1,6 x 80 cm) de Biogel P 4 équilibrée avec de l'eau distillée à un débit de 9 ml/ heure.

c. Purification des glycanes de mucine d'estomac de porc.

Après β -élimination, les glycanes libérés sont séparés par gel filtration sur une colonne d'Ultrogel ACA-202 (1,8 x 134 cm) équilibrée avec un tampon Tris-NaCl pH 7,4. Quatre fractions sont

+

Nous remercions le Prof. S. Bouquelet pour le don d'enzyme purifiée..

T A B L E A U XXV

SPECIFICITE DE LA β -D-GALACTOSIDASE DE LA FEVE JACK (EC 1,2,3,23)

SUBSTRAT	ACTIVITE (EN %)
Gal β 1- 6 GlcNac	100
Gal β 1 -4 GlcNac	75
Gal β 1- 3 GlcNac	1
Gal β 1- 4 Glc	41
Gal β 1- 6 Man	19



ainsi obtenues (fractions A,B,C,D); ces glycanes après β -élimination sont fractionnés par gel filtration sur une colonne de Biogel P 4 (1,6x80 cm) équilibrée avec de l'eau distillée, trois fractions principales sont alors séparées (fractions I,II et III) qui sont ensuite sous-fractionnées par chromatographie liquide à haute performance.

(HPLC): On utilise deux systèmes différents:

I. Chromatographie en phase reverse sur une colonne Ultrasphère ODS, 25 cmx 4,6 mm (Brown lee labs,USA) contenant de la silice greffée avec des groupes Octyls. Le débit est de 1 ml/minute, le déroulement de l'enregistreur se fait à une vitesse de 0,5 cm/minute, les oligosaccharides sont détectés à 200 nm à une sensibilité de 0,8 et avec une atténuation de 8 .

L'éluant initial est constitué par de l'eau et après 10 minutes de chromatographie, l'élution est effectuée avec de l'acétonitrile à 10%.

II. Chromatographie sur une colonne d'échange d'ions. Les glycanes de la fraction II de mucine sont chromatographiés sur une colonne Amino-spheri 5, 25 cmX 4,6 mm (Brownlee,labs USA), contenant de la silice greffée avec des groupes aminopropyls (APS) . Le débit de colonne est de 1 ml/ minute, le déroulement se fait à une vitesse de 0,5 cm minute. Les oligosaccharides sont détectés à 200 nm à une sensibilité de 0,8 et à une atténuation de 4 .

On réalise un gradient d'élution selon le tableau suivant:

TEMPS	ACETONITRILE	EAU
0	70%	30%
20	60%	40%
40	50%	50%

toutes les fractions recueillies sont ensuite dessalées par gel filtration sur une colonne de Biogel P 2 .

3. RESULTATS ET DISCUSSION SUR LA PREPARATION DES GLYCANNES.

- a. La β -élimination et la gel filtration nous ont permis de séparer plusieurs fractions glycaniques de la fétuine et de stromas d'hématies humaines et d'hématies d'âne.
- b. Nos résultats confirment que la fétuine renferme des glycanes liés O-glycosidiquement (Graham, 1972; Spiro et Bhayroo, 1974). Ce type de glycanes est également présent sur la glycophorine, mais dans ce cas il y a 15 chaînes liées O-glycosidiquement sur la protéine (Marchesi et al, 1976; Ogata et Loyd, 1982) .
- c. D'autre part, les fractions de masse moléculaire plus élevée: F I de fétuine et de F I et F II obtenues à partir des deux types de stromas (tableaux XXVI et XXVII) correspondant aux chaînes liées N-glycosidiquement, libérées dans les conditions de β -élimination utilisées, sous forme de glycosylpeptides (Debray et al, 1985), et correspondant dans le cas de la fétuine aux glycanes triantennés (Nilsson et al, 1979; Yoshima et al, 1980).
- d. Il faut remarquer que la fraction I obtenue à partir des stromas d'hématies A⁺ est faiblement sialylée et pourrait renfermer les oligosaccharides provenant de la bande 3 glycoprotéine comme l'ont proposé Tsuji et al (1980) .
- e. La purification des chaînes oligosaccharidiques très hétérogènes



T A B L E A U XXVI

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES GLYCANNES DE LA FETUINE LIES PAR UNE LIAISON
 N-GLYCOSIDIQUE ET PAR UNE LIAISON O -GLYCOSIDIQUE AINSI QUE DES GLYCANNES
 DESIALYLES OU DEGALACTOSYLES

NATURE DES MONOSACCHARIDES	GLYCANNES LIES N -GLYCOSIDIQUEMENT		GLYCANNES LIES O-GLYCOSIDIQUEMENT	
	NATIFS	N-GLYCANNE (F I) DESIALYLES ET DEGALACTOSYLES	NATIFS	O-GLYCANNE (F II) DESIALYLES
FUCOSE	0	0	0	0
GALACTOSE	4	4	1,9	1,3
MANNOSE	3,	3,	0	0
GlcNAC	3,6	4,1	0	0
GalNAC	0,8	0	0	0
GalNAC-ol	0	0	1	1
NeuAC	2	0	1,3	0

T A B L E A U XXVII

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE STROMAS HUMAINS ET D'ÂNE,
OBTENUES PAR GEL FILTRATION, APRES β -ELIMINATION

NATURE DES MONOSACCHARIDES	F R A C T I O N					
	I		II		III	
	HUMAIN	ÂNE	HUMAIN	ÂNE	HUMAIN	ÂNE
FUCOSE	8,68	0,6	1,8	0,6	0	0
GALACTOSE	4,6	2,6	2,2	0,5	5	7,9
MANNOSE	3	3	3	3	0	0
GlcNAC	3	2,7	4	0,7	0	0
GalNAC	1,6	0,2	0	0	0	0
GalNAC-ol	0	0	0,25	1	1	1
NeuAC	0,28	0,7	0,4	0	2,1	1,7



de mucine (tableau XXVIII et XXIX) a nécessité l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques (figure 18). les deux systèmes de chromatographie liquide à haute performance utilisés ont permis l'obtention de plusieurs fractions saccharidiques avec d'excellents rendements (90 à 95 % de récupération des glycanes injectés).

La colonne ODS de chromatographie en phase reverse donne un temps de rétention élevé pour les oligosaccharides possédant une taux élevé en groupements acétamide, car ces sucres ont une hydrophobicité relative plus grande par rapport à des sucres renfermant plus de fonctions hydroxyles, comme cela est résumé dans le tableau XXX (Cheetman, et al, 1981; Hounsell et al, 1984 et 1985).

Dans le cas de la mucine d'estomac de porc, comme le montre le tableau XXXI et la figure 19, un degré élevé de rétention est observé pour des glycanes plus complexes avec des temps de rétention supérieurs à 15 minutes, et par contre des temps de rétention courts sont observés avec les fractions plus légères, fraction III de la figure 19. La fraction II de mucine présente quant à elle des temps de rétention intermédiaires.

Cette fraction II, injectée sur une colonne amino peut être séparée en plusieurs glycanes, en fonction de leur masse moléculaire en utilisant comme systèmes d'élution soit un mélange acétonitrile/eau (Ng Ying Kin et Wolfe, 1980; Boersma et al, 1981; Warren et al 1983) ou un tampon phosphate (Bergh et al, 1981; Parente et al, 1984).

f. Les figures 19 et 20, présentent le profil d'élution de la

T A B L E A U XXVIII

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE MUCINE
 D'ESTOMAC DE PORC OBTENUES PAR GEL FILTRATION SUR ULTROGEL
 ACA-202 APRES β -ELIMINATION.

NATURE DES MONOSACCHARIDES	F R A C T I O N			
	A	B	C	D
FUCOSE	5,3	2,2	4	2,6
GALACTOSE	6,8	6,1	9	7,4
MANNOSE	0	0	0	0
GlcNac	3,7	3,6	6	6,3
GalNac	3,3	1	1	0,7
GalNac-ol	1	1	1	1
NeuAC	0	0	0	0



T A B L E A U XXIX

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE MUCINE
D'ESTOMAC DE PORC OBTENUES PAR GEL FILTRATION SUR BIOGEL P 4
APRES β -ELIMINATION

NATURE DES MONOSACCHARIDES	F R A C T I O N		
	I	II	III
FUCOSE	1,3	0,8	0,8
GALACTOSE	2,4	2,7	1
MANNOSE	0	0	0
GlcNac	2,8	2,94	1,4
GalNac	0,92	1	0
GalNac-ol	1	1	1
NeuAc	0	0	0



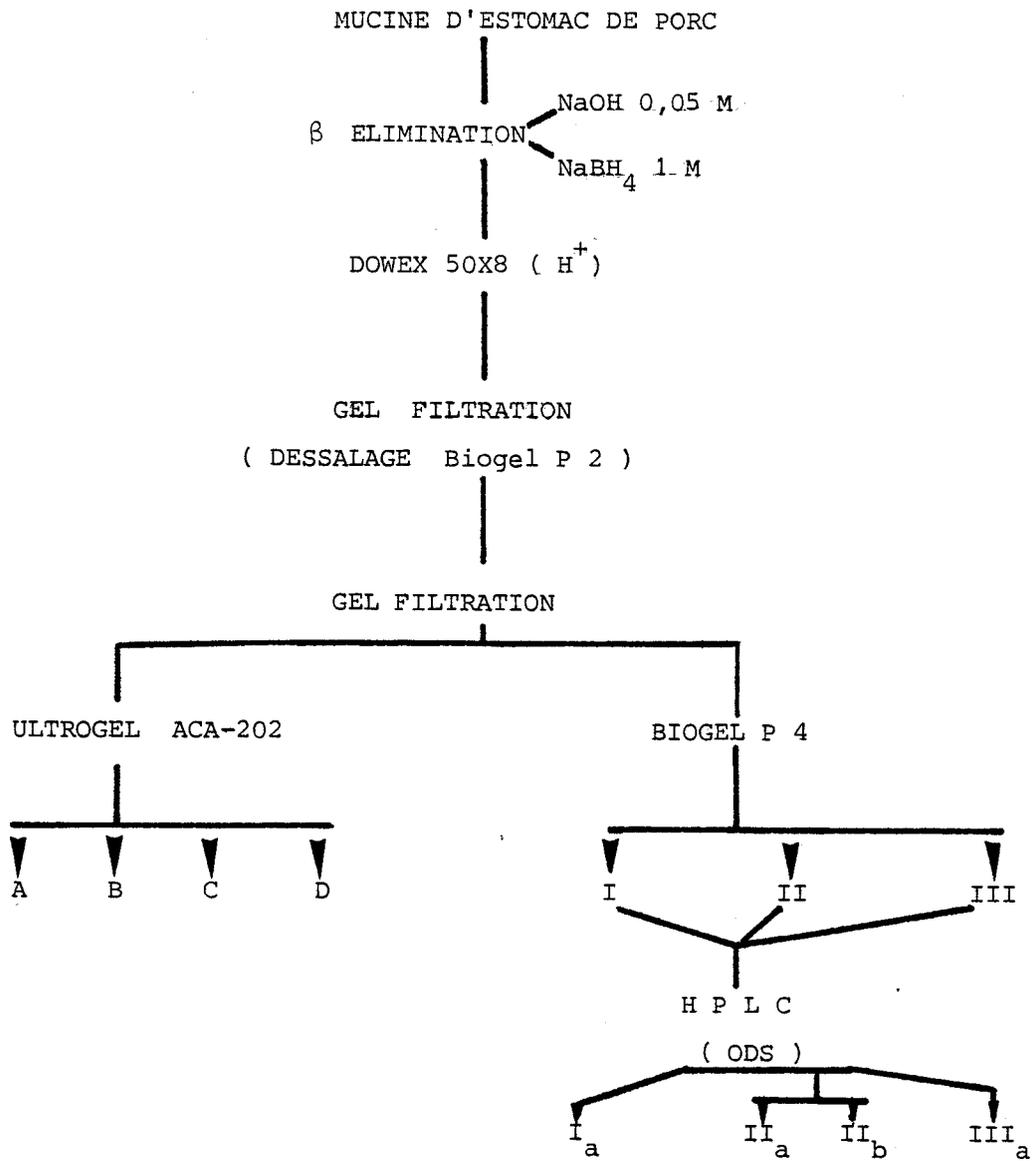


Figure 18

SCHEMA DE PURIFICATION DE GLYCANNES DE LA MUCINE D'ESTOMAC DE PORC .



T A B L E A U X X X
 H P L C D E S O L I G O S A C C H A R I D E S I S O L E S D U M E C O N I U M ⁺

OLIGOSACCHARIDES	TEMPS DE RETENTION	
	(minutes)	
	ODS	APS
GalNac-ol	3,8	6,8
Galβ 1,3 GalNac-ol	3,6	10,6
GalNacβ 1,3 GalNac-ol	4,4	10,6
GlcNacβ 1,3 GalNac-ol	4,9	10,1
Galβ 1,3 GlcNacβ 1,3 GalNac-ol	5,9	12,9
Galβ 1,4 GlcNacβ 1,3 GalNac-ol	5,1	12,9
Galβ 1,4 GlcNacβ 1,6 GalNac-ol	5,1	13,8
GlcNacβ 1 6 3 GalNac-ol	4,0	13,8
Galβ 1 3 GalNac-ol		
Galβ 1,4 GlcNacβ 1		
 6 GalNac-ol 3 Galβ 1	4,2	16,0



⁺ Hounselle et al, 1985

T A B L E A U XXXI

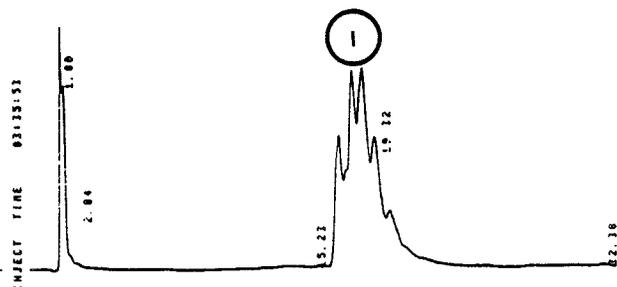
RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES FRACTIONS GLYCANNIQUES DE MUCINE
D'ESTOMAC DE PORC OBTENUES PAR HPLC SUR UNE COLONNE ODS⁺

FRACTION	TEMPS DE RETENTION (minutes)	NATURE DES MONOSACCHARIDES						
		(%)	FUCOSE	GALACTOSE	GlcNAc	GalNAc	GalNAc-ol	
I	19,84	84	2	3	3	1	1	
II A	8,08	34	0	3,	4,1	0	1	
II B	10,9	25	1,5	2,8	2,9	1	1	
III A	4,86	33	0	2,1	4,2	0	1	

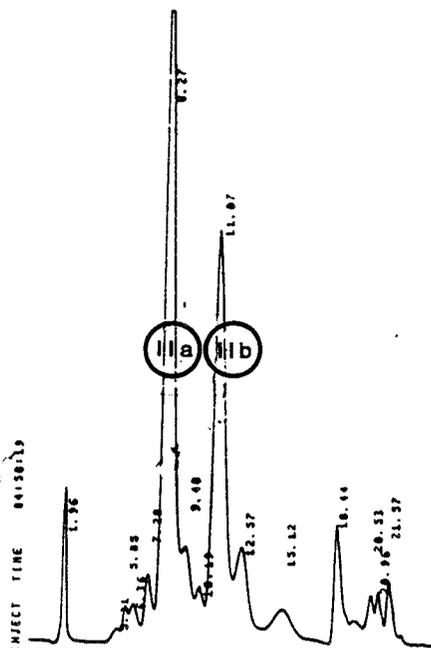
⁺ Dans ce tableau, seules les fractions les plus représentatives de chaque profil d'éluion sont considérées. Le pourcentage relatif de chaque pic est indiqué. (voir Fig 19)



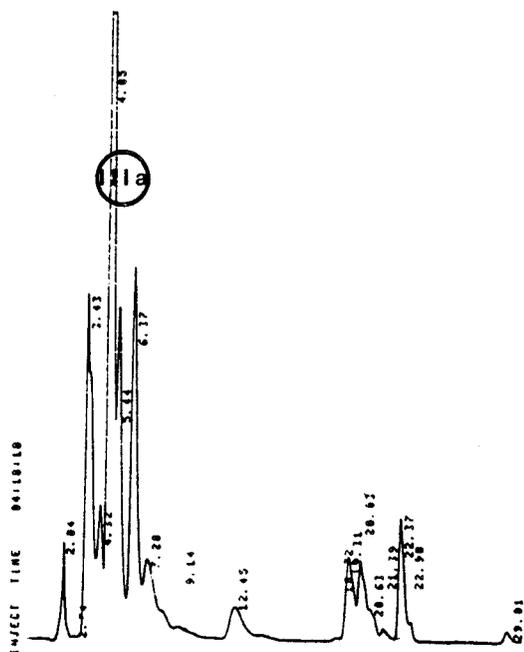
MUCINE FRACTION



I



II



III



TEMPS DE RETENTION (min)

Figure 19

Analyse des oligosaccharides obtenus par β -élimination de la mucine d'estomac de porc sur colonne ODS (120 ug de sucre pour chaque fraction ont été déposés)

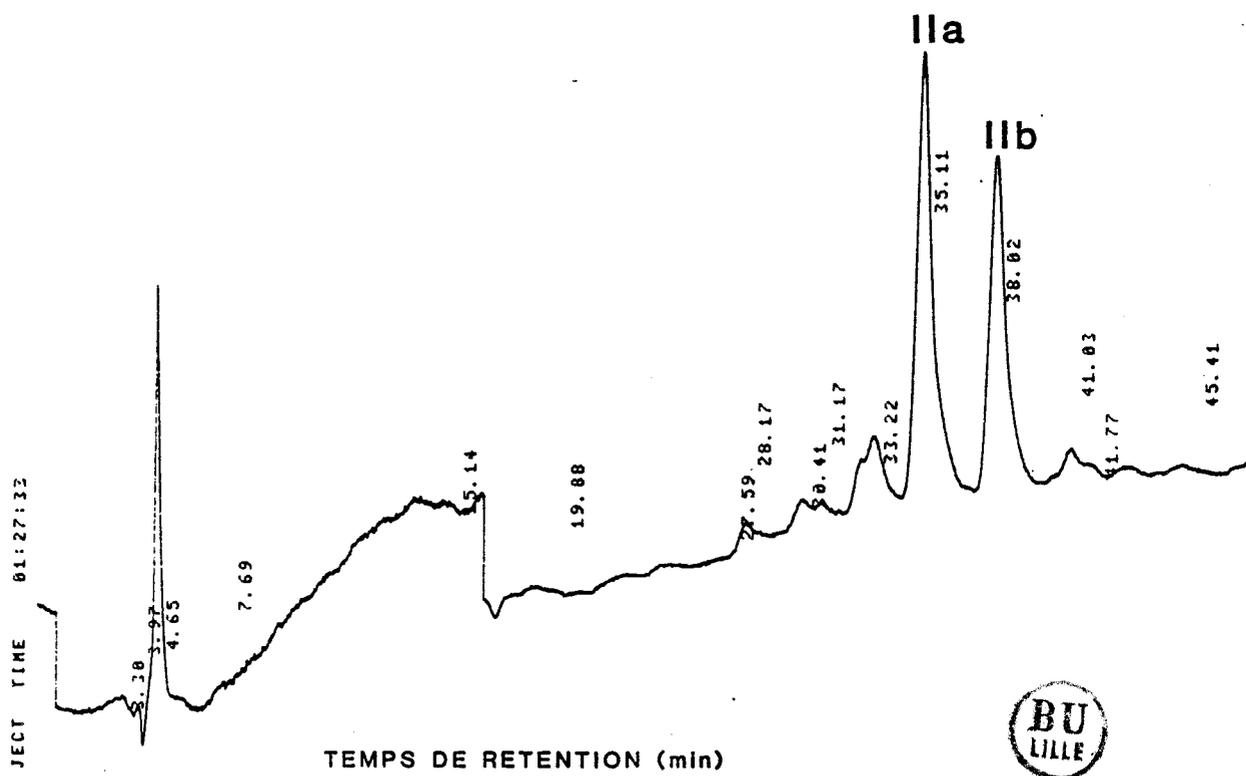


Figure 20

Analyse des oligosaccharides obtenus par β -élimination de la mucine d'estomac de porc sur colonne APS (260 ug de sucre de la fraction II de mucine ont été déposés) .

fraction II de mucine, obtenu avec les deux systèmes HPLC utilisés; on constate l'existence de deux groupes oligosaccharidiques principaux, L'étude des rapports molaires met en évidence une corrélation entre les glycanes de la fraction moins hydrophobe obtenue avec la colonne ODS et les glycanes de la fraction II a, obtenue avec la colonne ABS, ces glycanes renferment des résidus de galactose, de N-acétyl-D-glucosamine et du N-acétyl-D-galactosaminitol dans les rapports molaires 2:4:1 et 3:4:1 respectivement; une corrélation existe également pour les glycanes présentant des temps de rétention plus élevés dans les deux systèmes et qui renferment du fucose, du galactose, de la N-acétyl-D-glucosamine et du N-acétyl-D-galactosaminitol dans les rapports molaires 1,7:2,5:3,1:1 et 1,5:2,95:2,89:1 tableau XXXII

Comme on peut le constater dans les deux systèmes, en plus de la taille moléculaire, la différence bien que faible dans le temps de rétention est liée à la présence des résidus de fucose .

T A B L E A U X X X I I .

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES FRACTIONS GLYCANNIQUES
DU PIC II DE MUCINE D'ESTOMAC DE PORC OBTENUES PAR HPLC
SUR COLONNES ODS ET APS ⁺

NATURE DES MONOSACCHARIDES	F R A C T I O N			
	ODS		APS	
	I	II	I	II
FUCOSE	0	1,5	0	1,68
GALACTOSE	3	2,9	1,9	2,5
GlcNAc	4,1	2,9	3,6	3,1
GalNAc-ol	1	1	1	1
GalNAc	0	1	0	1

⁺ Silice avec des groupes octyles (ODS) ou amino (APS)



B. SPECIFICITE DES LECTINES .

I. MATERIELS,

Pour déterminer la spécificite des lectines de cactus nous avons essayé d'inhiber l'activité agglutinante par des sucres, glycannes, glycosylpeptides ou glycoprotéines.

Pour cette étude ont été utilisées des glycoprotéines: mucine d'estomac de porc, fétuine ainsi que des glycosylpeptides ou des glycannes préparés a partir de ces glycoprotéines, ou à partir des membranes d'hématies humaines de groupe A ou d'âne (voir chapitre précédent). D'autres glycoprotéines ou glycannes possédant des structures connues ont aussi été utilisés: α 2,3 et α 2,6 sialyl lactose du lait humain et mucine sous-maxillaire de mouton préparés par les Dr. G. Strecker et J.C. Michalski⁺; la sérotransferrine humaine, la lacto transferrine humaine, les IgA du sérum et du lait humain, ainsi que les glycannes liés O-glycosidiquement des IgA, ont été préparés par le Prof. G. Spik et Dr. A. Pierce-Cretel⁺; l'orosomucoide (α_1 -glycoprotéin acide) et les glycosylpeptides d'ovomucoide de poule ont été préparés au laboratoire par H. Debray. Les structures des glycannes utilisés dans cette étude sont resumées dans la figure 21.

2. METHODES

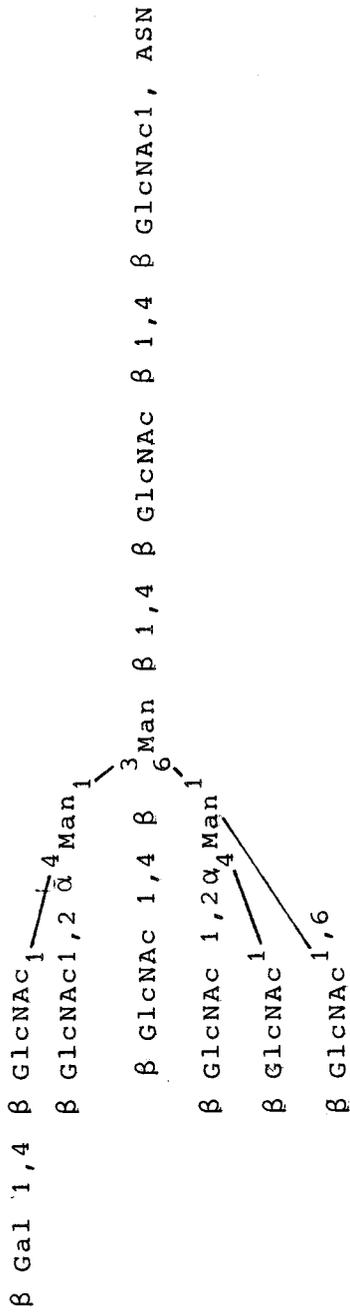
a; La dilution sériée de la lectine est réalisée sur une plaque de

+

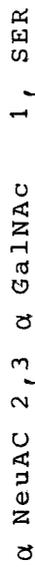
Nous tenons à remercier ces personnes pour leur appréciable collaboration



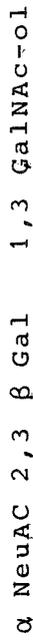
6. OVOMUCOIDE DE POULE



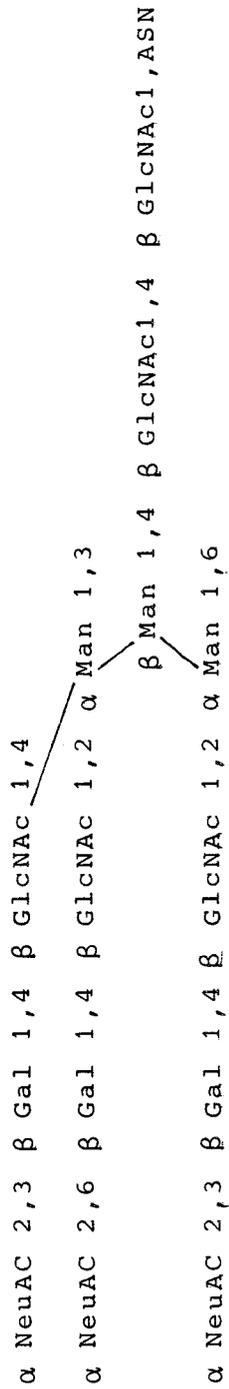
7. MUCINE SOUSMAXILLAIRE DU MOUTON.



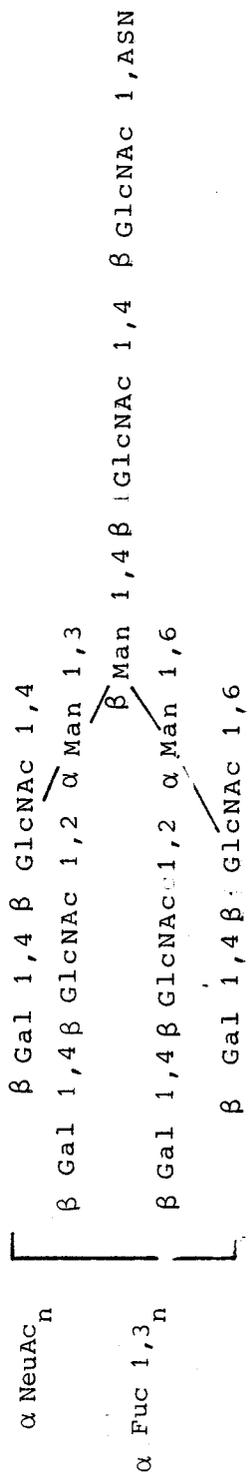
8. GLYCANNES D'IGA SERIQUES HUMAINES, OU ISOLEES A PARTIR DE LA FETUINE DU SERUM DE VEAU



9 N-GLYCOSYLPEPTIDE PREPARE A PARTIR DE LA FETUINE DE SERUM DE VEAU FOETAL



10 OROSOMUCOIDE



Montreuil, 1982



microtitration comme décrit p 80 , mais deux heures ayant d'ajouter la suspension d'hématies à 2% dans PBS, à chaque dilution de lectine est ajouté un volume égal d'une solution renfermant les sucres à une concentration de 0,1 M .

Le résultat est déterminé en comparant le titre d'activité de la lectine en présence de sucre, par rapport à son titre lorsqu'elle est incubée en présence du PBS seul. Le sucre est inhibiteur lorsque le titre diminue.

b. Une méthode plus fine nécessite l'utilisation d'une dilution de la lectine avec un titre de 4 (considérée aussi comme 4 unités hémagglutinantes: UHA) on prépare sur une plaque de microtitration une dilution sériée des sucres, glycannes, glycosylpeptides ou glycoprotéines dont on veut déterminer le pouvoir inhibiteur, puis on ajoute dans chaque puits un volume égal d'une dilution de lectine renfermant les 4 doses agglutinantes. On incube 2 heures à température ambiante et on ajoute ensuite un volume égal d'une suspension d'hématies à 2% . On détermine ainsi la concentration minimale de sucre capable d'inhiber l'activité agglutinante.

3. RESULTATS.

Les deux lectines de Machaerocereus eruca purifiées par chromatographie d'affinité, sont inhibées par des sucres simples: le galactose 0,1 M est capable d'inhiber 75% de l'activité agglutinante de la

lectine F II et 87,5% de la lectine F I; d'autre part, la même concentration en L-fucose ou en N-acétyl-D-galactosamine inhibe seulement 50% de cette activité, les autres sucres n'ont aucun effet sur l'agglutination provoquée par les deux lectines, tableau XXXIII .

L'addition des glycoprotéines décrites dans la figure 21 , et le tableau XXXIV à une concentration de 0,1 M inhibe toute l'activité hémagglutinante des lectines, à l'exception de l'ovalbumine qui n'est pas capable de modifier l'interaction de la lectine avec ses récepteurs à la surface des hématies. Afin de mesurer le pouvoir inhibiteur de chaque glycoprotéine, on a utilisé le protocole d'inhibition (b), décrit en détail p 147.

Les résultats de l'inhibition de l'activité agglutinante des lectines de Machaerocereus eruca par les glycoprotéines sont présentés dans le tableau XXXIV. Ce tableau montre que les O-glycosyl protéines représentées ici par les deux mucines, la fétuine et les deux espèces d'IgA sont 100 fois plus inhibitrices que les N-glycosyl protéines représentées par la sérotransferrine, la lactotransferrine et l'orosomucoïde. La désialylation chimique de la fétuine ou de la mucine de mouton ne provoque aucun changement significatif du pouvoir inhibiteur de ces glycoprotéines, tableau XXXIV .

Les glycannes et les glycosylpeptides de mucine et de fétuine après libération par β -élimination, sont encore inhibiteurs. Ces résultats rassemblés dans le tableau XXXV, montrent que les différents g

glycannes de mucine possèdent une activité inhibitrice identique à celle des glycoprotéines natives. Les asialoagalacto N-glycosylpeptides de fétuine ne sont plus inhibiteurs. Les différents glycannes libérés par β -élimination de stromas d'hématies humaines et d'âne sont capables d'inhiber l'activité agglutinante des deux lectines, tableau XXXV, cette activité est semblable à celle des glycannes de la fétuine et de la mucine.

Finalement, les glycannes de mucine d'estomac de porc purifiés sur les colonnes ODS et APS et correspondant aux fractions II b, figures 19 et 20, sont les meilleurs inhibiteurs des lectines F I et F II, tableau XXXV.

4. DISCUSSION.

Les études préliminaires sur la spécificité des lectines de Machaerocereus eruca, ont été l'objet d'une publication (Zenteno et al, 1986), qui montre que les lectines de M. eruca purifiées par chromatographie hydrophobe possèdent une spécificité très semblable envers les glycannes de la fétuine et de la mucine stomacale de porc. Ces résultats montrent que malgré son faible pouvoir inhibiteur de l'activité agglutinante, le galactose joue un rôle primordial dans le mécanisme de reconnaissance des structures des N-glycosylpeptides, car la forme asialo-agalacto du N-glycosylpeptide de la fétuine n'est plus reconnue par les lectines.

Cette similitude dans la spécificité est retrouvée également pour les deux lectines purifiées par chromatographie d'affinité.

Les résultats resumés dans les tableaux XXXIV et XXXV, et schématisés dans la figure 21, montrent que les glycoprotéines reconnues par les lectines possèdent du galactose, mais que les O-glycosylprotéines possédant un noyau gal β 1,3 galNAc représentent les structures pour lesquelles les lectines présentent une meilleure affinité. Si le noyau gal β 1,3 galNAc des liaisons O-glycosidiques est capable d'inhiber l'activité agglutinante, les glycanes obtenus des colonnes ODS et APS et renfermés dans la fraction IIB, sont cependant capables de provoquer le même effet, mais avec des concentrations 100 fois plus faibles, ce qui prouve que ce glycanne de la mucine d'estomac de porc, est le meilleur récepteur pour les lectines F I et F II de Machaerocereus eruca.

T A B L E A U X X X I I I

INHIBITION DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE DES LECTINES DE
Machaerocereus eruca PAR DES SUCRES SIMPLES (100 mM)

SUCRE	T I T R E	
	F I	F I I
CONTROLE	32	32
D-Galactose	4	8
N-acétyl-D-galactosamine	16	16
D-glucose	32	32
N-acétyl-D-glucosamine	32	32
L-fucose	16	16
D- mannose	32	32
D- mannosamine	32	32



T A B L E A U X X X I V

CONCENTRATION MINIMALE EN GLYCOPROTEINES (μM) NECESSAIRE
POUR INHIBER 4 DOSES HEMAGGLUTINANTES DE LECTINES F I
ET F II DE Machaerocereus eruca.

GLYCOPROTEINE	LECTINE	
	F I	F II
Mucine d'estomac de porc	0,04	0,02
Mucine sousmaxillaire de mouton	0,05	0,03
Mucine sousmaxillaire de mouton désialylée	0,02	0,01
Fétuine de sérum de veau foetal	0,01	0,005
Fétuine désialylée	0,002	0,001
IgA du lait humain	0,2	0,1
IgA du sérum humain	0,6	0,1
Orosomucoïde	210	105
Ovalbumine	N.I.	N.I.
Sérot transferrine humaine	25	3
Lactot transferrine humaine	12	1,5

N.I. Non inhibiteur à une concentration de 100 μM



T A B L E A U XXXV

CONCENTRATION MINIMALE EN GLYCANNES ET GLYCOPEPTIDES (μ M)

NECESSAIRE POUR INHIBER 4 DOSES HEMAGGLUTINANTES DE LECTINE F I

ET F II DE Machaerocereus eruca.

GLYCANNE	L E C T I N E	
	F I	F II
Glycannes de la fétuine	10	15
Glycannes désialylés de la fétuine	12,5	25
Glycopeptides de la fétuine	58	29
Glycopeptides désialylés de la fétuine	12	15
Glycopeptides de la fétuine désialylés et dégalactosylés	N.I.	N.I.
Mucine d'estomac de porc	F I	2
	F II	0,6
	F III	1,8
	F IIa	0,4
	F IIb	0,1
Glycannes de stromas humains	F I	36
	F II	2,4
	F III	12
Glycannes de stromas d'âne	F I	70
	F II	0,8
	F III	5
α 2,3 et α 2,6 sialyl lactose	N.I.	N.I.
Glycannes d'IgA du lait	70	35

N.I. Non inhibiteurs à une concentration de 100 μ M

VI PURIFICATION DES LECTINES

D'Amaranthus leucocarpus

A PURIFICATION DES LECTINES

B RESULTATS ET DISCUSSION

1. PREPARATION DE L'EXTRAIT D'Amaranthus leucocarpus

100 g de graines de A.leucocarpus sont broyées dans 1 litre de tampon phosphate 0,02 M/ NaCl 0,9% pH 7,4 (PBS) et mis sous agitation pendant 24 heures à 4°C. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 4 par addition d'acide acétique 4 N pour éliminer le matériel lipidique présent dans l'extrait. La solution est centrifugée à 3000x g pendant 20 minutes dans un rotor JA-20 (Beckman), puis on mesure l'activité agglutinante et la concentration en protéine de la solution surnageante.

2. PURIFICATION DE LA LECTINE

La lectine d'A. leucocarpus est purifiée sur une colonne de stromas d'hématies de lapin désialylées et piégés dans du séphadex selon la méthode décrite précédemment (p 71) et équilibrée dans PBS. 812 mg de protéines totales de l'extrait d'A. leucocarpus contenant 44800 unités hémagglutinantes sont injectés sur la colonne; le matériel non retenu est éliminé par lavage par le PBS jusqu'à retour à 0 de la densité optique à 280 nm. Ensuite, l'activité agglutinante est éluee par addition d'eau distillée. L'addition d'un tampon glycolle/HCl 0,2 M pH 2,5 permet ensuite l'élution d'une fraction qui ne possède pas d'activité agglutinante. On collecte des fractions de 2,1 ml à un débit de 9 ml/heure; la densité optique à 280 nm et l'activité agglutinante sont mesurées après avoir ajusté le pH et la force ionique par addition de tampon phosphate 0,2 M pH 7,4 .

3. CARACTERISATION CHIMIQUE DE LA LECTINE

a) Détermination de la concentration en protéine .

La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Lowry (1951) en utilisant une solution de sérum albumine comme témoin.

b) Détermination de la concentration en sucres.

La concentration en sucres est déterminée par la méthode décrite par Dubois et al (1956). Le lactose est utilisé comme témoin .

c) Pureté des fractions.

La pureté des fractions et la masse moléculaire de la lectine sont déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 10% et de β mercaptoéthanol selon la méthode décrite en détail p 74 . La masse moléculaire est déterminée par rapport à la migration de protéines de masse moléculaire connue, mentionnées p 74 .

d) Détermination des rapports molaires en sucres.

Les rapports molaires des monosaccharides sont déterminés par méthanolyse et trifluoroacétylation selon la méthode de Zanetta et al (1956) décrite en détail p76 .

e) Point isoélectrique.

Le point isoélectrique des fractions purifiées est déterminée par électrofocalisation en gel de polyacrylamide en présence d'ampholines pH 3,5 - 10, selon la technique présentée page 78 , mais dans ce cas,

on a utilisé deux systèmes; le premier en conditions normales, sans Triton X-100 et la deuxième en substituant le détergent par de l'urée 4 M; après électrofocalisation, le pH et l'activité agglutinante de chaque fraction de gel, élue par de l'eau distillée sont déterminés dans le premier système et dans le deuxième, les gels sont fixés et colorés au bleu de coomassie.

4. ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE.

Le pouvoir agglutinant de la lectine d'A. leuocarpus est mesuré par la méthode de double dilution sériée sur plaque de microtitration comme nous le décrivons en détail page 80. Pour cet essai, nous avons utilisé des hématies de différentes espèces animales et des hématies humaines de groupe A, B et O, natives ou traitées par la trypsine ou la neuraminidase selon les protocoles présentés p 80.

5. INHIBITION DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE PAR DES MONOSACCHARIDES, DES GLYCANNES, DES GLYCOSYLPEPTIDES ET DES GLYCOSYLPROTEINES.

Ce test a été effectué sur plaque de microtitration selon le protocole présenté page 143, en utilisant les monosaccharides, les glycanes, les glycosylpeptides et les glycosylprotéines mentionnés p 144.

6. PROPRIETES PHYSICOCHEMISTIQUES.

La résistance à la température, l'effet du pH, l'effet des ions métalliques, l'effet des agents dénaturants comme l'urée et l'éthyléneglycol ont été déterminés après incubation de la lectine dans différentes conditions par mesure de l'activité agglutinante. Les différents protocoles de traitement sont présentés p 113-114.

7. RESULTATS ET DISCUSSION

a) EXTRACTION DE LA LÉCTINE

L'extraction des protéines des graines d'*Amaranthus leucocarpus* nous a permis la récupération d'environ 8% des protéines des graines.

b) ACTIVITE AGGLUTINANTE

L'extrait brut d'*A. leucocarpus* est capable d'agglutiner les hématies humaines de groupe A,B ou O et les hématies de différentes espèces animales avec la même efficacité. Lorsque les hématies sont modifiées par les traitements enzymatiques avec la trypsine ou la neuraminidase, elles se montrent 4 fois plus sensibles à l'effet agglutinant de la lectine d'*A. leucocarpus*. (tableau XXXVI). Le traitement enzymatique modifie la structure des chaînes oligosaccharidiques exposées sur la membrane erythrocytaire et ceci se traduit par l'augmentation du titre d'agglutination de la lectine.

c) PURIFICATION DE LA LÉCTINE

L'utilisation de stromas d'hématies desialylées permet l'isolement

T A B L E A U X X X V

ACTIVITE AGGLUTINANTE DES EXTRAITS D'AMARANTHUS LEUCOCARPUS
EN PRESENCE D'HEMATIES NATIVES (N), OU MODIFIEES ENZYMA-
TIQUEMENT PAR LA TRYPSINE (T) OU LA NEURAMINIDASE (NE)

HEMATIES	LOT						
	I			TITRE	II		
	N	T	NE		N	T	NE
HUMAIN A	32	256	256	32	256	256	
HUMAIN B	32	256	256	32	256	256	
HUMAIN O	32	512	256	32	256	256	
LAPIN	128	512	1024	128	512	512	
MOUTON	32	256	256	32	128	256	
SOURIS	16	64	128	8	32	64	
RAT	16	64	32	16	32	32	
ANE	256	1024	1024	256	2048	1024	
BOEUF	0	32	16	ND	ND	ND	



ND; NON DETERMINEE.

quantitatif de toute l'activité agglutinante présente dans l'extrait d'A. leucocarpus. L'élution avec de l'eau distillée du matériel protéique retenu sur la colonne permet la récupération de 80% de l'activité agglutinante déposée et d'environ 5% des protéines totales de l'extrait; l'activité spécifique de la lectine purifiée par cette méthode augmente de 13 fois par rapport à celle de l'extrait brut. Une autre fraction qui ne possède pas d'activité agglutinante est ensuite éluee avec le tampon glycolle/HCl pH 2,5 , figure 22. Le procédé de purification est résumé dans le tableau XXXVII. Comme pour d'autres lectines telles que les lectines du cactus ou la lectine de Eranthis hyemalis (Cammue et al, 1985), l'élution de la matrice d'affinité par de l'eau distillée doit impliquer une dénaturation transitoire et réversible de la lectine.

L'avantage de ce type d'élution est représenté par le fait que la force ionique peut être ajustée plus facilement que dans les fractions de lectines éluées par addition d'un sucre spécifique et qu'il n'y a pas à dialyser la lectine éluee pour mesurer son activité biologique.

d) CARACTERISATION CHIMIQUE.

Au cours de nos études sur la lectine d'A. leucocarpus, nous avons utilisé deux lots différents de graines. Dans les deux cas, les lectines sont purifiées de la même façon et présentent le même comportement chromatographique avec le même rendement. Les deux purifications sont résumées dans le tableau XXXVII .

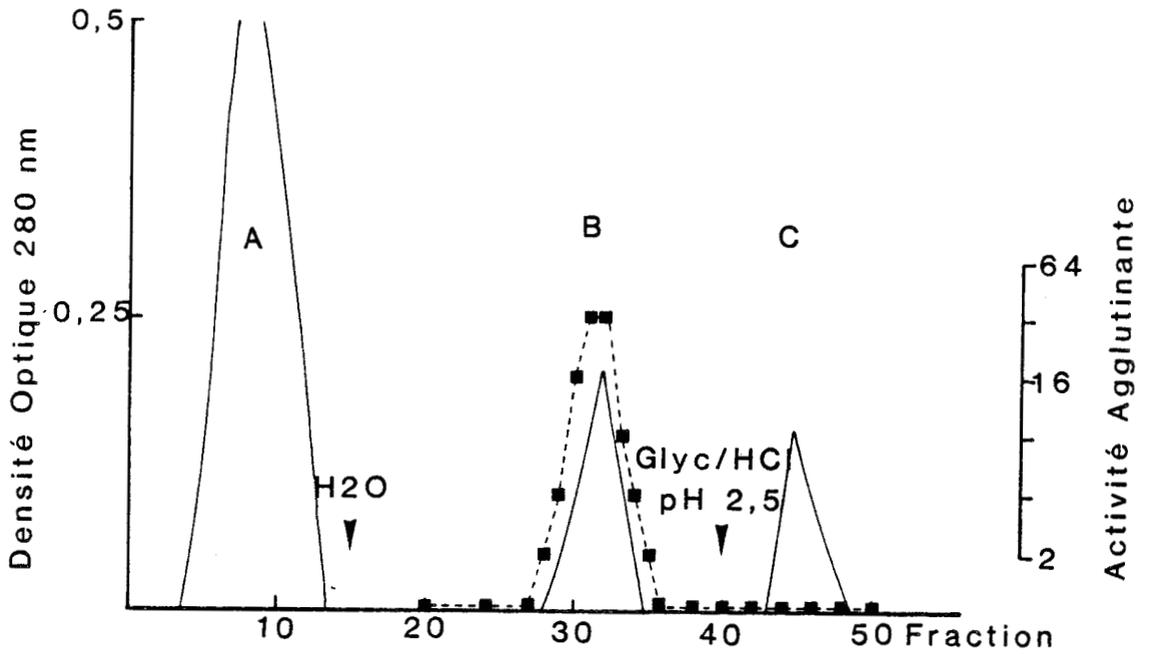


Figure 22

Profil d'élution de la lectine d'Amaranthus leucocarpus (812 mg d'extrait brut) sur une colonne de stromas d'hématies de lapin désialylées. La fraction non retenue (A) est éluée par le PBS. L'élution de l'activité agglutinante est obtenue par l'addition d'eau (B). Une autre fraction est éluée par un tampon glycolle/HCl pH 2,5 (C). La densité optique à 280 nm (—) et l'activité agglutinante avec des érythrocytes groupe A (■—■) sont mesurés .

PROCEDE DE PURIFICATION DES LECTINES D'Amaranthus leucocarpus
 SUR STROMAS D'HEMATIES DE LAPIN DESIALYLEES⁺

FRACTION	PROTEINE (mg)	%RENDEMENT	UNITES AGGLUTINANTES	ACTIVITE SPECIFIQUE	FACTEUR DE PURIFICATION
			L O T I		
BRUTE	812	100	44798	55,17	1
F A	503	62	0	0	0
F B	40	4,9	35838	894,6	16
F C	8,1	1	0	0	0
			L O T 2		
BRUTE	799	100	43000	53,9	1
F A	500	61,5	0	0	0
F B	48,8	6,1	35000	717,21	13
F C	1,1	0,14	0	0	0

⁺ SUR LA BASE DE 10 g DE GRAINES.



Les deux lectines obtenues sont des glycoprotéines qui renferment 10% de sucres pour la lectine purifiée à partir du lot de graines no; 1 et seulement 8% pour la lectine du lot no, 2. Les rapports molaires sont similaires pour les deux lectines qui renferment du mannose, de la N-acétyl-D-glucosamine, du galactose et du glucose dans les rapports 3:6:4:1 pour la lectine du lot no. 1 et de 3:7:5:1,5 pour la lectine du lot no 2. Elles ne renferment pas d'acide sialique, ni de N-acétyl-D-galactosamine; cependant, les deux lectines présentent des traces de xylose, tableau XXXVIII.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et β - mercaptoethanol, on peut constater que la lectine purifiée à partir du lot no. 1 possède 1 seul type de sous-unités de masse moléculaire de 33000 daltons, par contre, la lectine purifiée à partir du lot de graines no. 2 présente deux types de sous-unités d'environ 33000 et 31000 daltons, figure 23.

L'isofocalisation en gel de polyacrylamide en présence des ampholines de pH 3,5-10, montre que les lectines provenant des lots 1 et 2 possèdent 3 espèces moléculaires avec des pI de 4,8; 5 et 5,2, figure 24.

e) SPECIFICITE DES LECTINES D'Amaranthus leucocarpus.

Les tests d'inhibition de l'activité hémagglutinante des lectines d'Amaranthus leucocarpus résumés dans le tableau XXXIX montrent que pour les deux lectines, seule la N-acétyl-D-galactosamine est capa-

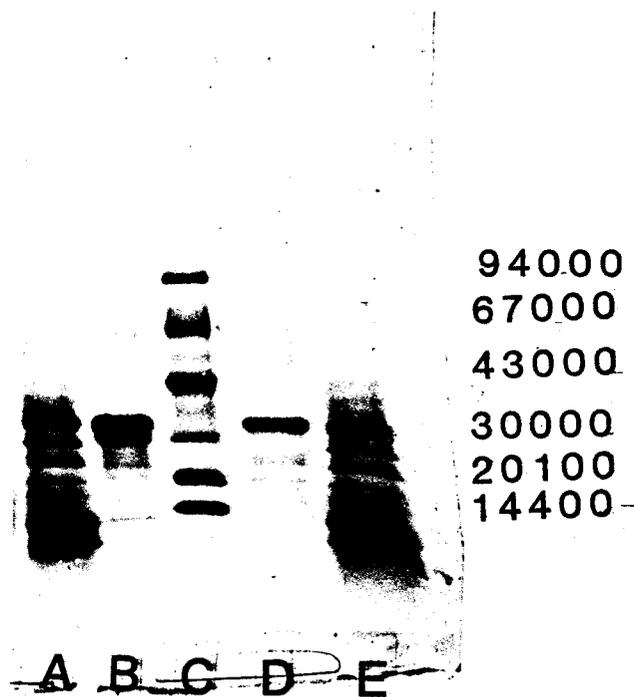


Figure 23

Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fractions d'Amaranthus leucocarpus purifiées par chromatographie d'affinité sur stromas d'hématies de lapin désialylées. A) 60 µg d'extrait brut lot no. 2 de A.leucocarpus; B) 40 µg de la fraction obtenue à partir du lot no. 2 par l'addition d'eau à la colonne de stromas; C) témoin de masse moléculaire; D) 25µg de la fraction obtenue à partir du lot no. 1 par addition d'eau à la colonne de stromas; et E) 50 µg d'extrait brut du lot no. 1

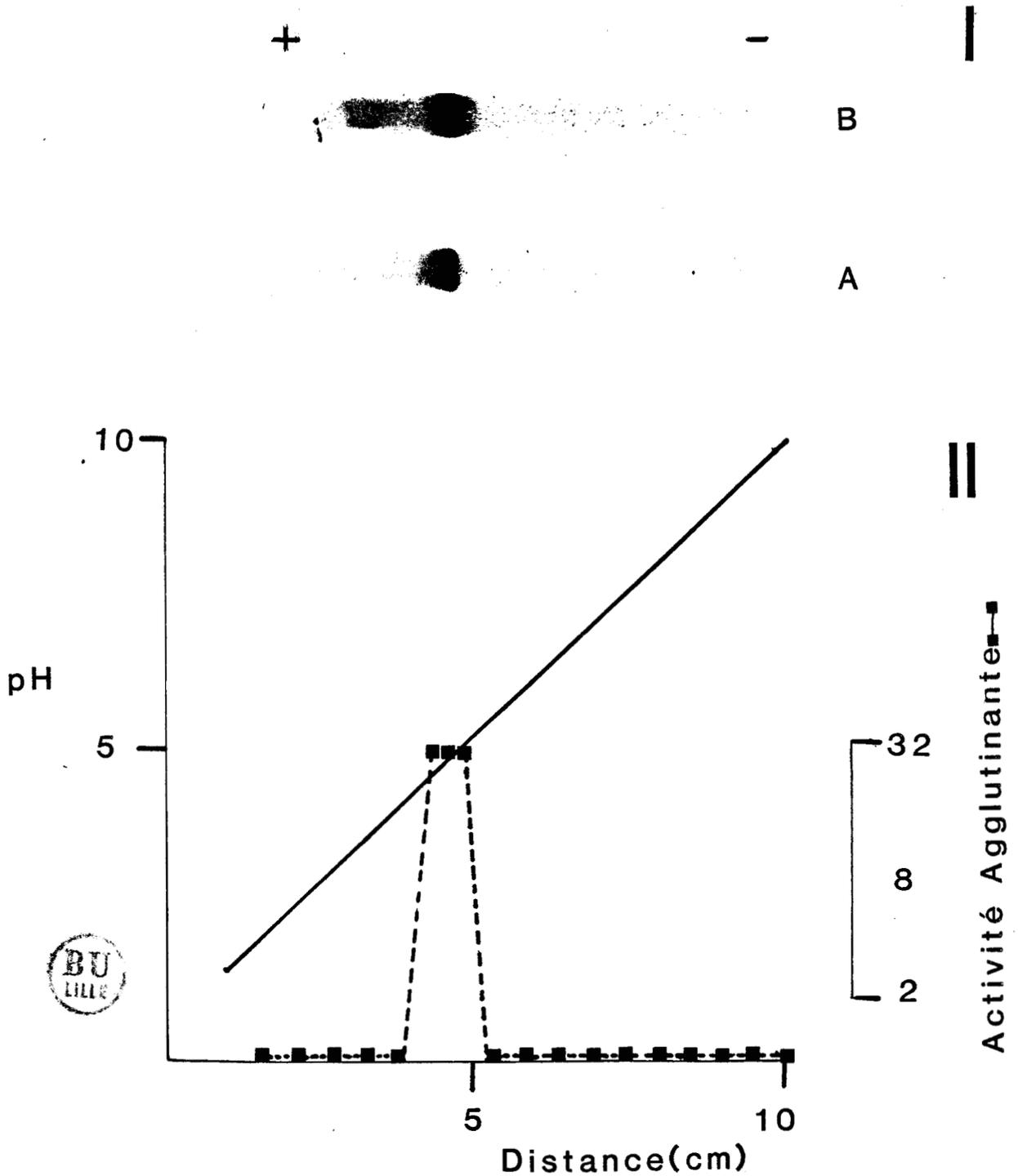


Figure 24

Isofocalisation en gel de polyacrylamide (gradient de pH de 3,5 à 10) de la lectine d'Amaranthus leucocarpus. I. Isofocalisation en présence d'urée 4M de 15 µg de lectine purifiée à partir du lot no. 1 (A) ou du lot no. 2 (B) sur stromas d'hématies de lapin. II. Schéma du gardient de pH dans des conditions non dénaturantes, correspondant aux lectines du lot 1 et 2; l'activité agglutinante vis-à-vis d'erythrocytes de groupe A (■—■) a été testée pour chaque fraction.

T A B L E A U XXXVIII

RAPPORTS MOLAIRES DES SUCRES DES LECTINES D'Amaranthus
leucocarpus .

NATURE DES MONOSACCHARIDES	LECTINE LOT	
	I	2
FUCOSE	0	0
XYLOSE	TRACES	TRACES
RHAMNOSE	0	0
GALACTOSE	4	5
GLUCOSE	1	1.5
MANNOSE	3	3
GalNAc	0	0
GlcNAc	6	7
NeuAc	0	0

Sur la base de 3 résidus de mannose .



T A B L E A U XXXIX

INHIBITION DE L'ACTIVITE AGGLUTINANTE DES LECTINES

D'Amaranthus leucocarpus PAR DES SUCRES SIMPLES (100 mM)

SUCRE	LECTINE LOT	
	I	2
CONTROLE ⁺	32	32
GALACTOSE	32	32
N-ACETYL-D-GALACTOSAMINE	2	2
GLUCOSE	32	32
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	32	32
MANNOSE	32	32
L-FUCOSE	32	32



TITRE D'ACTIVITE EN PRESENCE D'HEMATIES DU GROUPE HUMAIN A

ble d'inhiber 90% de leur activité agglutinante. Comme le montre le tableau XL, seules la fétuine du sérum de veau foetal, la mucine sousmaxillaire de mouton **et les deux types d'IgA**, sont capables d'inhiber l'activité agglutinante de ces deux lectines. La désialylation de la fétuine et de la mucine sousmaxillaire augmente leur pouvoir inhibiteur de l'activité agglutinante, mais la désialylation suivie d'une dégalactosylation de la fétuine réduisent de 10 fois le pouvoir inhibiteur de cette molécule; ce que suggère que les résidus de galactose jouent un rôle important dans le mécanisme de reconnaissance de la glycoprotéine.

L'utilisation des glycannes et de glycosylpeptides purifiés après β -élimination par gel filtration (structures présentées dans la figure 21) montrent que seuls les glycannes liés O-glycosidiquement de la fétuine, les fractions II et III de membranes d'hématies d'âne et humaines de groupe A, et les glycannes d' IgA sont reconnus par les deux lectines , tableau XLI .

Les deux lectines présentant une spécificité pour les résidus de N-acétyl-D-galactosamine, on s'attendrait à ce que ces lectines agglutinent préférentiellement les hématies humaines de groupe A, mais ce n'est pas le cas, car les hématies humaines des groupes B ou O sont agglutinées de la même façon par les lectines. D'autre part, la mucine sousmaxillaire de mouton qui possède exclusivement des résidus de N-acétyl-D-galactosamine et d'acide sialique est 10000 fois plus inhibitrice que la N-acétyl-D-galactosamine libre, mais

T A B L E A U XL

CONCENTRATION MINIMALE EN GLYCOPROTEINES (μM) NECESSAIRE
POUR INHIBER 4 DOSES HEMAGGLUTINANTES ⁺ DE LECTINES

D'Amaranthus leucocarpus

GLYCOPROTEINE	LECTINE LOT	
	I	2
Mucine d'estomac de porc	N.I.	N.I.
Mucine sousmaxillaire de mouton	0,01	0,01
Mucine sousmaxillaire de mouton désialylée	0,005	0,005
Fétuine de sérum de veau foetal	0,0001	0,0001
Fétuine désialylée	0,0005	0,0005
Asialoagalactofétuine	0,001	0,001
IgA du lait humain	0,004	0,004
IgA du sérum humain	0,001	0,001
Orosomucoïde	N.I.	N.I.
Ovalbumine	N.I.	N.I.
Sérotransferrine humaine	N.I.	N.I.
Lactotransferrine humaine	N.I.	N.I.

N.I. Non inhibiteur à une concentration de 100 μM

⁺
en présence d'hématies du groupe A.

T A B L E A U XLI

CONCENTRATION MINIMALE EN GLYCANNES ET GLYCOPEPTIDES (μM)
 NECESSAIRE POUR INHIBER 4 DOSES HEMAGGLUTINANTES DE
 LECTINES D'Amaranthus leucocarpus.

GLYCANNE	LECTINE LOT	
	I	2
Glycannes de la fétuine	1,5	1,5
Glycannes désialylés de la fétuine	15	15
Glycopeptides de la fétuine	N.I.	N.I.
Glycannes d'IgA du lait	13	26
Mucine d'estomac de porc		
F I	N.I.	N.I.
F II	12,1	12,1
F III	N.I.	N.I.
Glycannes de stromas humains		
F I	N.I.	N.I.
F II	25	25
F III	31	31
Glycannes de stromas d'âne		
F I	N.I.	N.I.
F II	19	19
F III	31	31
α 2,3 Sialyl lactose	N.I.	N.I.
α 2,6 Sialyl lactose	N.I.	N.I.

N.I. Non inhibiteurs à une concentration de 100 μM



est 100 fois moins inhibitrice que la fétuine.

En général, les glycosylprotéines renfermant des glycanes liés O-glycosidiquement telles que les IgA, la fétuine ou la mucine sous-maxillaire de mouton présentent une affinité importante pour les deux lectines d'A. leucocarpus. Cependant la mucine stomacale de porc, n'est pas reconnue par ces lectines (tableau XL), mais certains glycanes libérés par β -élimination à partir de cette mucine sont reconnus par les lectines, ce qui semble indiquer que les deux lectines reconnaissent des structures glycaniques très précises présentes sur les O-glycosylprotéines, mais qu'à l'état natif, la complexité structurale de la mucine ne permet pas l'interaction entre la lectine et ses déterminants saccharidiques (tableau XLI).

Les glycanes liés O-glycosidiquement à la chaîne peptidique de la fétuine sont les déterminants reconnus par les lectines d'A. leucocarpus, car ces glycanes libérés par β -élimination de la fétuine sont encore reconnus par les lectines. Comme la glycophorine possède également les structures gal β 1,3 GalNAc (Tomita et Marchesi, 1976), ceci peut expliquer pourquoi les lectines d'A. leucocarpus agglutinent indifféremment les hématies de groupe A, B ou O . Les glycanes liés O-glycosidiquement de la fétuine sont 10000 fois moins inhibiteurs que la glycoprotéine native tableau XLI, cependant, d'autres types d'interactions non spécifiques entre la lectine et la fétuine permettent aux lectines de réagir plus fortement avec la molécule native.

f) PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES.

Les effets du pH et de la température sur l'activité agglutinante des deux lectines sont résumés dans le tableau XLII, qui montre que les deux lectines sont stables à l'effet de la température et qu'un pH entre 4-9 ne modifie pas l'activité agglutinante des lectines. D'autre part, l'activité des deux lectines n'est pas affectée par l'addition des métaux divalents, et la dialyse de chaque lectine en présence d'un agent chélateur de métaux comme l'EDTA, montre que la lectine n'est pas une métalloprotéine. La présence d'agents réducteurs de la polarité tels que l'urée ou l'éthylène glycol ne modifient pas l'activité de ces lectines, tableau XLIII.

8. CONCLUSIONS

Les caractéristiques physicochimiques des lectines purifiées à partir de différents lots de graines suggèrent qu'il s'agit de différentes expressions phénotypiques de la même lectine. Ces lectines sont spécifiques de la N-acétyl-D-galactosamine. Cependant les lectines d'Amaranthus leucocarpus présentent une plus forte affinité pour des glycannes renfermant la séquence gal β 1,3 galNAc.

La présence de protéines possédant une activité agglutinante dans des graines de la famille des amaranthaceae fut mise en évidence par Bird (1954) qui utilisait une variété non classée de graines. Cette lectine agglutinait de la même façon les hématies de diverses espèces animales (poule, mouton, boeuf, cheval, chien et les groupes hu-

T A B L E A U XLII

EFFET DU pH ET DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES D'Amaranthus leucocarpus.

		LECTINE	LOT
		I	2
		TITRE	
pH	2	0	0
	3	16	16
	4-9	32	32
	10	16	16
	11	0	0
TEMPERATURE (0°C)			
	0	32	32
	10-50	32	32
	60	32	32
	70	32	32
	80	16	32
	90	4	4
	100	2	2



T A B L E A U X L I I I

EFFET DE DIFFERENTS AGENTS CHIMIQUES SUR L'ACTIVITE
HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES D'Amaranthus leucocarpus

AGENT	CONCENTRATION	LECTINE	
		I	2
CONTROLE	-	32	32
EDTA (DIALYSE)	0,1%	32	32
Ca ⁺⁺	25 mM	32	32
Mg ⁺⁺	25 mM	32	32
Mn ⁺⁺	25 mM	32	32
Mg ⁺⁺ + Mn ⁺⁺	25 mM	32	32
Ca ⁺⁺ + Mn ⁺⁺	25 mM	32	32
Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺	25 mM	32	32
UREE	4 M	32	32
ETHYLENEGLYCOL	25%	32	32



maines A,B et O). Un autre exemple de lectine d'Amaranthacees fut décrit par Pardoe et al (1972) pour une variété d'Amaranthus caudatus; cette lectine présentait une activité hémagglutinante très semblable aux lectines étudiées dans ce travail, en particulier, l'effet sur les hématies de bovin, qui, dans les conditions standards d'essai ne sont pas agglutinées, tableau XXXVI , mais un traitement de ces hématies par des protéases ou par la neuraminidase, les rendent agglutinables par la lectine, Des études préliminaires sur cette lectine montraient que les monosaccharides n'étaient pas inhibiteurs de l'activité agglutinante; par contre, des glycoprotéines des membranes erythrocytaires inhibaient cette activité agglutinante. Le traitement enzymatique de ces glycoprotéines par une β -galactosidase de Klebsiella aërogenes provoquait l'abolition de l'effet inhibiteur, ce que suggère que la galactose est un déterminant important pour cette lectine.

Ces résultats suggèrent la possibilité que les lectines présentes dans les graines de la famille Amaranthaceae possèdent une spécificité pour des sucres similaires.

VII CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches ont permis de mettre en évidence une nouvelle source de lectines, puisque les lectines de Machaerocereus eruca décrites dans ce travail sont les premières à avoir été caractérisées dans la famille des Cactacées.

Machaerocereus eruca possède deux lectines qui ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de mucine immobilisée sur sépharose; l'élution quantitative de chaque lectine est possible grâce aux caractéristiques physicochimiques propres à chaque lectine comme son degré d'hydrophobicité. Les deux lectines sont immunologiquement identiques. Elles sont riches en glyco-colle, en acide glutamique et en sérine et ne possèdent pas de cystéine ou de méthionine; les deux lectines sont des glycoprotéines renfermant 30 et 24% de sucres, les rapports molaires en sucres déterminés par méthanolyse nous indique que les deux lectines renferment principalement du glucose, du galactose et du mannose et des traces d'arabinose, de xylose et de N-acétyl-D-glucosamine.

La seule différence existant entre les deux lectines se situe au niveau de leurs points isoélectriques. La lectine F I est constituée de 3 espèces moléculaires de pI 3,6; 4,1 et 4,6, alors que la lectine F II ne renferment que 2 espèces moléculaires de pI 3,5 et 4,1. Les deux lectines sont thermostables et ne sont pas des métalloprotéines.

Elles possèdent une affinité identique envers les sucres simples

ainsi que pour divers glycanes et glycosylprotéines; cette spécificité est dirigée principalement vers des structures oligosaccharidiques renfermant du galactose. Les deux lectines reconnaissent préférentiellement les glycosylprotéines renfermant des glycanes liés O-glycosidiquement. Leur affinité est 100 fois plus forte que pour ces glycanes libérés par β -élimination, ce que indique l'existence possible d'autres interactions entre la lectine et les glycosylprotéines telles que des interactions hydrophobes ou de transfert de charge .

Les deux lectines de Machaerocereus eruca sont deux autres exemples de lectines qui présentent une plus grande affinité pour des structures oligosaccharidiques complexes.

D'autre part, nous avons montré que les graines d'Amaranthus leucocarpus renferment une lectine spécifique des résidus de N-acétyl-D-galactosamine; cette lectine a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant des stromas d'hématies de lapin désialylées. L'élution de la lectine par l'eau distillée nous a permis de purifier une protéine constituée de sous-unités ayant une masse moléculaire de 33 KDa. Cette lectine est une glycoprotéine renfermant 10% de sucres; la partie glycanique de cette lectine est constituée de mannose, de glucose, de galactose et de N-acétyl-D-glucosamine dans les rapports 3:1:4:6. L'isofocalisation de la lectine nous montre 3 espèces moléculaires de pI 4,8;5,0 et 5,2 .

D'autre part, à partir d'un autre lot de graines appartenant à la

même espèce et par le même procédé de purification, nous avons purifié une lectine qui possède essentiellement les mêmes caractéristiques, mais qui semble constituée par l'assemblage de sousunités ayant une masse moléculaire de 33 et de 31 KDa.

Les études de la spécificité envers les sucres de ces deux lectines indiquent que l'activité agglutinante de ces deux lectines est inhibée par la N-acétyl-D-galactosamine . Mais le fait que ces lectines ne présentent aucune spécificité de groupe sanguin humain nous laisse supposer qu'il existe sur les hématies des structures oligosaccharidiques différentes des déterminants de groupe sanguin qui sont reconnues par les lectines. La séquence gal β 1,3 galNAc, présente sur la fétuine et également sur la glycophorine, semble représenter le déterminant saccharidique reconnu pour ces lectines.

Ce travail sera poursuivi en essayant de définir le rôle biologique de ces lectines chez ces végétaux . Leurs activités biologiques seront également étudiées afin de pouvoir utiliser éventuellement ces lectines comme réactifs biologiques .

B I B L I O G R A P H I E

(Les nombres entre parenthèses renvoient à la page du mémoire)

1. Adair, W.L.; Kornfeld, S.; J. Biol. chem. 249(1974)4696-4704 (22)
2. Agrawal B.B.L.; Goldstein, I.J.; Bioch. Biophys. Acta 133
(1967) 376-382 (22)
3. Allen, N.K.; Brilliantine, L.; J. Immunol. 102(1969)
1295-1299 (37)
4. Allen, A.K.; Neuberger A.; Biochem J. 135 (1973) 307-314 (25)
5. Allen, A.K.; Desai, N.N.; Neuberger A.; Biochem J. 155
(1976) 127-135 (24)
6. Alroy, J.; Ucci A.A.; Pereira, M.E.A.; In: Delellis ed.,
Advances in Immunochemistry, Masson Inc., N.York, 1984 p 67-88
(55, 56).
7. Aub, J.C.; Tieslau, C.; Lankester A.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
50 (1963) 613-620 (34, 35).
8. Aub, J.C., Sanford, B.H.; Cote, M.N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
54 (1965) 396-402. (35)
9. Avrameas, S.; Guilbert, B; Biochimie 53 (1971) 603-614 (119)
10. Baenzinger, J.V.; Fiete, D.; J. Biol. Chem. 254(1979)2400-
2408 (46)
11. Balding, P.; Gold, E.R.; Immunitaets Forsch. Allerg. Klin.
Immunol. 145 (1973) 156-165 (24)
12. Barondes, S.H.; Ann. Rev. Biochem. 50 (1981) 207-231 (56).

13. Bauminger, S., Graves, M.F., et Janossy, G., Isr. J. Med. Sci. 8 (1972) 640-645 (28),
14. Bergh, M.L.E., Koppen, P.L.; Van den Eijnden D.H., Carbohydr. Res. 94 (1981) 225-229 (133)
15. Bird, G.W.G.; Curr. Sci. 20 (1951) 298-299 (25)
16. Bird, G.W.G.; J. Path. Bact. 68 (1954) 289-293 (57)
17. Bird, G.W.G., Brit. J. Exp. Path 35 (1954) 252-268 (171)
18. Bird, G.W.G., Brit. Med. Bull. 5 (1959) 165-168 (11,12)
19. Bird, G.W.G.; Winham, J.; Vox Sang 26 (1974) 163-166 (57)
20. Bloch, R.; Burger, M.M.; Bioch. Biophys. Res. Comm. 58 (1974) 13-19 (60)
21. Boersma, A.; Lamblin, G. Dagand P.; Roussel, P.; Carbohydr. Res. 94 (1981) 7-9 (139)
22. Boldt, D.H.; J. Cell. Physiol. 120 (1984) 61-68 (49)
23. Borgberg H.; Yesner I.; Gesner B.; Silber R.; Blood 31 (1966) 747-751 (21;31)
24. Boyd, W.C.; Sharpleigh, E.; J. Immunol. 73 (1954) 226-231 (7)
25. Boyd W.C.; Vox Sang 8 (1963) 1-32 (11,27,45,52)
26. Bravo Hollis, H., Las cactaceas de México, UNAM México, 1978, p 1-473 (67)
27. Breborowicz, J.; Mackiewicz, A.; Breborowicz, D.; Scand. J. Immunol. 14 (1982) 15-20 (47)
28. Bretting, H.; Philips, S.G.; Klumpart, H.J.; Kabbat, E.A. J. Immunol. 127 (1981) 1652-1658 (22)
29. Brown, J.C.; Hunt, R.C., Int. Rev. Cytol. 52 (1979) 277-366 (130)
30. Cammue, B.P.; Peeters, B.; Peumans, W.; Biochem. J. 227 (1985) 949-955 (159)

31. Carlson, D.M.; J Biol Chem 241 (1966) 241-247 (125)
32. Catsimpoolas N.; Anal. Biochem. 26(1968) 480-484 (79)
33. Cawley, L.P.; Jones, J.M.; Teresa G.W., Transfusion,
7 (1967) 343-346 (22)
34. Charet, P.; Tetaert, D., Han, K.K., Montreuil, J.; C.R.Acad. Sci.
276 (1973) 1629-1632 (78)
35. Cheetman, N.W.H., Sirimanne, P.; Day, W.R., J.Chromatogr.
207 (1981) 426-430 (133)
36. Clamp, J.R., Dawson, G.; Hough, L.; Biochim. Biophys. Acta
28 (1967) 342-350 (77)
37. Cline, M.J.; Livingston, D.C., Nature New Biol. 232 (1971)
155-160 (35)
38. Dahr, W.; Uhlenbruck, G.; Bird, G.W.G.; Vox Sang. 27 (1979)
29-42 (22)
39. Debray, H.; Decout, D.; Strecker, G.; Montreuil, J.; Monsigny
M.; in H. Peeters ed., Prot. of Biol. Fluids Vol. 27, Per-
gamon press, N.York, 1979, 451-454 (20, 46)
40. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J.;
Eur. J. Biochem. 117 (1981) 41-55 (12, 20, 24, 28, 46)
41. Debray, H.; Pierce-Cretel, A.; Spik, G.; Montreuil, J.; in
T.C. Bog-Hansen et G.A. Sprengler eds.; Lectins Vol III
W. de Gruyter, Berlin, 1983, 355-350 (20)
42. Debray, H.; Strecker G.; Montreuil, J. Bioch. Soc.Trans.
12 (1984) 611-612 (130)
43. Debray, H.; Rougé, P., FEBS Lett.; 176 (1984) 120-124 (24)
44. Del Campillo, E.; Shanon, L.M.; Plant.Physiol. 69(1982) 628-

631-(43)

45. Dombrik-Krutzman, M.A., Dick, W.E.; Burton, K.A., Cadmus, M.C.;
Biochem. Biophys. Res. Comm. 111 (1983) 798-803 (38)
46. Duhois, M.; Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A.,
47. Smith, F.; Anal. Chem. 28 (1956) 350-356 (76,105,126,155)
48. Duk, M.; Lisowska, E.; Kordowicz, M.; Wasniowska, K.; Eur. J.
Biochem. 123 (1982) 105-111 (23)
49. Duk, M. et Lisowska, E.; Eur. J. Biochem. 143(1984)73-78 (115,1
50. Edelman, G.M.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69(1973) 2580-
2584 (45)
51. Ebisu, J., Löngren, J., et Goldstein, I.J., Carbohydr. Res.
58 (1977) 187-195 (25)
52. Edelman G.M.; Wang, J.L.; J. Biol. Chem. 253(1978)3016-
3022 (45)
53. Ehrlich, P. Dtsch. Med. Wochenschr. 17(1902)976-979 (5)
54. Ersson, B., Aspberg, K.; Porath, J.; Biochim. Biophys. Acta
310 (1973) 446-452 (22,59)
55. Etzler, M.E.; Kabat, E.A.; Biochemistry 9(1970)869-877 (23)
56. Etzler, M.E., Mac Millan, J.; Scates, S.; Gibson, D.M.; James,
D.W.; Plant Physiol. 76 (1984) 871-878 (42)
57. Etzler, M.E. Ann. Rev. Plant Physiol. 36(1985)209-234(37,41,42)
58. Gabius, H.J.; Engelhardt, R.; Cramer F.; Medical Hypothèses
18 (1985) 47-50 (51)
59. Galbraith, W., Goldstein, I.J., Meth. Enzymol. 28 part B
(1972) 318-323 (23)
60. Gallagher, J.T., Harding, M., Dale, R.E.; in T.C. Bog-Hansen

- et G.A. Spengler eds., Lectins Vol III, De Gruyter, Berlin, 1983, 311-318 (20)
61. Gallagher, J.T.; Bioscience Reports 4(1984) 621-632 (19)
 62. Gatehouse, J.A.; Boulter, D.; Physiol Plant. 49(1980)437-442(42)
 63. Gilboa-Garber, N.; Biochim. Biophys. Acta 273(1972)165-173(9)
 64. Goldstein, I.J., So, L.L.; Arch. Biochem. Biophys. 111 (1965)
407-414 (12)
 65. Goldstein, I.J.; Hammarström, S.; Sundblad, G.; Biochim. Biophys. Acta, 405 (1975) 53-61 (25)
 66. Goldstein, I.J., in H. Bittiger et H.P. Schnebli eds., Concavalina A as a tool, J. Wiley, London, 1976, 55-65 (12)
 67. Goldstein, I.J., Hayes, H.E.; Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35 (1978) 127-340 (12,17,23,25,28,44,46,49,86,119)
 68. Gordon, J.A., Sharon, N; Lis, H.; Biochim. Biophys. Acta 264 (1972) 387-391 (13,62)
 69. Goldstein, I.J.; Hughes, R.C., Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N. Nature 285 (1980) 66 (9)
 70. Grabar, P.; Williams, C.A., Biochim. Biophys. Acta 17 (1955)
65-71 (74)
 71. Granger, G.A., Daynes, R.A., Runge, P.E., Prieur, A.M.; Jeffes, E.W.B.; in Jeffes et W.J; Manoy, eds. Contemporary topics in molecular immunology; Plenum Press, N.York; 1975, 205-241 (33)
 72. Graham, E.R.B.; in A. Gottschalk ed., Glycoproteins, Vol 5 part A, Elsevier, Amsterdam, 1972, 717-731 (130)
 73. Gray, G.R.; Arch. Bioch. Biophys. 163 (1974)426-428 (62)

74. Greaves, M.F., Bauminger, S., Jannosy, G.; Clin. Exp. Immunol. 10 (1972) 537-554 (30)
75. Greaves, M.F., Bauminger, J., Nature New Biol. 245 (1972) 67-70 (31)
76. Hall, J.L., Rowlands, D.T.; Biochemistry 13(1974)828-832 (24)
77. Hammarström, J.; Kabat, E.A. Biochemistry 8 (1965)2696-2705 (9)
78. Hammarström, S.; Meth. Enzymol. 28 part B (1972)368-383 (23)
79. Hammarström, S.; Hammarström, M.L.; Sunblad, G.; Longren, J.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(1982) 1611-1615 (21)
80. Hankins, C.N., Shanon, L.M.; J. Biol. Chem. 253(1978) 7791-7797 (44)
81. Hapner, K.D., Robbins, J.E., Biochim. Biophys. Acta, 580
(1979) 186-197 (21,42)
82. Hardman, K.D., in Goldstein, I.J. ed., Carbohydrate-Protein interaction, ACS Simp. Series, Washington, 1979, 12-14 (14)
83. Hedo, A.J.; in Receptor Purification Procedures; Alan R. Liss N.York; 1984, 45-60 (48)
84. Heeb, M.J., Marini, A.M., Gabriel O.; Infec. and Immunity 47 (1985) 61-67
85. Higuchi, M.; Iwai, K.; Agr. Biol. Chem. 49 (1985)391-398 (23)
86. Holm, S.E., Bergholm, A.M., Wagner, B., Wagner, M., J. Microbiol. 19 (1985) 317-323 (26)
87. Horejsi, V., Kocourek, J.; Biochim. Biophys. Acta 297 (1973) 346-351 (62)
88. Horisberg, M., Carbohydr. Res. 53(1977)231-237 (60)
89. Hounsell, E.F.; Jones, N.J., Stoll, M.S., Bioch. Soc. Trans.

- 13 (1985) 1061-1064 (133,137)
90. Hounsell, E.F., Rideout, J.M., Pickering, N.J.; Lim, C.K.,
J. Liquid Chrom. 7 (1984) 661-674 (133)
91. Howard, I.K.; Sage, H.J.; Horton, C.B.; Arch. Biochim; Biophys.
149 (1972) 323-326 (43)
92. Howard, D.R.; Ferguson, P.; Bastaki, J.G.; Am. J. Clin. Pathol.
77 (1982) 401-408 (52)
93. Iglesias, J.L.; Lis, H.; Sharon, N.; Eur. J. Biochem. 123 (1982)
247-252 (24)
94. Inbar, M.; Sachs, L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969)
1418-1425 (80)
95. Inbar, M.; Sachs, L.; Nature 223 (1969) 710-712 (13, 24).
96. Inbar, M.; Ben-Bassat, H.; Sachs, L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA
68 (1971) 2748-2755 (13; 35)
97. Inbar, M.; Ben-Bassat, H.; Sachs, L.; Intl. J. Cancer 12 (1973)
93-99 (34)
98. Jansons, V.K.; Burger, M.M.; Fed. Proc. 30 (1971) 692-700 (35)
99. Jacobson, K.; Wu, E.; Poste, G.; Biochim. Biophys. Acta 433
(1976) 215-222 (34)
100. Jiménez, A.; Vazquez, D.; Ann. Rev. Microbiol. 39 (1986) 649-672 (51)
101. Jones, D.A.; Heredity 19 (1964) 459-469 (44)
102. Kalb, A.J.; Levitzki, A.; Biochem. J. 109 (1968) 669-672 (14)
103. Kawaguchi, T.; Matsumoto, I.; Osawa, T.; J. Biol. Chem. 249 (1974)
323-327 (22, 24)
104. Kerkaert, J.P.; Anal. Biochem. 84 (1978) 354-360 (74)
105. Kern, J.A., Danielle, R.P.; Nowell, P.C.; J. Leukocyte Biol. 38
(1985) 495-507 (30)

106. Kilpatrick, D.C.; Yeoman, M.M.; Biochem, J, 175 (1978) 1151-1153 (25)
107. Kilpatrick, D.C.; Biochem, J, 185 (1980) 269-272 (25)
108. Kitagachi, H.; Seno, M.; Yamaguchi, H.; Matsumoto, I.; J. Biochem. 97 (1985) 791-799 (23)
109. Klaus, H.; Glaser, C.; FEBS Lett, 45 (1974) 304-307 (45)
110. Klein, P.J., Vierbuchen, M.; Schulz, K.D.; Wurz, H.; Citoler, P.; Uhlenbruck, G.; Ortmann, M. Fischer, R.; Tumor Diagnostik 2 (1982) 240-245 (52)
111. Knox, R.B.; Clarke, A., Harrison, I.; Smith, P.; Marchalonis, J.J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2788-2792 (45)
112. Kobert, R.; Lehrbuch der intoxicationen (Z. Aufl Ferdinand Enke, Verlag, Stuttgart) 1906, 161 et 695 (5)
113. Kornfeld, S.; Kornfeld, R.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 1439-1446 (21)
114. Kornfeld, R.; Ferris, C.; J. Biol. Chem. 250 (1975) 2614-2620 (28, 46)
115. Kortt, A.A.; Arch. Bioch. Biophys. 236 (1985) 544-554 (23)
116. Koulumies, R.; Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 27 (1949) 185-188 (26)
117. Kristiansen, T.; Methods Enzim 34 (1974) 331-341 (46)
118. Krüpe, M.; Z. Immunoforsch. 111 (1954) 22-31 (13)
119. Krüpe, M.; Blut Greppenspezifische pflanzliche eiweisskörper (phytagglutinine) Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart, 1956; 1-131 (14, 17, 38, 45)
120. Krüpe, M.; Dotzer, W.; Ann. Med. Exp. Biol. Fennial. 35 (1957) 1-9 (56)
121. Laemmli, U.K.; Nature, 227 (1970) 680-685 (74)

122. Laemmli, U.K.; Favre, M.; J. Mol. Biol. 80 (1973) 575-593 (74)
123. Lamb, J.E.; Shibata, S.; Goldstein, I.J.; Plant. Physiol. 71-
(1983) 879-887 (39)
124. Landstainer, K.; Raubitscheck, H.; Zbl. Baet. I Abtorig
45 (1906) 660-667 (11)
125. Lis, H.; Sela, B.A.; Sachs, L.; Sharon, N.; Biochim. Biophys. Acta
211 (1970) 582-585 (12, 13, 31)
126. Lis, H.; Sharon, N.; Ann. Rev. Biochem., 42 (1973) 541-574 (7, 30)
127. Lis, H.; Sharon, N.; in M. Sela ed., The Antigens, Vol IV, Acad.
Press, N. York, 1977; 429-529 (10, 33, 61, 83, 119)
128. Lis, H.; Sharon, N.; in P.K. Stumpf et E.E. Conn, The Bioche-
mistry of Plants, Vol V, Acad. Press, N. York, (1981), 371-488 (63)
129. Lis, H.; Sharon, N.; J. Chromat. 215 (1981) 361-372 (49, 62, 64, 65, 111)
130. Lonngren, J.; Goldstein, I.J.; By Water, R.; FEBS Let. 68 (1976)
31-34 (60)
131. Loontjens, F.G.; Van Waure, J.P.; De Bruyne, C.K.; Carbohydr.
Res. 44 (1975) 150-153 (19)
132. Lotan, R.; Skvtelsky, E.; Danon, D.; Sharon, N.; J. Biol. Chem.
250 (1977) 8518-8523 (46)
133. Lowry, H.O.P.; Rosenbrough, N.J.; Lewis, Farr, A.; Randal, R.J.;
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-268 (75, 105, 155)
134. Maget-Dana, R.; Veh, W.; Sander, M.; Roche, A.C.; Shaner, R.;
Monsigny, M.; Eur. J. Biochem. 114 (1981) 11-16 (20)
136. Mäkela, O.; Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., SUP1 11, 35 (1957) 1-156
(25, 38, 123)
137. Mäkela, O.; In: Weilin et Goos, eds.; Studies on hemagglutinins
of leguminoseae seeds, Helsinki, 1957, 1-133 (11, 12, 13, 18, 25)

138. Mäkela, O.; Mäkela, P.; Krüpe, M. Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther. 117 (1959) 220-229 (17)
139. March, S.C., Parikh, I.; Cuatrecasas, P.; Anal. Biochem. 60 (1974) 149-152 (68)
140. Marchesi, V.T.; Furthmayr, H.; Tomita, M.; Ann. Rev. Biochem. 45 (1976) 667-698 (130-170)
141. Matsumoto, I.; Osawa, T.; Vox Sang. 21 (1971) 548-557 (17,26)
142. Mirelman, D.; Galun, E.; Sharon, N.; Lotan, R.; Nature 256 (1975) 414-416 (44)
143. Monsigny, M.; Roche, A.C.; Sene, C.; Maget-Dana, R.; Delmotte, F.; Eur. J. Biochem. 104 (1980) 147-153 (20,25,71,81)
144. Montreuil, J.; Compreh. Biochem. Neuberger H.; van Deenen^r L.L.M. Vol; 19 B, part II, Elsevier, Amsterdam, 1982. (144)
145. Morgan, W.T.J.; Watkins, W.M.; Br. J. Exp. Pathol.; 34 (1953) 94-103 (17)
146. Morgan, W.T.J., Watkins, W.M.; Nature, 177 (1956) 521-522 (17,26)
147. Murphy, L.A.; Goldstein, I.J.; J. Biol. Chem.; 252 (1977) 4739-4742 (12)
148. Nagl, W.; Planta 106 (1972) 269-272 (43)
149. Neter, E.; Bacteriol. Rev.; 20 (1956) 166-188 (9)
150. Ng Ying Kin, N.M.K.; Wolfe, L.S.; Anal. Biochem.; 102 (1980) 213-219 (133)
151. Nicolson, G.L.; et Blaustein, J.; Biochem. Biophys. Acta 266 (1972) 543-547.
152. Nicolson, G.L.; Inter. Rev. Cytol.; 39 (1974) 89-190 (36,51)
153. Nicolson, G.L.; in: J.K. Koehler, ed.; Advanced techniques in Biological electron microscopy II, Springer Verlag, Berlin

- 1978; 1-38 (52)
154. Nilsson, B.; Norden, N.E.; Svenson, S.; J. Biol. Chem.; 254
(1979) 4545-4553 (130)
155. Nomenclature Committee, Committee of I.U.B., Joint commission
on Biochemical nomenclature (J.C.B.N.) Eur. J. Biochem;
114 (1981) 1-4 (9)
156. Norgaard-Pedersen, B.; Toftager-Larsen, K.; Philip, J.; et
Hindersson, P.; Clin. Genetics 17(1980) 355-362 (47)
157. Novogrodski, A.; Katchalski, E.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA
70 (1975) 2515- 2518 (31)
158. Novogrodski, A.; Lotan, R.; Ravid, A.; Sharon, N.; J. Immunol
115(1975) 1243-1248 (31)
159. Ochoa, J.L.; Pathol. Biol. 27 (1979) 103-113 (86)
160. Ochoa, J.L.; Kristiansen, T.; FEBS let. 90(1980)145-148 (71)
161. Ogata, S.I.; Lloyd, K.O.; Anal. Biochem.; 119 (1981) 351-359 (130)
162. Olsnes, S.; Salfredt, E.; Pihl, A.; J. Biol. Chem. 249 (1974)
803-890 (22)
163. Olsnes, S.; Pihl, A.; in: P. Cuatrecasas ed.; Receptors and
Recognition. Chapman and Nall, London? 1976, 131-173 (51)
164. Osawa, T.; Biochem. Biophys. Acta, 115(1966)507-510 (26)
165. Osawa, T.; Toyoshima, J.; Meth. Enzymol. 28 part B (1972)
328-332 (24)
166. Osawa, T.; Matsumoto, I.; Meth; Enzymol. 28 part B (1972)
323-327 (26)
167. Ouchterlony, O., Ark. Kem. Miner. Geol., 26B(1948)1-9 (73)
168. Ozanne, B.; Sambrook, J.; Nature New Biol. 232(1971)692-697(13,35)

169. Pardoe, G.I.; Uhlenbruck, G.; J. Med. Lab. Technol. 27 (1970)
249-263 (13)
170. Pardoe, G.I.; Bird, G.W.G.; Uhlenbruck, G.; Sprenger, I.; Heggen, M.:
Immunotaetsforsch. Klin. Immunol.; 140 (1970) 374-394 (174)
171. Prtridge, J.; Shanon, L.; Gumpf, D.; Biochim. Biophys. Acta
451 (1976) 470-483 (44)
172. Paz-Parente, J.; Leroy, Y.; Montreuil, J.; Fournet, B.;
J. Chromatogr. 288 (1984) 147-155 (133)
173. Perera, C.B.; Frumin, A.M.; Science, 151 (1966) 821 (25)
174. Pereira, M.E.A.; Kabat, E.A.; Sharon, N.; Carbo. Res. 37 (1974)
89-102 (19, 20, 26)
175. Peumans, W.J.; Stinissen, H.M.; Carlier, C.; in T.C. Bog-Hansen
et G.A. Spengler, eds.; Lectins Vol. 3, De Gruyter, Berlin,
1983; 559-572 (43)
176. Peumans, W.J.; Nsimba-Lubaki, Peeters, B.; Broekaert, W.F.;
Planta, 164 (1985) 75-82 (23)
177. Pipoka, J.; Horejsi, V.; Kocourek, J.; Biochim. Biophys. Acta
541 (1978) 515-520 (62)
178. Presant, C.A.; Kornfeld, S.; J. Biol. Chem.; 246 (1971) 6581-6586 (24)
179. Pihl, A.; Fostad, S.; Olsnes, S.; in: H. Peeters, ed.; Proc. Prot. Biol.
Fluids; 27 (1979) 631-636 (51)
180. Prokop, O.; Rackwitz, A.; Schelisenger, D.; J. Forensic. Med.
12 (1965) 108-110 (9)
181. Prokop, O.; Schlesinger, D.; Geserick, G.; Immunotaetsforsch.
Allerg. Klin. Immunol. 132 (1967) 491-494 (9)
182. Porath, J.; Sundberg, L.; Nature New Biol. 238 (1972) 261-262 (62)

183. Pueppke, S.G.; Plant Physiol. 64 (1969) 575-580 (39)
184. Quinn, I.M.; Etzler, M.E.; Fed. Proc. 42 (1983) 2015-2017 (42)
185. Raedler, A.; Raedler, E.; J. Canc, Res, Clin, Oncol. 109 (1985) 245-251 (52)
186. Renkonen, K.O.; Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 26 (1948) 66-75 (7)
187. Reisner, Y.; Ravid, A.; Sharon, N.; Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 (1976) 1585-1591 (50)
188. Reisner, Y.; Sharon, N.; Trends in Biochem. Sci.; 5 (1980) 29 (50)
189. Rigas, D.A.; Osgod, E.E.; J. Biol. Chem. 212 (1955) 607-613 (6)
190. Roberts, D.D.; Goldstein, I.J.; J. Biol. Chem.; 257 (1982) 11274-11277 (45)
191. Roberts, D.D.; Goldstein, I.J.; J. Biol. Chem.; 258 (1983) 13820-13823 (45)
192. Rosen, S.D.; Kafka, J.A.; Simpson, D.C.; Barondes, S.H.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 70 (1973) 2554-2557 (22)
193. Rosenzweig, W.D.; Premachandran, D.; Pramer, D.; Can. J. Microbiol. 31 (1985) 693-695 (44)
194. Rougé, P.; C. R. Acad. Sci. D.; 282 (1976) 621-623 (39)
195. Sachdev, G.P.; Zodrow, J.M.; Carubelli, R.; Biochim. Biophys. Acta 580 (1979) 85-90 (123)
196. Sarkar, M.; WA, A.M.; Kabat, E.A.; Arch. Biochem. Biophys. 209 (1981) 204-219 (24)
197. Scheidegger, J.J.; Intern? Arch. Allergy Appl. Immunol. 7 (1955) 103-107 (74)
198. Schenebli, H.P.; Duckor, P.; Eur. J. Immunol.; 2 (1972) 747-752 (30)
199. Sela, B.A.; Lüs, H.; Sharon, N.; Sachs, L.; J. Membrane Biol. 3 (1970) 267-273 (13, 34, 80, 86)
200. Serafini-Cessi, F.; Francheschi, C.; Sperti, S.; Biochem. J. 183 (1979) 381-388 (21)

201. Shankar, P. N.; Wilkinson, K. D.; Goldstein, I. J.; Arch. Biochem. Biophys., 177 (1976) 330-333 (19, 22)
202. Sharon, L. N.; in: I. J. Goldstein, M. E. Etzler, EDS., Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins. Alan, R. Liss N. York, 1982; 47-61 (44)
203. Shaper, J. H.; Barker, R.; Hill, R. L.; Anal. Biochem. 53 (1973) 564-567 (62)
204. Sharon, N.; Lis, H.; Science, 177 (1972) 949-959 (8, 11, 12, 49, 52)
205. Sharon, N.; Lis, H.; Method. Membrane Biol. 3 (1975) 143-200 (33, 52)
206. Sharon, N.; in: M. Fougereau et Dausset, A., eds.; Immunology 80, Acad. Press, N. York, 1980, 254-278 (50, 61)
207. Sharon, N.; Advances in Immunol.; 34 (1982) 131-157 (50)
208. Sharon, N.; in: E. C. Boedeker, ed.; Attachment of micro-organisms to the gut mucosa, vol I, CRC Press, 1984, 129-145 (57, 58)
209. Shohan, J.; InBar, M.; Sachs, L.; Nature, 227 (1970) 1244-1246 (51)
210. Sikder, S. K.; Kabat, E. A.; Steer, C. J.; Ashwell, G.; J. Biol. Chem. 258 (1983) 199-202 (19)
211. Simpson, D. L.; Thorne, D. R.; Loh, H. H.; Life Sciences, 22 (1978) 727-748 (37)
212. Smith, C. J.; Kelleher, P. C.; Biochim. Biophys. Acta, 317 (1973) 231-235 (47)
213. So, L. L.; Goldstein, I. J.; J. Biol. Chem. 243 (1968) 2003-2007 (12)
214. Spackman, P. H.; Stein, W. H.; Moore, S.; Anal. Chem. 30 (1958) 1190-1197 (78)
215. Spiro, R. G.; Bhayroo, U. D.; J. Biol. Chem. 249 (1974) 5704-5717 (130)
216. Stillmark, H.; Der Giftige Erwesekrotper Ricin Seine Wirkung auf das Blut (Inaugural dissertation) Dorpat, 1888 (5, 6, 9, 11)
217. Sumner, J. B.; J. Biol. Chem. 37 (1919) 137-142 (6)
218. Sumner, J. B.; Howell, S. F.; J. Bacteriol. 32 (1936) 227-237 (6, 14, 51)

219. Sundberg, L.; Porath, J.; J. Chromatogr. 90(1974)87-98 (61,74)
220. Tabary, F.; Frenoy, J.P.; Biochem. J.; 229(1985)687-692 (25)
221. Talbot, C.F.; Etzler, M.E.; Plant Physiol.; 61(1978)847-850(39)
222. Talbot, C.F.; Etzler, M.E.; Biochemistry, 17(1978)1474-1479(42)
223. Tobiska, J.; Die Phytaemagglutinine, Academic Verlag, Berlin, 1964, 1-302 (11,12)
224. Toftager-Larsen, K.; Kjaersgaard, E.; Jacobsen, J.C.; Norgaard-Pedersen, B.; Clin. Chem. 26(1980)1656-1659 (47)
225. Toms, G.; Western, A.; in: J.B. Harborne, D. Boulter, B.L. Turner eds.; Chemotaxonomy of Legumes, Cap. 10, Acad. Press, 1981, 367-462 (37)
226. Trowbridge, I.S.; J. Biol. Chem. 249(1974)6004-6012(25)
227. Toyoshima, S.; Akiyama, Y.; Nakano, K.; Tonomura, A.; Osawa, T.; Biochemistry 10(1971)4457-4463 (31)
228. Tseviaon, Y.; Sharon, N.; Biochim. Biophys. Acta, 642(1981)336-344(38)
229. Tsuji, T.; Irimura, T.; Osawa, T.; Carbohydr. Res.; 92(1981)328-332 (130)
230. Vasta, G.R.; Cohen, E.; Dev. Comp. Immunol. 8(1984)515-522(26)
231. Warren, C.D.; Schmit, A.S.; Heanloz, R.W.; Carbohydr. Res.; 116(1983)171-182 (133)
232. Watkins, W.M.; Morgan, W.T.J.; Nakure, 169(1952)825-826 (12,14)
233. Weber, E.; Neuman, D.; Manteuffel, R.; Biochem. Physiol. Pflansen. 175(1980)279-306 (43)
234. Weir, D.M.; Immunology Today, 1980, 45-51 (52)
235. Yang, D.C.H.; Gall, W.E.; Edelman, G.M.; J. Biol. Chem.; 249(1974)7018-7023(45)
236. Yoshima, H.; Takahashi, S.; Kobata, A.; J. Biochem.; 88(1980)241-246 (130)

237. Young, N.M.; Leon, M.A.; Takahashi, T.; Howerd, I.K.; Sage, H.J.
J. Biol. Chem. 246 (1972) 1596-1601 (17)
238. Young, N.M.; Leon, M.A.; Carbohydr. Res. 66 (1978) 231-237 (60)
239. Young, N.M.; Watson, D.C.; Williams, R.E.; Biochem. J.; 222
(1984) 41-48 (22)
240. Zagyansky, Y.; Edidin, M.; Biochim. Biophys. Acta; 35 (1976)
209 -214 (34)
241. Zanetta, J.P.; Breckenbrige, W.C.; Vincendon, G.; J. Chromatogr.
69 (1972) 291-304 (76, 155)
242. Zenteno, E.; Ochoa, J.L.; in: T.C. Bog-Hansen, J. Breborowicz eds.
Lectins vol. 4 De gruyter, Berlin, 1984, 437-445 (84)
243. Zenteno, E.; Debray, H.; Montreuil, J.; Ochoa, J.L.; in: T.C. Bog
Hansen et E. van Driessche, eds.; Lectins Vol. 5, De gruyter
Berlin, 1986, 147-154 (149)
244. Ziska, P.; Acta Bio. Med. Germ.; 35 (1976) 1575-1576 (25)



RESUME

Deux nouvelles lectines ont été isolées et purifiées par chromatographie d'affinité et leurs principales caractéristiques physico-chimiques ont été précisées, ainsi que leur spécificité de reconnaissance de structures glucidiques.

Du cactus Machaerocereus eruca, deux lectines ont été préparées par chromatographie d'affinité sur colonne de mucine d'estomac de porc immobilisée sur Sepharose. Toutes deux sont des glycoprotéines d'une masse moléculaire de 35 kDa, ne renfermant ni cystéine, ni méthionine, riches en glycolle, en acide glutamique et en sérine. Elles contiennent respectivement, l'une 24 % et, l'autre 30 % de glucides représentés essentiellement par le glucose, le galactose, le mannose, le xylose et la N-acétylglucosamine. Ces lectines sont immunologiquement identiques et présentent des structures oligomériques de pI 3,6-4,1 et 4,6, pour l'une, de pI 3,5 et 4,1 pour l'autre. Elles sont spécifiques de glycanes liés O-glycosidiquement comme ceux de la mucine gastrique de porc, de la fève et des IgA.

La lectine d'Amaranthus leucocarpus, purifiée par affinité sur stromas d'hématies, est une glycoprotéine constituée de sous-unités de 33 kDa. Il s'agit d'une glycoprotéine qui renferme 10 % de glucides (mannose, galactose, glucose et N-acétyl-D-glucosamine). La N-acétyl-D-galactosamine et le disaccharide Gal(β 1-3) GalNAc sont les meilleurs inhibiteurs de l'agglutination des hématies par cette lectine.

MOTS CLEF

lectines
lectines végétales de cactacées et d'Amaranthacées
spécificité des lectines
purification
chromatographie d'affinité

