



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

**Département : biochimie et biologie cellulaire et moléculaire**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : biochimie appliquée**

Intitulé :

---

**Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines du champignon polypore soufré (*Polyporus sulphureus*)**

---

**Présenté et soutenu par :** khattabi oumeima

**Le :** 01/07/2018

Lahnada khadidja

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mr Necib. Y                      professeur – UFM Constantine.

**Rapporteur :**                      Mr Zitouni.A                      Maitre de conférence – UFM Constantine

**Examineurs :**                      Mr HAFLA                      Maitre-assistant – UFM Constantine

*Année universitaire  
2017 - 2018*



## Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage, la persistance et m'a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse mes plus sincères remerciements à notre encadreur Dr Zitouni Abdelbaki (MCA UFM Constantine) qui a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, une disponibilité, des conseils, des encouragements, sa gentillesse. Je suis très honorée de travailler sous sa direction.

Mes remerciements sont également adressés :

A monsieur Toumi Seddik-eddine, pour m'avoir accordé de son temps et surtout de son savoir, et à monsieur Bahri pour son aide précieux dans l'animalerie.

Au docteur Bellil Ines qui nous a permis et dirigé pour la réalisation d'une technique indispensable pour notre travail de recherche .

Mon héros, mon roi mon exemple merci, merci d'avoir cru en moi de m'avoir soutenu mais encore plus d'être le PAPA que tu es, je t'aime papiche.

Ma reine, ma douce, ma maman ma joie merci d'avoir été là, de m'avoir soutenu durant ces 23 dernières années.

A ma sœur Khadidja la seule et unique y'a pas deux comme toi, à mon frère Hamza la plus gentille personne que je n'ai jamais rencontrée.

A mes 2 princesses MIMIYA, ZHEIRA

A mon confident mes remerciement ne pourront jamais égaler ton grand cœur qui m'a apporté du soutien au moment où j'avais besoin d'aide, merci d'être la REDA.

Une pensée particulière à mon chère grand père défunt « benyamina Abdelaziz » qui est toujours présent dans mon cœur. J'espère que tu es fière de moi de là ou tu es.

A mes deux amies avec qui j'ai partagé ce travail, et vécu tellement de beaux moments, KHAWLA et MANEL.

Sans oublier mes amis et tous ceux que j'ai pu côtoyer durant mon parcours.

Oumeima

## Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon dieu Allah qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tout d'abord mon encadreur Mr. Zitouni de m'avoir proposé ce sujet de recherche. La clarté et la précision de son rapport montrent à quel point il s'est investi dans ce travail. Ses critiques et ces conseils me sont d'ores et déjà précieux.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mr Saddik-Toumi pour ses bons conseils et explications qui nous ont éclairé le chemin de recherche et sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce travail, et au docteur Bellil Ines qui nous a permis et dirigé pour la réalisation d'une technique indispensable pour notre travail de recherche

Je remercie mes très chers parents, Abdel Aziz et Karima, qui ont toujours été là pour moi ; « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier ».

Je remercie mes frères Lamine et Abdel Moumen, et ma sœur Amira et ma belle-famille pour leur encouragement.

De même je remercie mes deux chères copines Oumeima et Manel, pour leur amitié et leur soutien inconditionnel.

Mes sincères remerciements à mon fiancé khenfri Islem Afif et grâce à son aide et à sa patience avec moi ce travail a pu voir le jour...

Enfin je remercie tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Khadidja

## Résumé

Les lectines forment une famille de protéine et de glycoprotéine hétérogène qui reconnaissent certaine structure oligosaccharide, ce sont des protéines ubiquitaire, polyvalente et d'origine non immunitaire, qui se lient de manière réversible et spécifiquement aux hydrate de Carbone.

Elles sont multivalentes et provoquent dans certains cas l'agglutination des cellules, elles sont trouvées pratiquement dans tous les organismes vivants.

Les champignons y compris les champignons microscopiques et levure appartiennent à une importante division d'organisme qui fait l'objet d'un important intérêt ces dernières années dans diverse applications biotechnologique et leur potentiel biomédicale.

Notre objectif se trouve dans la caractérisation partielle des lectines extraite d'un champignon appelée « *polypore soufré* ».

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests, afin de trouver une activité hémagglutinante, trouver leur Phi, thermo-stabilité, leur interaction et affinité avec les sucres. Elles sont ensuite dessalées par une chromatographie d'exclusion moléculaire. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

L'effet anti-inflammatoire de champignon « *polypore soufré* » a été évalué sur les rats Wistar de poids allant de 100 à 120 grammes. Le Diclofénac et l'extrait brut de ce champignon sont administrés par voie intrapéritonéal avant l'induction de l'inflammation (l'œdème de pied) par le formaldéhyde injecté par voie sous-cutanée.

Mot clés : Lectine ; Agglutination ; Hétérogène ; Ubiquitaire ; Multivalente ; Polypore soufré ; Affinité ; Dessalage ; Anti-inflammatoire ; Œdème.

## Abstract

Lectins form a family of heterogeneous protein and glycoprotein that recognize certain oligosaccharide structures, they are ubiquitous, polyvalent proteins of non-immune origin, which bind reversibly and specifically to carbohydrate hydrate.

They are multivalent and in some cases cause agglutination of the cells they are found in virtually all living organisms.

Fungi including microscopic fungi and yeast belong to an important organism division that has been of great interest in recent years in various biotechnological applications and their biomedical potential.

Our objective is found in the partial characterization of lectins extracted from a mushroom called (polypore sulfur).

These proteins were extracted and subjected to several tests, in order to find a hemagglutinating activity, found their Phi, thermo stability, their interaction and affinity with sugars. They are then desalted by molecular exclusion chromatography. The evaluation of their state of purity is made under denaturing conditions (SDS-PAGE).

The anti-inflammatory effect of "polypore sulfur" mushroom was evaluated on Wistar rats weighing from 100 to 120 grams. Diclofenac and the crude extract of this fungus are administered intraperitoneally before the induction of inflammation (foot edema) by the injected formaldehyde subcutaneously.

Key words : Lectin ; Agglutination ; Heterogeneous ; Ubiquitous ; Multivalent ; Sulphurous polypore ; Affinity ; Desalting ; Anti-inflammatory ; Edema.

## ملخص

تشكل الليكتن عائلة مكونة من بروتين غير متجانس و الغليكوبروتين تتعرف على بنى أوليجوساكاريد معينة، وهي بروتينات متعددة التكافؤ في كل مكان من أصل غير محصن، والتي تربط عكسيا وتحديدا بالكربوهيدرات . الخلايا الموجودة في جميع الكائنات الحية تقريبًا.

تنتمي الفطريات، بما في ذلك الفطريات والفيروسات المجهرية، إلى تقسيم حيوي مهم كان محل اهتمام كبير في السنوات الأخيرة في مختلف تطبيقات البيو تكنولوجيا وإمكانياتها الحيوية الطبية.

تم العثور على هدفنا في التوصيف الجزئي للكمانين المستخرجة من فطر يسمى (*polypore soufré*). تم استخراج هذه البروتينات وتخضع لعدة اختبارات، من أجل العثور على نشاط التلقيح، وجدت PHI، قابلية للحرارة، تفاعلها وتربطها مع السكريات.

يتم تقييم التأثير المضاد ثم يتم تحليلها بواسطة كروماتوجرافيا استبعاد جزيئي. يتم تقييم حالة النقاء تحت ظروف تغيير التي تزن من 100 إلى 120 جرامًا. تدار ديكلوفيناك Wistar على فئران « *polypore soufre* » لالتهابات لفطر والمستخلص الخام من هذا الفطر البروتيني قبل تحريض الالتهاب (وذمة القدم) عن طريق حقن الفورمالدهيد تحت الجلد.

الكلمات الرئيسية: الليكتن. كتل. غير متجانسة. في كل مكان. متعددي. بوليمرات سولفوروية تقارب. تحليلية. المضادة لالتهابات. وذمة.

# Sommaire

<b>I. Introduction.....</b>	<b>16</b>
• Objectif du travail.....	18
<b>II. Généralités sur les lectines.....</b>	<b>19</b>
1. Définition des lectines.....	19
2. Historique.....	20
3. Structure des lectines.....	23
2.1. Les lectines simples.....	23
2.2. Les lectines en mosaïque.....	24
2.3. Les assemblages macromoléculaires.....	24
2.4. Structure tridimensionnelle classification des lectines.....	25
4. Classification des lectines.....	25
5. Les lectines présentes chez les plantes.....	25
5.1. Les mérolectines .....	26
5.2. Les hololectines .....	26
5.3. Les chimérolectines .....	27
5.4. Les superlectines .....	27
6. Les lectines présentes chez les animaux .....	27
6.1. Les lectines intracellulaire .....	27
6.2. Les lectines extracellulaire .....	28
7. les lectines des microorganismes .....	28
7.1. Les lectines bactériennes .....	28
7.2. Les lectines fimbriales.....	29
7.3. Les toxines .....	29
7.4 Les lectines solubles .....	30
8. Les lectines de champignons .....	31
8.1. Caractéristiques.....	32
8.2. Rôles.....	32
9. Spécificité et affinité des lectines.....	32
10. Le site de reconnaissance .....	33

11. Rôle des lectines chez les organismes vivants .....	33
12. Domaines d'applications des lectines.....	34
13. Les lectines les mieux connues .....	36
14. propriétés biologique des lectines.....	37
<b>III. Généralités sur le champignon polypore soufré.....</b>	<b>38</b>
1. Définition .....	38
2. Classification scientifique.....	38
3. Morphologie, reproduction et développement.....	39
3.1. Description.....	39
3.1.1. chapeau .....	39
3.1.2. La chaire.....	40
3.1.3. Pores / tubes .....	40
3.1.4. Pieds .....	40
3.1.5. Biotopes .....	40
• Risque de confusion et comestibilité.....	40
4. Importance forestière.....	41
5. Association .....	41
6. Culture .....	42
<b>IV. matériels et méthodes.....</b>	<b>43</b>
1. Extraction et fractionnement des protéines .....	43
2. Dosage des protéines.....	44
3. Tests d'héماغglutination.....	44
➤ Réalisation du test d'héماغglutination.....	45
➤ 44Test de la limite d'héماغglutination.....	45
➤ Effet de la température sur l'héماغglutination.....	46
➤ Effet de la température sur la limite de l'héماغglutination.....	46
➤ Effet du ph sur l'héماغglutination.....	46
➤ Effet du ph sur la limite d'héماغglutination.....	47
➤ Test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines .....	47
➤ Test de la limite d'inhibition de l'héماغglutination par les saccharides et les glycoprotéines.....	47
4. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.....	48
➤ Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium.....	49
5. Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire .....	49
➤ Test d'héماغglutination après dessalage.....	50

6.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium....	51
7.	Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon chez les rats.....	51
	➤ Induction et détermination du volume de l'œdème.....	52

## **V. Résultats et discussion .....54**

1.	Dosage des protéines.....	54
2.	Tests d'hémagglutination.....	55
	➤ Test d'hémagglutination réalisé après fractionnement des protéines.....	55
	➤ Dosage de l'homogénat.....	56
	➤ Test de la limite d'hémagglutination .....	56
	➤ Test de l'effet de température sur l'hémagglutination.....	57
	➤ Test de l'effet de la température sur la limite d'hémagglutination.....	58
	➤ Test de l'effet du ph sur l'hémagglutination .....	59
	➤ Test de l'effet du ph sur la limite d'hémagglutination .....	60
	➤ Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.....	62
	➤ Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine.....	64
3.	La précipitation différentielle au sulfate d'ammonium .....	66
	➤ Test de la limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium .....	66
4.	Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire .....	67
	➤ Test d'hémagglutination après dessalage .....	69
	➤ La concentration des protéines .....	70
	➤ La lyophilisation .....	70
5.	SDS-PAGE.....	71
6.	Résultat de l'étude des propriétés anti-inflammatoires du champignon chez les rats	72
	➤ Etude statistique (test anova) .....	73

## **VI. Conclusion générale .....75**

➤ Prescriptives .....	76
-----------------------	----

Références bibliographiques .....	77
-----------------------------------	----



## Liste des figures

**Figure 01** : Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides. Lis, H., and Sharon, N. (1986).

**Figure 02** : présentation d'un monomère de concanavaleine A de « *Canavalia ensiformis* » (Lenka s, Imberty A., Jaroslav, k, 2006).

**Figure 03** : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexe à l'acide sialique (Lenka et al. 2006).

**Figure 04** : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia coli* (Lenka, 2006).

**Figure 05** : Tétramère de la protéine Con M de « *Canavalia maritima* » complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre et al, 2006).

**Figure 06** : Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) (Somers, et al. 2000).

**Figure 07** : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH complexé avec butyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W).

**Figure 08** : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, E.A., and Hol, W.G.J.1995).

**Figure 09** : *polypore soufré* « *Laetiporus sulphureus* » sur un tronc de cerisier en Ukraine (George Chernilevsky).

**Figure10** : description de *polypore soufré*.

**Figure11** : chapeau de *polypore soufré*.

**Figure 12** : la chaire de *polypore soufré*.

**Figure 13** : *polypore soufré* au foret.

**Figure14** : tube collecteur.

**Figure 15** : courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance à 280nm en fonction du volume d'élution des fractions protéique.

**Figure 17** : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes.

**Figure 18** : effet anti inflammatoire d'un extrait de lectine après injection de formaldéhyde chez les rats.

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : Historique et propriétés des lectines les plus connues (Renato DE A, Moreira. 1991).

**Tableau 02** : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (Karoline S.A, 2008).

**Tableau 03** : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al. 1998).

**Tableau 04** : Lectines bactériennes solubles.

**Tableau 05** : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994).

**Tableau 06** : La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines (Renato, et coll. 1991).

**Tableau 07** : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant (Guillot, J., Kanska G., 1997).

**Tableau 08** : lectines importantes (Mancheno j. Tateno H ; Goldstein I.J., Martinez-Ripoll M. Hermoso J., 2005).

**Le tableau 09** : les différentes propriétés des lectines.

**Le tableau 10** : Classification scientifique.

**Tableau 11** : les sucres utilisés.

**Tableau 12** : la table monogramme de Cooper.

**Tableau 13** : Préparation de la colonne g25.

**Tableau 14** : Intervalle de fractionnement du gel séphadex G25.

**Tableau 15** : Composition des lots.

**Tableau 16** : résultats du dosage des protéines.

**Tableau 17** : résultats du test d'hémagglutination des quatre surnageant.

**Tableau 18** : résultats du dosage des protéines de l'homogénat.

**Tableau 19** : Résultats du test de la limite d'hémagglutination.

**Tableau 20** : dilution des protéines en (mg/ml) a 280nm et 260nm.

**Tableau 21** : résultat du test de l'effet de température sur l'hémagglutination.

**Tableau 22** : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination.

**Tableau 23** : résultats du test de l'effet du PH sur l'hémagglutination.

**Tableau 24** : résultat du teste de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination.

**Tableau 25** : Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines.

**Tableau 26** : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine.

**Tableau 27** : Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium.

**Tableau 28** : résultats du dosage des 56 fractions obtenues après purification des protéines.

**Tableau 29** : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les 56 fractions obtenues après purification des protéines.

**Tableau 30** : résultats du dosage des protéines concentrées.

**Tableau 31** : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse.

**Tableau 32** : Résultats d'étude des propriétés anti-inflammatoire du champignon chez les rats.

**Tableau 33** : Etude statistique (test anova).

## Liste des abréviations

**A** : Absorbance

**ConA** : Concanavaline A lectin

**ConM** : Canavalia Maritima

**CRD** : site de liaison aux hydrates de carbonés (Carbohydrate Recognition Domain)

**DisclI; DisclII** : Discoidine 1 et 2

**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique

**KDa** : kilo Dalton

**PBS** : Phosphate buffer saline

**PAPG** : Pyelonephritis-associated Pili G(sous-unité). C'est une adhésine (Protéine)

**PAMPs**: Pathogen-associated molecular patterns

**PA-IIL** : Pseudomonas aeruginosa lectin II

**SDS-PAGE** : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**TrFBL1 et 2** : Terfezia Boudieri Fruiting Body Lectin1 et 2

**TSA** : Thermal Shift Assay

**Tris** : 2-amino-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol

**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

## I. Introduction

Les Lectines sont des protéines ou glycoprotéines qui interagissent avec les sucres solubles ou fixés ; et également avec les glycoprotéines membranaires. Elles se combinent spécifiquement avec les mono et oligosaccharides par des liaisons réversibles autres que covalentes. Ce sont des oligomères de protéines multivalentes, et ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand **(Sharon et Lis, 1998)**

Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissances pour les sucres par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses **(Liener et al., 1986)**.

L'ajout de certains glucides à ces protéines lors de l'interaction, leur activités hémagglutinante est inhibée ce qui permet la détermination de leur spécificité **(Van Damme et al, 1998)**.

Cette structure polyvalente confère aux lectines l'aptitude d'agglutiner des cellules portant sur leur membrane externe les fractions saccharidiques appropriées (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués ; donc elles sont aussi appelées agglutinines. **(Goldstein et al)**.

La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène. **(Kocourek and horejsi, 1981)**.

A l'inverse des anticorps, qui ne sont formés que suite à un stimulus, les lectines sont, comme les immunoglobulines des substances présentes naturellement dans les organismes **(Nultsch, 1998)**. Leurs capacités à distinguer entre soi et non-soi rend partie du système de l'immunité innée **(Yang et al. 2011)**.

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent chez toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux **(Goldstein, 1978 ; Pusztai et al. ,1983 ; Etzler, 1985 ; Kokourek, 1983 ; Liener et al. ,1986)**.

On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité osidique :

- Celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique.
- Celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides **(Sharon et lis, 2003)**.

La présence des lectines a été rapportée dans plusieurs variétés de plantes. Elles sont rencontrées dans de nombreux légumes secs **(Yagi et al. 2002 ; Rüdiger 2001)**.

La première agglutinine connue, la RICINE ; fut extraire en 1888 à partir de (***Ricinus communis***, ***Euphorbiacée***) par (**stillmark**) peu après fut isolée l'Abrine des graines d'*Abrus precatorius* (*Papilionacée*). Il a été ensuite montré que les substances isolées étaient en fait un mélange de deux lectines ; l'une agglutinante et peu toxique, l'autre non agglutinante et très toxique. C'est à cette dernière qu'est réservée maintenant le nom ricine. La première agglutinine à être purifiée fut la concanavoline A (ConA) tirée des graines du pois-sabre (*Canavalia ensiformis*, *Papilionacée*)

Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées. Elles sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes. Actuellement, certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour le typage du sang, principalement en raison de l'indisponibilité d'anticorps anti -O (H) naturels et en raison du fait que certaines d'entre elles distinguent les sous-groupes A1 et A2 (**Lerner, 1976**).

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

- **Objectif de notre travail**

Le but principal de notre étude consiste, en une purification partielle, et une caractérisation des lectines d'un champignon appelé « *polypore soufré* ».

Le protocole et les méthodes utilisées que nous avons choisi de suivre sont les suivants :

- Extraction et Fractionnement des protéines à partir de champignon « Polypore soufré » broyés dans l'azote liquide et dilués dans un tampon phosphate (PSB) suivis de filtrations et de centrifugations.
- Test d'hémagglutination sur érythrocytes de lapin afin de déterminer l'activité hémagglutinante des protéines.
- Evaluation de la variation du pH et de la température sur l'activité hémagglutinante de ces lectines.
- Test d'inhibition d'hémagglutination en présence de différents (mono, di) saccharides et des glycoprotéines pour déterminer la spécificité.
- Purification partielle par chromatographie sur gel d'exclusion.
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.
- Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon chez les rats.

## II. Généralités sur les lectines

### 1. définition

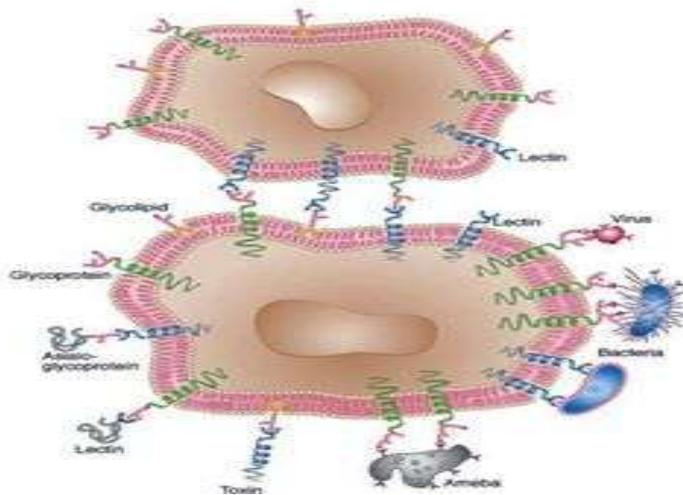
Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine non immunitaire « virale, bactérienne, végétale ou animale », leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD ; dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (**Goldstein et al, 1980**).

L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire. Les lectines sont présentes dans toutes les branches du règne vivant.

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaisons pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte à l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leurs détections (**Rüdiger, 1993**) et leur caractéristique (**Goldstein et al, 1980**).

Ces protéines sont généralement multivalentes, puisqu'elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule car elle est formée de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Hopkins et Evrard, 2003**).

Les lectines ne présentent pas une très grande affinité pour leurs ligands. Cette faible affinité, avec une constante d'affinité de l'ordre du milli molaire (mM), est souvent compensée par la multivalence de ces protéines par la présence de plusieurs sites de fixation aux sucres. Les lectines sont capables de reconnaître des monosaccharides mais aussi des sucres plus complexes de nature oligosaccharidique. Cette reconnaissance protéines-glucides menée par les lectines, permet de nombreux phénomènes de reconnaissance dans l'adhésion cellulaire. La figure suivante illustre le rôle des glycoconjugués sur la surface cellulaire



**Figure 01: Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Lis, H., and Sharon, N.1986)**

L'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et du thymus sont provoquer par les lectines, ces effets néfastes sont inactivés par le traitement thermique dans l'efficacité est en fonction de la température et la durée du traitement (**Meite et al, 2006**). Il existe aussi des lectines thermorésistante (**guillaume, 1993**).

Elles interagissent aussi avec des systèmes biologiques et développer une université d'événement et de fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologique (**lis and Sharon, 1998**).

## 2. historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (Sharon et Lis, 2004). A partir de ce moment-là, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinines ont été découvertes. En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isole à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaleine A (Sumner, 1919). Il fallut patienter presque vingt ans et les travaux de Sumner et Howells en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'hémagglutination de la concanavaleine A par des saccharoses (**Sumner et Howells, 1936**). En 1954, Boyd et Sharp Leigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytaires humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd et Sharp Leigh, 1954**). L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes. Cette découverte amène Boyd à remplacer le terme

d'hémagglutinine par celui de lectine (de latin, légère : choisir – préférer) (Sharon et Lis, 2007).

**Tableau 01 : Historique et propriétés des lectines les plus connues (Renato DE A, Moreira, 1991).**

Année	Chercheur	Titre de la recherche
1884	Warden&waddel Bruyllant&Venneman	La toxicité de la graine de l' <i>Arbusprecatorius</i>
1886	Dixson	La toxicité des graines de ricin : <i>Ricinuscommunis</i>
1888	Stillmark	L'activité hémagglutinante de <i>Ricinuscommunis</i> la toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Ehrlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	L'activité hémagglutinante de la graine de <i>l'abrus Precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Haute Température
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1917	James B. Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A (Con A)
1926- 1927	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1936	Summer&Howell	La spécificité de la concavoline au sucre
1947- 1949	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples. Démonstration avec l'aide de lectines que les

		sucre sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharp Leigh	Introduction au terme de : lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Goldstein & Agrawal	Purification des lectines par la chromatographie d'affinité
1981	Reinsner et al	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1988	D'Oliveira et al	Usage des lectines dans le traitement des pathologies pancréatiques
1990	Yamauchi & Minamikawa	Clonage et expression de gène de la concavaline A chez <i>Escherichia Coli</i>
1995	HIROKAZU KA WAGISHI	Les lectines chez les champignons (MUSHROOM LECTINS.2015)
2002	Hexiang Wang <i>et al</i>	L'isolement d'une nouvelle hétérodimerique lectine avec une activité mitogénique à partir d'un champignon : <i>Agrocybe cylindracea</i>
2002	FRANCO M. LAJOLO & MARIA INEÄ S GENOVESE	L'importance nutritionnelle des lectines légumineuses et leur activité inhibitrice des enzymes (Lajolo 2002, <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2002, 50, 6592-6598)
2003	M.W. Turner	Le rôle de la lectine liant le mannose dans le traitement et les maladies
2004	Ilka M. Vasconcelos Jose' & Tadeu A. Oliveira	L'activité anti-nutritionnelle des lectines végétales (Antinutritional properties of plant lectins -Toxicon 44 (2004) 385-403)
2011	POIROUX Guillaume	Évaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photo chimiothérapie

2015	Yau Sang Chan & Tzi Bun Ng	Lectine avec un grand potentiel d'inhibition des cellules cancéreuses mammaliennes du champignon comestible de l'espèce : <i>Dioscorea opposita</i> cv. de la région Nagaimo au Japon
------	----------------------------	---

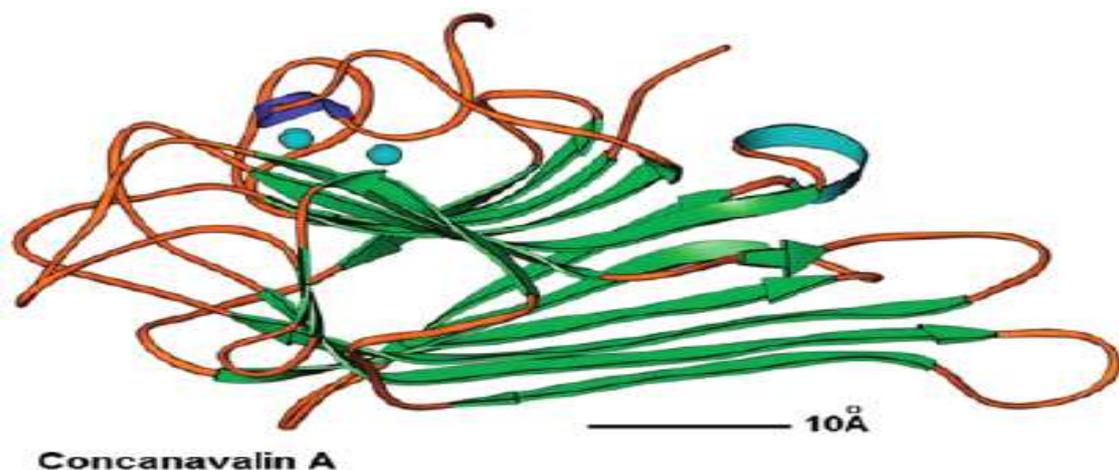
### 3. Structure des lectines :

D'un point de vue structural, les lectines sont divisées en 3 grandes classes selon leur topologie :

#### ➤ 3.1 Les lectines simples :

Elles sont formées de plusieurs monomères dans la masse moléculaire ne dépasse pas 40KDA. Cette classe comprend toute les lectines végétales ; les lectines bactériennes ; et les galéctines (famille des lectines animale spécifique pour le galactose) (**Figure 2**) (Lenka s, Imberty A., Jaroslav, k, 2006)

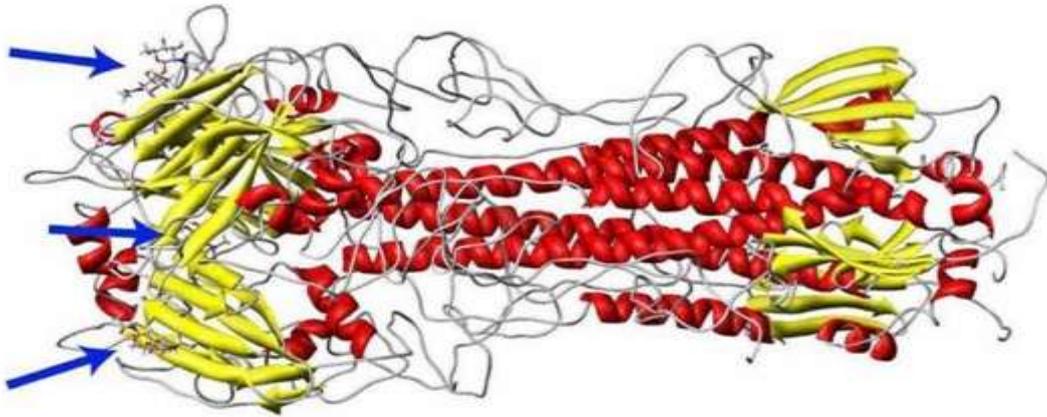
La protéine est représentée par un ruban bleu pour les hélices alpha, un ruban vert pour les brins bêta, et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté en forme de bâton et les cations en boule



**Figure2 : Présentation d'un monomère de concanavoline A de Canavalia ensiformis) (Lenka s, Imberty A., Jaroslav, k, 2006)**

#### ➤ 3.2 Les lectines en mosaïque :

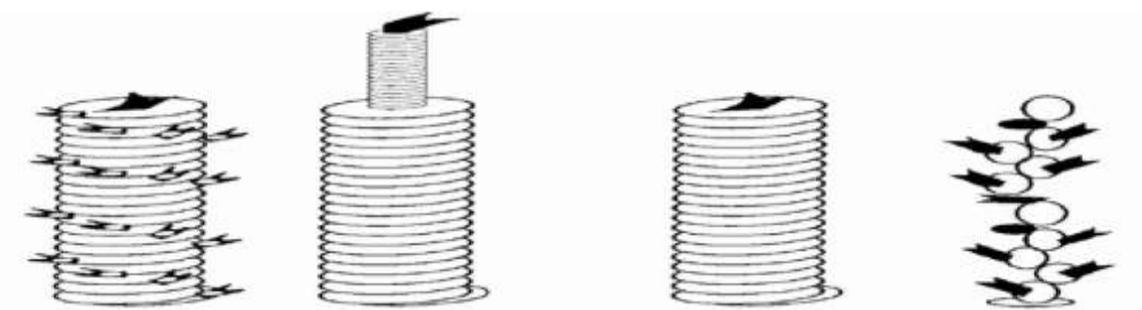
Cette classe regroupe diverses lectines des différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs types de domaine ou modules, dont un seul possède, le site de liaison (**Lenka et al, 2006**) (**figure 3**)



**Figure 3 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexe à l'acide sialique (Lenka et al, 2006).**

### ➤ 3.3 Les assemblages macromoléculaires

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries ; ou elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de longueur ; appelées fimbriae ou pili. la plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante ; qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités ; généralement une composante minoritaire ; possède le site de liaison pour les glucides et il est donc responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (**Lenka et al.2006**).



**Figure 04 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli (Lenka, 2006).**

### ➤ 3.4. Structure tridimensionnelle :

La structure tridimensionnelle des lectines est constituée de feuilles  $\beta$  reliés par un nœud et formant des chaînes antiparallèles avec des hélices  $\alpha$ , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon & Lis, 1990). Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regrouper jusqu'à trois régions d'interactions et les ions métalliques ( $Mn^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) nécessaires à ces interactions, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction : lectine-carbohydate. (Sharon & Lis, 1990 ; Young et Oomen, 1992).

## 4. Classification des lectines :

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, abondantes chez tous les organismes vivants. Une grande variété de lectine présente une diversité structurale. . Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle de plus de 1000 lectines. La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes.

**Tableau 02 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (Caroline S.A, 2008)**

<i>Origine</i>	<i>Exemple de lectine</i>	<i>Native</i>	<i>Complexé</i>	<i>Total</i>
<i>Plante</i>	ConA, ricine	106	201	307
<i>Bactéries</i>	PA-IL de Pseudomonas Toxine de Cholera	37	79	116
<i>Animaux</i>	E-selectin Helix pomatia Agglutinin	80	152	232
<i>Virus</i>	Hémagglutinine de virus Capside de Rota virus	43	25	68
<i>Champignon</i>	Lectine de Mousseron	17	23	40
<i>Algues</i>	Griffithsin	2	7	9

## 5. Les lectines présentes chez les plantes :

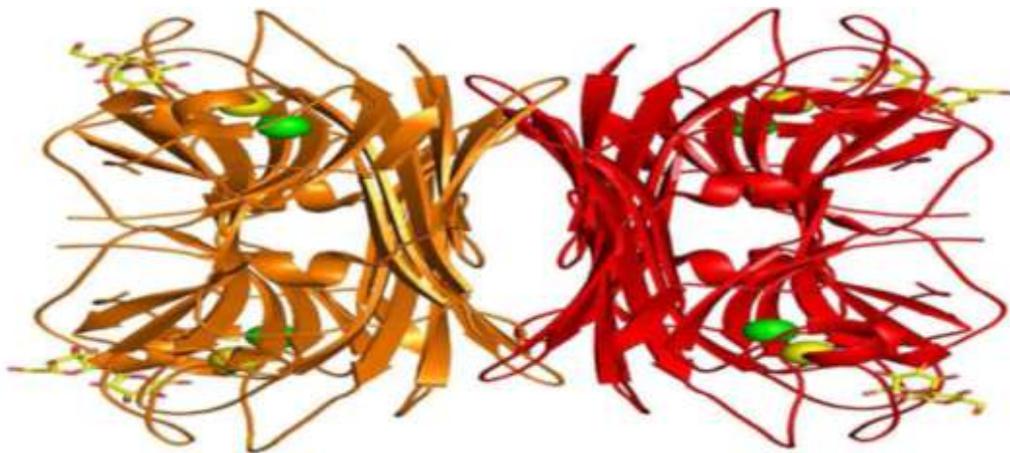
Chez les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermatophytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (Grant, 1991 ; Renkonen, 1948).

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (ex. les lectines de légumineuses, de céréales, etc.) présente des homologies de séquences et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concavaline A (Con A) ont été les premières à être caractérisées.

Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé «  $\beta$  Jelly roll » formé par deux feuillets  $\beta$  superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variété d'assemblages macromoléculaires sous forme de dimères ou de tétramères (Sinha et al, 2007).

La Figure 4 représente un tétramère de la protéine Con M de *Canavalia maritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose (Delatorre et al, 2006).

La géométrie du site de fixation est fixée par la présence d'un ion manganèse et d'un ion calcium qui sont proches du ligand glucidique mais qui n'interagissent pas directement avec lui. Les variations en acides aminés autour du site de reconnaissance apportent la spécificité pour différents monosaccharides et oligosaccharides (Loris et al, 1998). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune, Manganèse en vert et les ligands par des bâtonnets).



**Figure 05 : Tétramère de la protéine ConM de « *Canavalia maritima* » complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre et al, 2006).**

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

### ➤ 5.1 Les Mérolectines :

Les mérolectines sont de petits peptides, formées d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides exemple : (héveine, protéines d'Orchidées). Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.

### ➤ 5.2 Hololectines :

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

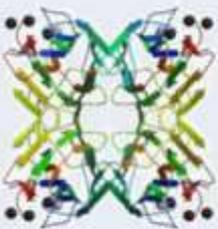
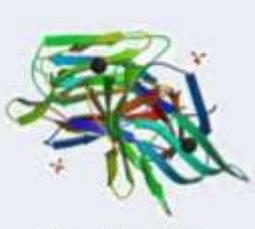
➤ **5.3 Les Chimérolectines :**

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

➤ **5.4 Les superlectines :**

Peuvent être des hololectines possédant plus de deux sites de reconnaissance des glycanes, chaque site de reconnaissance peut reconnaître des structures glycaniques différentes. Les superlectines peuvent aussi être considérées comme des chimérolectines composées cette fois-ci de deux domaines fixant les glycanes, ces deux domaines sont structuralement et fonctionnellement différents l'un de l'autre.

**Tableau 03 : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al. 1998).**

Les mérolectines	Les hololectines	les chimérolectines	les superlectines
 <p>Heveina (1HEV)</p>	 <p>ConBr (3JU9)</p>	 <p>PPL2 (2GSJ)</p>	 <p>Banana lectin (2BMY)</p>

**6. Les lectines présentes chez les animaux**

Chez les animaux, il existe 13 familles de lectines, on peut les diviser en deux groupes :

➤ **6.1. Lectines intracellulaires**

Les lectines intracellulaires sont composées de quatre groupes : les calnexines, les lectines de type M, P et L. ces lectines jouent des rôles essentiels dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (Chabrol et al, 2012).

## ➤ 6.2. Lectines extracellulaires

Les lectines extracellulaires comprennent toutes les lectines restantes, comme celles de type C et R, ainsi que les galéctines, elles sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance de certaines pathologies (Chabrol et al. 2012).



Figure 06 : Représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le SialylLewisX (PDB 1G1T) (Somers, et al. 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

## 7. Les lectines des microorganismes :

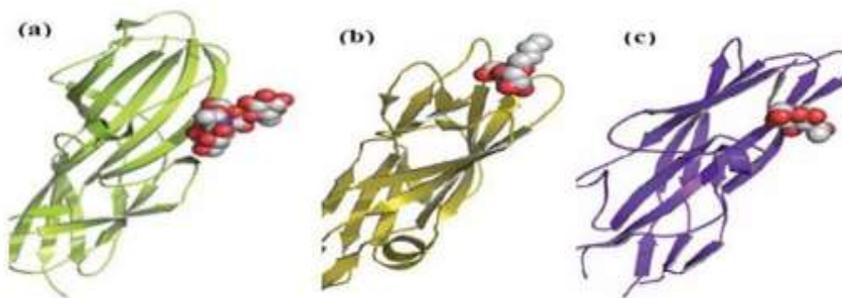
Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M.2005) (Sharon, N.1996). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales (Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M.2005)

### ➤ 7.1. Les lectines bactériennes :

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol, et jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte pendant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré bien évidemment beaucoup d'attention dans ces dernières années (Sharon, N.1996). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles : les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles qui n'appartiennent pas aux deux premières classes (Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M.2005)

## ➤ 7.2 Les lectines fimbriales

Les bactéries sont dotées d'organelles de surface appelés fimbriae qui servent à différentes fonctions, comme la reconnaissance et l'adhésion sur des surfaces diverses et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes (27). Des centaines de fimbriae sont attachés à la surface d'une cellule bactérienne. Dans les trois différents types de fimbriae qui ont été observés (type 1, type P et type IV) l'organisation structurale est similaire (28). Les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues jusqu'à aujourd'hui appartiennent aux pili de type 1 ou de type p et montrent que les domaines lectines adoptent des repliements similaires, basés sur une structure allongée de type  $\beta$ -sandwich. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un coté du domaine lectine (**Figure 07**).



**Figure 07 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH complexé avec butyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)**

## ➤ 7.3 Les toxines

Les toxines sont des protéines secrétées par la bactérie qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. L'endommagement de la cellule peut advenir par la rupture de la paroi cellulaire, par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines du type AB sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*E. Coli* (ETEC), *Shigelladysenteriae* et *Borderella pertussis*. Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B (Figure 08) qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire, comme le GM1, GM2 et le Gb3 (**Merritt, E.A., and Hol, W.G.J.1995**).

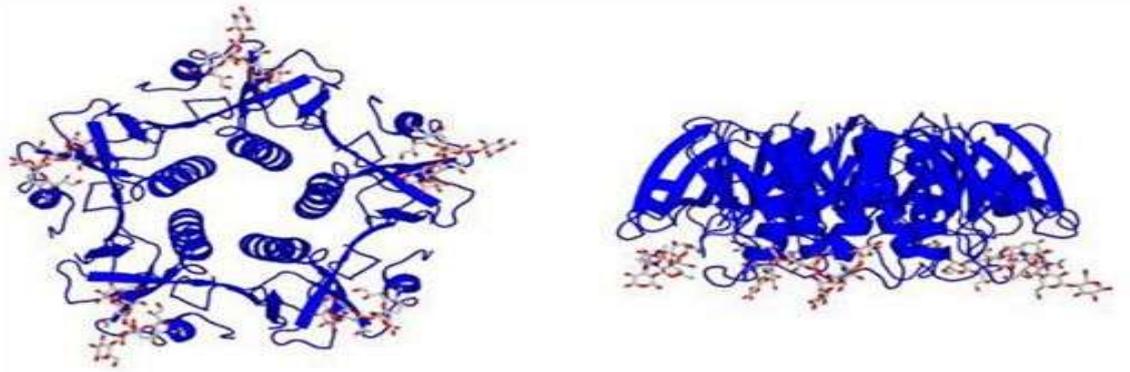


Figure08 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, E.A., and Hol, W.G.J.1995)

#### ➤ 7.4 Les lectines solubles

Seul un petit nombre de lectines solubles ont été caractérisées et le domaine d'étude est en pleine expansion. Dans cette famille de lectines bactériennes on regroupe toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie ayant une affinité pour des sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique (Kostlanova, N., Mitchell, E.P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lehmann, M., Gilboa-Garber, N., Chambat, G., Wimmerowa, M. and Imberty, A. (2005).

Tableau 04 : Lectines bactériennes solubles

Nom	Type	Spécificité	Caractéristiques
<b>Pseudomonas aeruginosa PA-IL</b>	Pathogène humain	Galactose	Lectine cytotoxique
<b>Pseudomonas aeruginosa PA-IIL</b>	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute affinité vers le fucose
<b>Cromobacterium violaceum CV-IIL</b>	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute homologie avec PA-IIL
<b>Burkholderia cenocepacia BCLx</b>	Pathogène humain	fucose/mannose	Gènes identifiés homologues à PA-IIL
<b>Ralstonia solanacearum RS-IIL</b>	Pathogène végétal	mannose/fructose	Très haute homologie avec PA-IIL
<b>Ralstonia solanacearum RSL</b>	Pathogène végétal	Fructose	Similaire à Aleria arantia lectin, une lectine de champignon

## 8. Les lectines de champignons

Les champignons, y compris les moisissures, appartiennent à une importante division d'organismes. N'étant pas aptes à utiliser la photosynthèse comme les plantes, ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils ont besoin et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui leur procurent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques.

Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines antifongiques, des ribonucléases, des protéines de type ubiquitine, des lectines, des cellulases, des xylanases, des laccases, des invertases et des tréhaloses phosphorylases **(Ng, 2004)**.

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons a été principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses **(She, 1998 ; Sze, 2004)**

L'abondance des lectines dans les champignons est remarquable, des tests d'hémagglutination réalisés sur plus de 411 spécimens ont permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés. **(Tableau 6)**

**Tableau 05 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)**

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
Aleuria aurantia (AAL)	2003	Fucose $\beta$ -propeller à 6 lames
Flammulina velutipes (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
Xerocomus chrysenteron (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
Coprineus cinerea (CGL2)	2004	Gal Galéctine
Agrocibe cylindracea (ACG)	2005	Gal Galéctines
Agaricus bisporus (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
Laetiporus sulphureus (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
Psathyrella velutina (PVL) 3116	2006	GlcNAc/NeuNAc $\beta$ - propeller à 7 lames

## ➤ 8.1 Caractéristiques

Les lectines de champignon qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en terme de taille (12-190 kDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines. De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

## ➤ 8.2 Rôles

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (**Guillot, 1997**). Les lectines des champignons joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la morphogenèse du corps fructifère ou comme protéines de défense immunitaire. Chez les saprophytes, les lectines pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats nutritifs. Par contre, chez les champignons qui adoptent un mode de vie parasitaire ou symbiotique avec d'autres organismes, les lectines sont probablement impliquées dans les processus de reconnaissance de l'hôte ou dans les premières étapes de la mycorrhization (**Giollant, 1993**).

## 9. Spécificité et affinité des lectines :

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

On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon, 2003**)

Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose(Gal)/N acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylgalactosamine(GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuNAc) (Lis and Sharon, 1998) Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les

épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (Dam and Brewer ,2002).

**Tableau 06 : La Spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato, et coll. 1991)**

ESPECES	SPECIFICITE
Abrus precatorius	Gal
Adenia digitata	Gal
Aleuria aurantiaca	L-Fuc
Canavalia brasiliensis	Man > Glc
Canavalia ensiformis	Man > Glc
Dolichos biflorus	GalNAc
Phaseolus vulgaris	GalNAc
Vicia sativa	Man
Ulex europaeus 1	L Fuc
Momordica charantia	GalNAc
Cytissus sessilifolia	GlcNAc >Fuc >Gal
Datura stramonium	GlcNAc

## 10. Site de liaison :

Les sites de liaisons sont généralement sous forme de creux peu profonds sur la surface de la protéine. Par contre, chez les lectines spécifiques aux oligosaccharides, les sites de liaisons sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (Figure 7) (Gianluca, 2006). Les liaisons hydrogène, ioniques et van der Waals entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et directionnelles, ce qui leur permet d'avoir une bonne affinité et spécificité (Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002).

## 11. Rôle des lectines chez les organismes vivants :

Ce tableau résume le rôle des différentes lectines chez les bactéries, les virus, les toxines, les plantes.

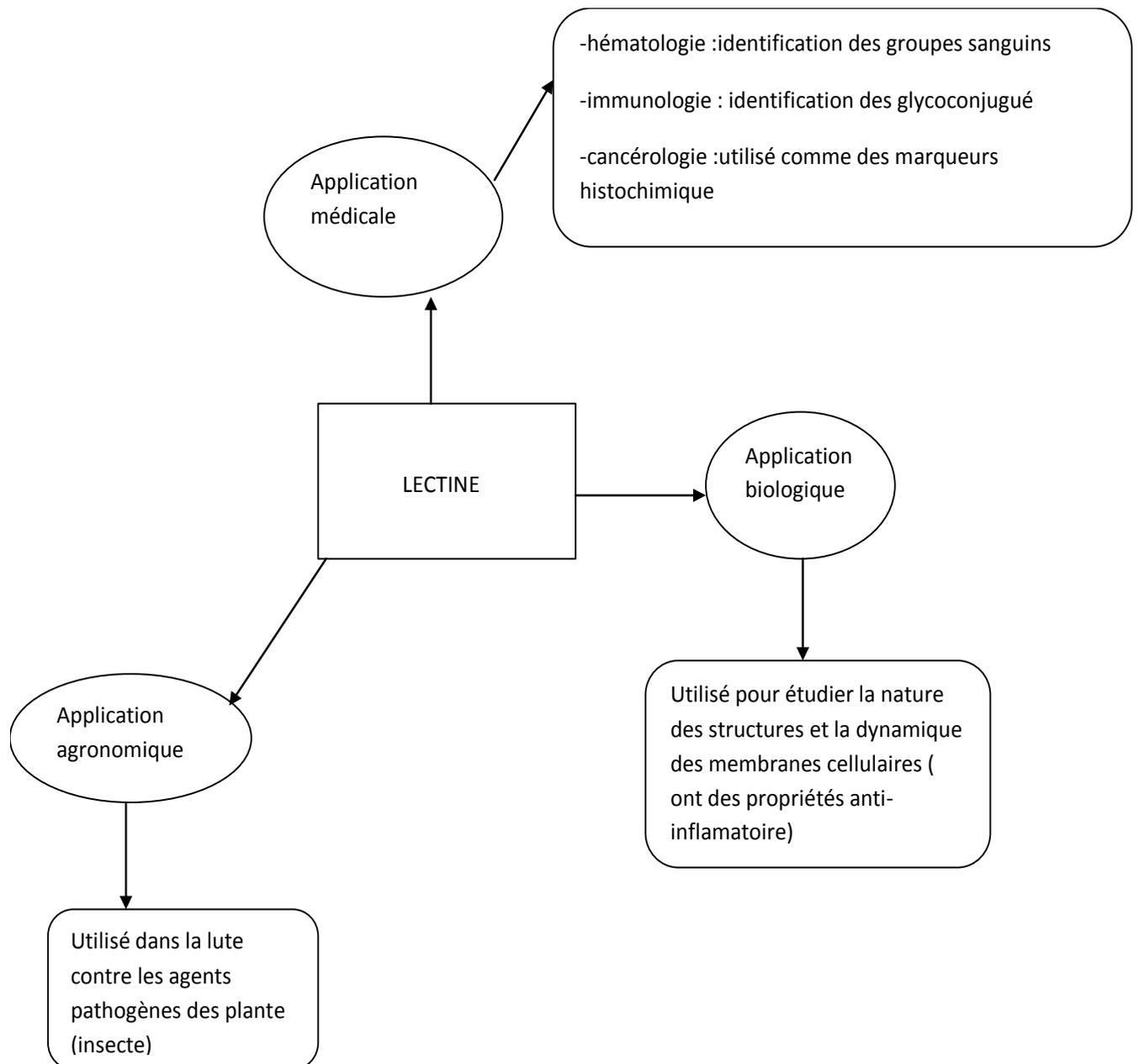
**Tableau 07 : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant (Guillot, J., Kanska G., 1997)**

Lectines	Rôles
<b>Bactéries</b>	
Lectines fimbriales	Adhésion, infection
Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines	Adhésion, infection
<b>Virus</b>	
Influenza hémagglutinine	Adhésion, infection

Amoeba	
Lectines de surface	Adhésion
Plantes	
Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
Autres	Défense
Galéctines	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire

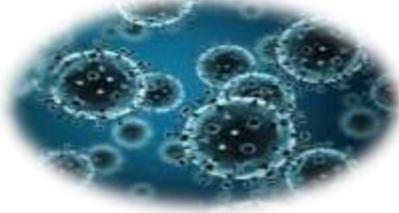
## 12. Domaine d'applications des lectines

Les ont été utilisé comme des indicateurs de l'existence d'anomalie du développement ou de transformation cellulaires dans certaines maladies. Par exemple : la CON-A immobilisé sur une matrice polysaccharidique comme l'agarose (**Toftager-Larsen et al, 1980 ; breborowicz et al ; 1982**) est utilisé pour étudié les modifications glycaniques et de l' $\alpha$ foetoprotéine du liquide amniotique des femmes enceintes entre la 14eme et 28eme semaine de gestation. Ce schéma résume l'utilisation des lectines dans des différents domaines d'applications



### 13. Lectines les mieux connues :

Tableau 08 : lectines importantes (Mancheno j. Tateno H ; Goldstein I.J., Martinez-Ripoll M. Hermoso J., 2005)

Lectines de légumes		concanavaline, Lectine de pois
Agglutinine du germe de blé		Utilisé dans l'étude des surfaces membranaires des cellules normales et cancéreuse
Ricine		Glycoprotéine cytotoxique provenant des graines de ricin
Toxine bactérienne		Entérotoxine thermolabile d'E. coli et toxine du choléra
Hémagglutinine du virus de la grippe		Responsable de l'attachement à la cellule hôte ainsi que la fusion membranaire
Lectine de type S		Lectine animales se liant avec les $\beta$ -galactose, elles ont aussi des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

## 14. Propriétés des lectines

Le tableau 09 : les différentes propriétés des lectines

Propriété	
Propriété biologique	Propriété médicinale
<p>➤ <b>Activité mitogène</b> : permet de transformer le petit lymphocyte e sang en cellules <i>plastique</i> (<b>Barbosa et al 2001</b>) aussi elle possède la capacité d'activité diverse lymphocyte (<b>Widmer, 1996</b>)</p>	<p>➤ <b>propriété anticancéreuse</b> : elles peuvent être injecté dans circulation sanguine afin d'induire spécifiquement la mort des cellules tumorales par apoptose (<b>Pairoux, 2011</b>)</p>
<p>➤ <b>agglutination des cellules</b> : elle signifie d'un point opérationnel que la lectine est au moins divalente (au moins 2 sites de fixations) cette propriété est utilisé pour la détection et la quantification de l'activité des lectines (<b>makila, 1957 ; krupe, 1956</b>)</p>	<p>➤ <b>Propriété antivirale</b> : au cours des infections virales les lectines sont impliquées dans la fixation et l'inhibition de la réplication des virus (<b>Xu étal ,2014</b>)</p> <p>➤ Aussi impliquée dans la détection des molécules pathogènes (PAMPs) associées au virus (<b>Kawamura et al, 2014</b>)</p> <p>➤ plus une capacité de bloquer l'infection du VIH-1 par inhibition de l'enzyme : rétro-transcriptase du virus (Tanaka et al ,2009 ; Hamid et al ,2013)</p>
<p>➤ <b>liaison avec les sucres</b> : la spécificité des lectines est dirigée d'une façon exclusive vers les sucres et leurs applications dans la purification et caractérisation des glycoprotéines est très courante</p>	<p>➤ <b>propriété antibactérienne</b> : les lectines sont capable de régulées la migration et l'adhésion des cellules bactérienne d'où leur activité anti bactérienne (<b>Tanne et Neyrolle, 2010</b>)</p>
	<p>➤ <b>Propriété antifongique</b> : quelque lectines qui possèdent un domaine catalytique ont une activité antifongique et appartiennent généralement à la classe 1 des chitinases (<b>Andrew et al, 2014</b>)</p> <p>➤ <b>propriété immuno-modulatrice</b> : nombreuse lectines ont la capacité d'exercer une activité immuno-modulatrice lors de la première interaction avec les glycanes présent al a surface des cellules immunitaire (<b>Abdeljalil et al, 2014</b>)</p>

### III. Généralités sur le champignon polypore soufré

Notre travail de recherche porte sur un champignon comestible (mais peut provoquer des allergies), de souche délaissé du côté d'atlantique mais fort prisé en Amérique du nord et au Canada. Ce champignon est cultivé sous le nom de «*Polyporus sulphureus*» il appartient à l'espèce «*Laetiporus sulphureus*» (Henri Romagnesi, 1995).



Figure09 : Polypore soufré «*Laetiporus sulphureus*» sur un tronc de cerisier en Ukraine photo (George Chernilevsky)

#### 1. Définition de *laetiporus sulphureuse*

C'est un champignon parasite ou saprophyte qui colonise, parfois de manière spectaculaire, les troncs de toutes sortes d'espèces de feuillus, très rarement de conifères et le plus souvent en hauteur. Un champignon qui provoque à son hôte une pourriture cubique rouge (des champignon utilisent des enzymes attaquant la cellulose, seule la lignine est épargnée, le bois prend une teinte brunâtre a roussâtre, perd la structure et devient particulièrement friable, il se fendille dans les trois directions perpendiculaires ; on parle de **pourriture cubique** , **pourriture brune**, ou encore **pourriture rouge** ), il est relativement précoce et fait ses premières apparitions dès le mois de (avril) mai pour se terminer en octobre/ novembre .

#### 2. Classification scientifique (tableau 10)

<b>Règne</b>	Fung
<b>Division</b>	Basidiomycota
<b>Sous-division</b>	Agaricomycotina
<b>Classe</b>	Agaricomycetes
<b>Ordre</b>	Polyporales
<b>Famille</b>	Fomitopsidaceae (SIF) ou polyproceae (INPN)
<b>Genre</b>	Laetiporus
<b>Espèce</b>	Laetiporus sulphureus

### 3. Morphologie, reproduction et développement

- 3.1. Description

Le polypore soufré est facilement repéré grâce à sa couleur jaune à rose vif, avec un jaune plus éclatant à la marge, la frange de la fructification. Ce champignon se rencontre du printemps à l'automne, sur l'écorce de troncs verticaux ou couchés (plus rarement à l'intérieur de cavités) de nombreux feuillus : chênes, châtaigniers, hêtres, cerisiers, pommiers, etc. ; il est plus rare sur conifères. C'est un redoutable parasite. Un arbre attaqué meurt rapidement, évidé par l'intérieur, tout en conservant son aspect extérieur (Henri Romagnesi, 1995)

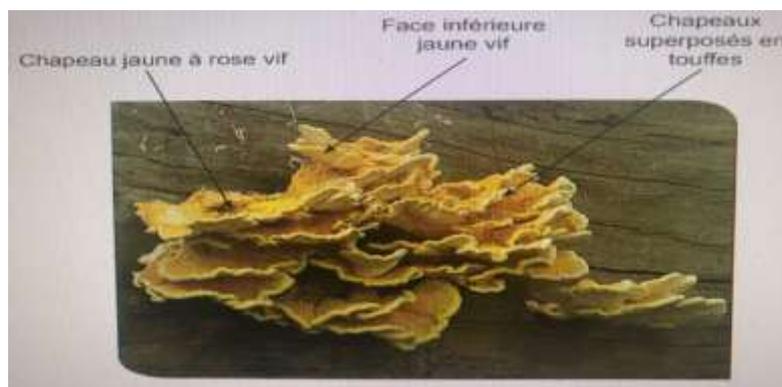


Figure10 : description de *polypore soufré*

- 3.1.1. Chapeau

De 10 à 20 cm voire d'avantage (50cm et plus), d'abord en forme de tubercule puis devenant semi-circulaire et s'aplatissant, à surface irrégulière, bosselée et veloutée, épaisse mais s'affinant avec l'âge, à marge arrondie et ondulée, de couleur allant du jaune sulfurin ou jaune citron à l'orange et le plus souvent bicolore mais pouvant parfois être blanchâtre selon le biotope, l'éclaircissement et le taux d'humidité, devenant généralement plus vive en vieillissement.



Figure11 : chapeau de *polypore soufré*

➤ **3.1.2. La chaire**

La chair du polypore soufré est épaisse (1 à 5 cm), de couleur blanche, homogène, tendre et charnue à l'état frais. Sèche, elle devient cassante et crayeuse, odeur fongique très agréable, saveur acidulée.



**Figure12 : la chaire de *polypore soufré***

➤ **3.1.3. Pores / tubes**

Courts de 1 à 4 mm, parois mince et jaune, pores concolores très fins arrondis-anguleux

➤ **3.1.4. Pied**

Base épaisse située dans le prolongement du carpophore sur laquelle viennent souvent s'imbriquer plusieurs individus.

➤ **3.1.5. Biotopes**

Essentiellement sur troncs abattus, souches et branches diverses des bois de feuillus, surtout de chênes et châtaigniers.

• **Risque de confusion et comestibilité**

La seule confusion possible pourrait éventuellement se faire avec le polypore géant. Mais celui-ci n'arbore pas des couleurs aussi chatoyantes. Le polypore soufré est comestible à l'état jeune, sa chair s'apparentant à celle du poulet.

#### 4. Importance forestière

*Laetiporus sulphureus* est un champignon saprophyte et parasite ; Il attaque le bois vivant du tronc ou des grandes charpentières et contamine le bois de cœur en épargnant l'aubier. La décomposition du bois (pourriture brun-rouge cubique) est rapide, provoquant la rupture. En forêt, les arbres atteints n'ont plus de valeur commerciale, ils seront laissés, la présence de bois mort favorisant la biodiversité. Mais aux alentours de zones fréquentées ou de voies de desserte, les arbres contaminés sont systématiquement coupés.



Figure13 : *polypore soufré* au forêt

#### 5. Association

- En Grande-Bretagne et / ou en Irlande :
  - Champignon / chargeur interne
  - La larve de *Cis bilamellatus* se nourrit de fruits de *Laetiporus sulphureus*
- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre de *Quercus*
  - Remarques : saison : début été à automne
  - Autre : hôte principal / proie
- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre des arbres feuillus
- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre de *Pinopsida*
  - Autre : hôte inhabituel / proie
- Plante alimentaire / safran
  - fructification de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre de *Larix*
  - Autre : hôte inhabituel / proie

- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre de *Pinus*
  - Autre : hôte inhabituel / proie
- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobienne sur le tronc du vieil arbre de *Pseudotsuga menziesii*
  - Autre : hôte inhabituel / proie
- Plante alimentaire / safran
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* est saprobique sur le tronc du vieil arbre de *Taxus baccata*
  - Autre : hôte mineur / proie
- Plante / parasite
  - fructifère de *Laetiporus sulphureus* parasite le tronc du vieil arbre de *Prunus avium* cv
  - Remarques : saison : début été à automne
  - Autre : hôte principal / proie

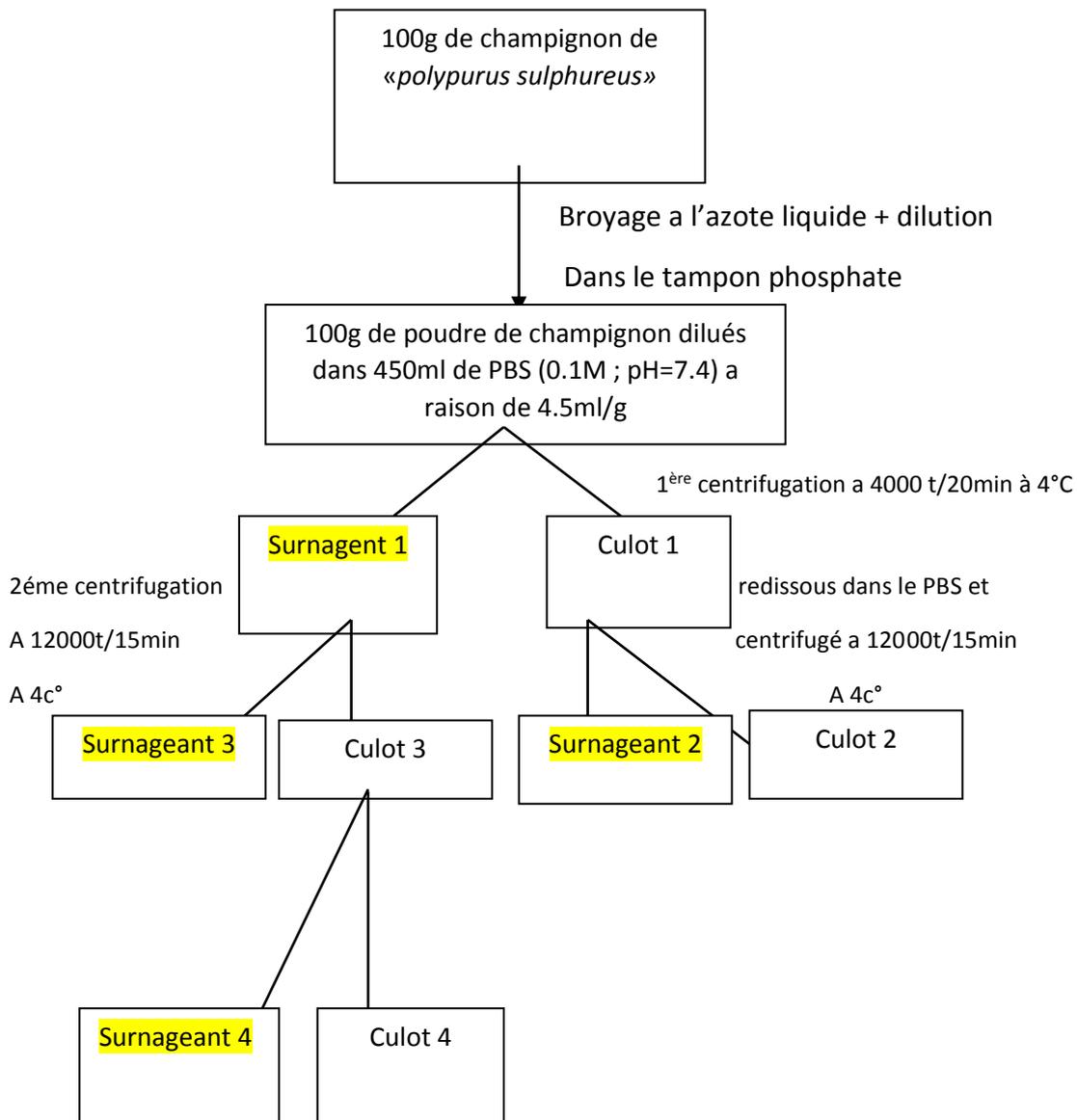
## 6. Culture

Comparée à des espèces telles que *l'Agaricus bisporus* (champignon de bouton) et le **champignon d'huître**, la culture commerciale de *Laetiporus* est limitée. Cependant, il peut être cultivé ; la production la plus fiable et la plus rapide de ce champignon est la culture à l'intérieur. Le champignon peut ou non exiger la chaleur et l'eau que font les champignons branchés, selon la souche. Le champignon est sensible aux niveaux de dioxyde de carbone et aux conditions de lumière. La culture artificielle sur substrat synthétique a été réalisée

## IV. Matériel et méthode

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

### 1. extraction et fractionnement des protéines



L'extraction des lectines a été faite selon la méthode de **(budu1988 et de cammue et al 1985)**

➤ **Broyage :**

100 g de champignon « *polypore soufré* » ont été broyés dans de l'azote liquide et ont été dilués dans 450 ml de tampon phosphate (PBS) (**Annexe 1**) à raison de 4.5ml/g, le tout est homogénéisé grâce à un Blender ultra-turax puis soumis à une centrifugation à 4000tours/20 min à 4C°.

Le surnagent est récupéré puis soumis à une 2ème centrifugation à 12000 tours/15min à 4C°.

Parallèlement, les 2 culots C1 C2 récupérés lors des 2 centrifugations sont redissous dans le PBS et centrifugés pendant 15 min à 12000 tours à 4C°.

Uniquement les surnageant issus de différentes centrifugations serviront pour la suite des techniques car ils manifestaient une densité optique à 280nm relativement appréciable.

Les quatre surnageant sont ensuite filtrés à travers des membranes millipores et des filtres seringuent conçus pour des seuils de filtration de 0,45µm de diamètre facilitant ainsi la récupération des protéines pour des applications critiques.

Le filtrât est conservé à 4°C.

## 2. Dosage des protéines

Nous avons procédé au dosage des protéines en mesurant l'absorbance au spectrophotomètre des différents extraits à 280nm pour les protéines et 260nm pour les acides nucléiques éventuellement présents dans nos solutions qui contaminent souvent les préparations de protéines. **Warburg et Christian (1941)** ont étudié les propriétés spectrales de ces deux macromolécules et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques qu'il faut retrancher par la suite.

$$[\text{Protéines}] (\text{mg/ml}) = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

## 3. Tests d'hémagglutination

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les extraits aux différents niveaux du processus de la purification des lectines. La mesure de l'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus utilisé pour leur détection et caractérisation (**Goldstein et al 1980 ; Rüdiger1993**).

Ce test est réalisé le plus souvent sur les hématies du lapin à 3%. Il est effectué sur des microplaques de titration et l'agglutination des globules rouges par les lectines forment une phase gélatineuse visible à l'œil nu. En absence de cette activité les hématies sédimentent par gravité au fond des puits.

#### ❖ La préparation des hématies à 3% :

La préparation de suspension des hématies est effectuée selon la méthode de **(Higuichi et al, 1988)**.

#### ❖ Lavage des hématies

Un prélèvement du sang oculaire est effectué, puis soumis à une première centrifugation à 4000 tours pendant 10 min à température ambiante.

Seul le culot résultant de cette centrifugation, soit un volume de (1.5 ml) riche en hématies, sera ajouté à 3.5 ml d'une solution de NaCl 0.9% (**Annexe 2**), puis mélangé doucement et enfin soumis à nouveau à une deuxième et une troisième centrifugation dans les mêmes conditions que la précédente (l'opération peut être répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sang clair).

#### ❖ Dilution des hématies

Après avoir terminé le lavage ; le culot contenant des globules rouges est dilué dans le chlorure de sodium (NaCl 0.9) à raison de 1.5 ml d'hématies dans 48.5 ml NaCl afin d'obtenir une solution des hématies à 3%.

#### ➤ Réalisation du test d'hémagglutination

L'activité hémagglutinante est réalisée dans des microplaques de titration ; grâce à une micro pipette (P100) 50 µl d'extrait sont déposés dans chaque puits de la microplaque auxquels on ajoute 50 µl d'hématie de lapin à 3%.

Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs composés chacun de 50 µl de solution tampon (PBS) et de 50 µl d'hématies à 3% (dépourvus d'échantillons).

Après une heure d'incubation à température ambiante la lecture est réalisée à l'œil nu et au microscope pour confirmation.

#### ➤ Test de la limite d'hémagglutination

Ce test a pour but de connaître la plus basse concentration en lectines pour laquelle une hémagglutination est encore visible, cette dernière est appelée le point d'équivalence et la concentration en lectine de ce puits correspond à une limite d'hémagglutination (UH).

Dans le premier puits de la microplaque 50 $\mu$ l ont été déposés ; puis 50 $\mu$ l de tampon phosphate ont été ajoutés dans tous les puits de la microplaque de la première ligne, ensuite des cascades de doubles dilutions sont réalisées dans les puits suivants de 1 à 12.

Enfin 50 $\mu$ l d'hématies de lapin qui sont ajoutés à tous les puits de la microplaque.

Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs qui sont composés de 50 $\mu$ l de solution tampon (PBS) et 50 $\mu$ l d'hématies à 3%.

Enfin la lecture de l'agglutination est effectuée à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

### ➤ **Effet de la température sur l'hémagglutination**

Afin de déterminer l'effet de la température sur l'hémagglutination, cinq (5) extraits de l'homogénat sont incubés durant une heure dans un bain marie à différentes températures 40°C, 60°C, 80°C, 90°C, 100°C puis refroidis pendant une demi-heure à température ambiante, les témoins subissent évidemment la même procédure

Un test d'hémagglutination est effectué par la suite. La lecture aura lieu après une heure d'incubation à température ambiante, et le résultat est observé à l'œil nu.

### ➤ **Effet de la température sur la limite de l'hémagglutination**

Ce test est réalisé seulement avec les échantillons qui ont résisté aux températures auxquelles ils ont été incubés. Ce test est fait avec des cascades de dilution selon la même technique décrite précédemment.

### ➤ **Effet du pH sur l'hémagglutination**

Avant d'effectuer le test d'hémagglutination, il faudra d'abord mettre une petite quantité de poudre de champignon environ 0.5g, cette dernière est déposée à égalité dans 12 tubes à essai contenant chacun 4ml de PBS à différentes valeurs de PH (préparation de différents tampons de PH variant de 1 à 12).

Après 24 heures d'incubation à 4°C les 12 tubes sont soumis à une centrifugation de 12000tour/mn pendant 15 min à 4°C.

Pour déterminer l'effet du PH sur l'hémagglutination le test est réalisé selon les étapes suivantes :

Douze (12) puits de la microplaque contiennent respectivement 50 $\mu$ l de chaque mélange et 50 $\mu$ l d'hématies de lapin.

Douze (12) autres puits sont réservés au témoin négatif (tampon PBS à différent pH de 1 à 12 plus les hématies de lapin). La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

### ➤ Effet du pH sur la limite d'hémagglutination

Dans chaque premier puits de la microplaque, sont déposés 50µl du mélange (poudre de champignon + PBS a pH donné) + 50µl de tampon phosphate (ph 7.4) dans tous les autres puits ; ensuite des cascades de double dilutions sont effectuées dans les puits suivants.

Les puits contenant les témoins négatifs sont effectués de la même manière précédente ; Les hématies de lapin sont rajoutées à tous les puits et la lecture est faite après une heure d'incubation à température ambiante.

### ➤ Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

Avant de faire ce test on passe d'abord par le test de la limite de l'hémagglutination qui nous permet de connaître le facteur de dilution qui correspond au sucre.

#### ➤ Test de la limite d'hémagglutination

50µl de tampon PBS+ 50 µl d'échantillon dans le premier puits et puis une double dilution est faite jusqu'au 12ème puits ensuite 50 µl d'hématies sont rajoutés. On réserve les 3 puits de la 2ème ligne pour les témoins (50 µl de tampon+50 µl de sang)

On attend environ 1 heure de temps et on observe les résultats. Après avoir obtenu le facteur de dilution on exerce le test de l'inhibition d'hémagglutination par les sucres

#### ➤ Test d'inhibition de l'hémagglutination

Ce test est réalisé afin de déterminer l'affinité des saccharides vis-à-vis des lectines en étudiant la capacité de ces derniers à inhiber l'hémagglutination des hématies de lapin en présence de lectine. Pour réaliser ce test on a choisi 24 sucres

**Tableau 11 : les sucres utilisés**

Type de sucre	Les noms	Poids moléculaire g/mol
Disaccharide	Maltose	323.3
	Lactose	342.3
	Cellulose	324.3
	Saccharose	342.3
Monosaccharides	Glucosamine (Hcl)	179.17
	Glucose	180.156
	Galactose	180.156
	Fucose	164.1563
	Inositol	180.16
	Rhamnose	164.14
	Xylitose	150.13
	Fucopyranoside	
	Melibiose	342.2965

	Galactopyranoside	329.73
	Sarbose	180.16
	Manopyranoside	194.18
	Mannose	180.156
	Sucrose	342.3
	Raffinose	504.42
Glycoprotéine	Mucine	
	BSA	66.3KDA
	Ovalbumine	45KDA
	Fetuin	38.2KDA
	Caséine	854.0197
	Inuline	373.7966

Ce test est réalisé comme suit :

Chaque trois puits de la microplaque contiennent un sucre dont le premier puits contient 50  $\mu$ l de solution de saccharides ou de glycoprotéines (0,1g/1ml de NaCl 0,9%) (**Annexe 3**), plus 50  $\mu$ l d'échantillon (fraction dilué 1/128). Le mélange est incubé pendant 30 min dans une température ambiante afin que les lectines reconnaissent les sucres. Enfin, 50  $\mu$ l d'hématies de lapin à 3% sont rajoutés. Les deux dernières lignes sont réservées au témoin négatif (Chaque puits contient 50 $\mu$ l de solution de sucre et 50 $\mu$ l d'hématies à 3%). La lecture est faite après une demi-heure d'incubation dans une température ambiante.

#### ➤ **Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et les glycoprotéines**

Ce test est effectué avec les sucres qui inhibent l'agglutination, il est réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination.

Dans chaque puits de la microplaque, 50 $\mu$ l d'homogénat sont déposés, et c'est uniquement dans les premiers puits relatifs à chaque sucre que sont rajoutés 50 $\mu$ l de chaque inhibiteur (0,1g/ml) (Annexe 02), une gamme de concentrations par doubles dilutions est réalisée dans les puits suivants, le mélange est incubé pendant une heure de temps à température ambiante. Au final 50 $\mu$ l d'hématies à 3% sont ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination est faite à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

## **4. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium**

Le tableau ci-dessous donne les quantités de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
								0	31	62	95	129	164	201	239	279
									0	31	63	97	132	168	205	244
										0	32	65	99	134	171	209
											0	32	66	101	137	174
												0	33	67	103	139
													0	34	68	105
														0	34	70
															0	35
																0

Tableau 12 : la table monogramme de Cooper.

- Nous avons opté pour opérer à notre extrait les précipitations relatives à 20 %, 50% et 75% de saturation en sulfate d'ammonium et vérifier à chaque palier de saturation la présence ou l'absence de lectines dans les différents culots.

A chaque pallier de précipitation par le sulfate d'ammonium (0→20%, 20→50%, 50→75%) ; la quantité du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> qu'il faudra ajouter est calculée à l'avance en se référant sur la table monogramme de Cooper. Après avoir mis la quantité nécessaire notre mélange est soumis à une agitation à froid avec un agitateur électrique pendant 15 à 20min. Après la précipitation, le mélange est soumis à une centrifugation à 4000tr/min pendant 45min.

On récupère le culot de chaque précipitation, on le dissout avec 4ml du tampon PBS ensuite on réalise un test d'agglutination et on les conserve à 4c° jusqu'à une nouvelle utilisation.

### ➤ Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium :

On ajoute 50µl du tampon PBS puis 50µl de l'extrait précipité (culot20%-culot 50%-culot 75%-surnageant 75%) dans le 1er puits ; puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits qui suivent. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de l'activité agglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

Les 12 autres puits sont réservés au témoin négatif (tampon PBS à différents PH de 1 à 12 en présence d'hématies de lapin. La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante

## 5. Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire

Nous avons réalisé ce dessalage du culot présentant une activité hémagglutinante correspondant à la saturation en sulfate d'ammonium 50% sur un gel séphadex G 25.

- **Préparation de la colonne g25 (tableau 13)**

<b>Le principe</b>	La filtration sur gel est une technique de fractionnement des extraits qui repose sur la séparation selon la masse moléculaire. Ainsi, les substances de masses élevées sont les premières à être recueillies
<b>Description</b>	La colonne utilisée à une hauteur de 30 cm avec un diamètre de 1.5cm d'où un volume de 210 ml environ.
<b>Remplissage</b>	La colonne a été remplie de gel Séphadex G25, qui a été lavé avec un tampon phosphate (PBS) pendant 24h
<b>Passage de l'échantillon</b>	Les 5ml d'extrait sont déposés dans la colonne à travers une pompe réglée à 2ml/6min avec un débit de 0.33ml/min.

- **Intervalle de fractionnement du gel séphadex G25 (tableau 14)**

Type de gel séphadex	Domaine de fractionnement(Da)	Application
G-25	1000-5000	Dessalage de protéines et acide nucléique

La séparation a permis d'isoler 56 fractions dont chaque fraction contienne 2ml.

Une fois l'opération de dessalage terminée, toutes les fractions recueillies feront l'objet d'un dosage des protéines à 280 nm et à 260 nm pour les acides nucléiques. Un profil d'élution sera ainsi réalisé pour visualiser la présence des protéines présentes. Seules les fractions présentant une concentration protéique feront l'objet d'un test d'hémagglutination.

➤ **Test d'hémagglutination après dessalage**

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les tubes choisis (fraction).

Chaque 3 puits de la microplaque contient 50 µl de chaque fraction + 50 µl de tampon PBS est enfin 50 µl d'hématies sont ajoutés. 3 puits de la microplaque ont été réservés pour le témoin négatif (50 µl tampon + 50 µl hématies)

La lecture des résultats a été effectuée après une heure d'incubation à température ambiante

Les fractions qui révèlent la présence de lectines seront concentrées (le tube concentrateur est de version de 2ml avec une surface de membrane 1.5cm<sup>2</sup> volume mort < 20 µl) puis soumis à une centrifugation de 12000 tours/20min, puis lyophilisées (pression= 0.115, température= -54C°)

## 6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Afin d'analyser la pureté des fractions ayant montré une forte agglutination, déterminer les fractions contenant la protéine d'intérêt et estimer la masse moléculaire de nos protéines, une électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE (sigle anglophone de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) est réalisée, ce concept permet d'analyser les protéines et les séparer en fonction de la masse moléculaire de la chaîne peptidique, C'est une technique dénaturante qui dissocie les complexes protéiques non-covalents.

A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique, cette propriété leur confère la possibilité de migrer sous l'influence d'un champ électrique (certaines migrent vers l'anode, d'autres vers la cathode), dans cette technique, les protéines sont d'abord incubées avec un agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoethanol qui rompt les liaisons disulfures, et aussi avec le SDS qui est un détergent fort et qui, via sa longue chaîne hydrocarbonée forme des interactions hydrophobes avec les chaînes peptidiques des protéines de telle sorte à leur procurer une charge nette négative, dès lors elles migrent toutes dans la même direction à travers le gel de polyacrylamide et ne sont séparées qu'en fonction de leurs masses moléculaires.

On utilise deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation suivant la taille, précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation), moins dense permettant au préalable de con

centrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées. **(Annexe 3)**

Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 50 $\mu$ l par puits, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8).

Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie.

La décoloration avec l'eau de robinet est faite le lendemain. **(Annexe 4 ; Annexe 5 ; Annexe 6)**

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa. Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électrophorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad (Précision plus, protein unstained, Biorad).

## 7. Etude des propriétés anti-inflammatoires du champignon chez les rats

Nous avons utilisé la technique **(Agbnon et al, 2001)** modifiée.

Le matériel végétal est constitué par le champignon « *Polyporus sulphureus* »

Les rats Wistar adultes (100 à 120 grammes) sont utilisés pour les tests anti-inflammatoires. Pour cet intervalle de poids le volume du pied des animaux est de 1 ml. Ils ont une

alimentation composée de maïs (48%), blé (24%), poisson (22%), huile d'arachide (5%) et un supplément de sels minéraux et de vitamines.

Nous avons utilisé le dispositif de **(Bhatt et al.1977)** modifié pour évaluer le volume du pied des rats.

### ➤ Induction et détermination du volume de l'œdème

L'œdème est provoqué par l'injection dans l'aponévrose de la plante du pied de 0,1ml de formaldéhyde à 2% **(Sen et Nag, 1991)**. Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0 ; 30 ; 60 ; 120 et 180 minutes après l'injection du formaldéhyde. Trente minutes avant l'injection du formaldéhyde, les rats à traiter ont reçu par voie intra péritonéale l'extrait brut de champignon *polypore soufré* Le tampon (PBS) est utilisé comme produit de référence à la dose de 1ml.

Dans un autre lot les rats ont reçu le formaldéhyde ; trente minute après l'injection du Diclofénac avec une concentration de (10 mg /2 ml tampon PBS), les mesures d'inflammation sont effectuées à 30 ; 60 ; 90 minutes.

Le volume du pied est déterminé par immersion qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Nous ramenons le niveau de l'eau à sa position initiale dans la grande seringue à l'aide des deux petites seringues. Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée est directement lu sur les petites seringues.



Le volume de l'œdème  $V_T$  à un temps  $t$  donné est :

$$V_T = V_t - V_0$$

- $V_0$  : le volume initial du pied,
- $V_t$  : le volume du pied au temps  $t$ .

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est selon **(Szekely et al.1997)** :

$$- \% \text{ d'inhibition} = 100 (V_{Tf} - V_{Tp}) / V_{Tf}$$

- VTf : le volume de l'œdème chez les rats ayant reçu uniquement le formaldéhyde,

- VTp : le volume de l'œdème chez les rats traités avec l'extrait.

Le nombre de rats utilisé pour chaque dose est de 5(cinq).

- **Injection de nos échantillons ont été comme suit**

PBS, molécule, Diclofénac	Forme aldéhyde
	
Injection intra péritonéale	Injection sous cutanée

- **Composition des lots (tableau15)**

			Dose injectée
Lot 1	Témoin	Tampon PBS	1ml
Lot2	Contrôle +	Forme aldéhyde	80 µl
Lot3	Contrôle -	Diclofénac +forme aldéhyde	84.8 + 80 µl
Lot 4	Traité	Molécule + forme aldéhyde	83.12+80µl

- **Méthode d'injection**

Lot 1 : injection du PBS une seule fois.

Lot 2 : injection du forme aldéhyde une seule fois.

Lot 3 : injection du Diclofénac → après une demi-heure injection de la forme aldéhyde.

Lot 4 : injection de la molécule → après une demi-heure injection de la forme aldéhyde.

## V. Résultats et discussion

### 1. Dosage des protéines

L'absorbance est mesurée pour les quatre surnageant aux longueurs d'onde  $\lambda = 280\text{nm}$  pour les protéines et  $\lambda = 260\text{nm}$  pour les acides nucléiques qui pourraient éventuellement contaminer nos solutions, le calcul des concentrations est donc fait selon la méthode de Warburg et Christian avec l'équation ci-dessous, et sont représentés dans le tableau 11.

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

Tableau 16 : résultats du dosage des protéines

	280nm	260nm	Concentration (mg/ml)
<b>S1</b>	0.585 <b>F=1/100</b>	0.783 <b>F=1/100</b>	0.3116
<b>S2</b>	0.533 <b>F=1/100</b>	0.791 <b>F=1/100</b>	0.279
<b>S3</b>	0.436 <b>F=1/100</b>	0.680 <b>F=1/100</b>	0.159
<b>S4</b>	0.381 <b>F=1/100</b>	0.587 <b>F=1/100</b>	0.144

S1 : surnageant 1

S2 : surnageant 2

S3 : surnageant 3

S4 : surnageant 4

F : facteur de dilution

D'après le tableau : les 4 surnageant présentent des concentrations en protéines importantes, plus élevées pour les S1 et S2 que S3 et S4. La suite des opérations nous impose de retenir les quatre surnageant qui feront l'objet chacun d'un test d'hémagglutination.

## 2. Tests d'hémagglutination

### ➤ Test d'hémagglutination réalisé après fractionnement des protéines

Les quatre surnageant obtenus ont été soumis au test et ont donné les résultats ci-dessous

**Tableau17 : résultats du test d'hémagglutination des quatre surnageant**

	S1	S2	S3	S4	T-		
	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>							
<b>Lecture</b>	+++	+++	+++	+++	-	-	-

(+++) : Très forte agglutination

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Pas d'agglutination

La lettre A marque le début de la microplaque de titration

**S1** : surnageant 1

**S2** : surnageant 2

**S3** : surnageant 3

**S4** : surnageant 4

**T-** : témoin négatif

Ces résultats montrent que les quatre surnageant ont provoqué une forte activité hémagglutinante vis-à-vis les hématies du lapin. C'est pour cette raison là qu'on a pris l'initiative de mélanger les quatre surnageant afin d'enrichir notre homogénat qui servira pour la suite des opérations.

En absence de lectines (témoin négatif), les cellules roulent au fond du puits où elles s'accumulent en un bouton rouge dense donc l'hémagglutination est négative.

➤ **Dosage de l'homogénat**

**Tableau 18 : résultats du dosage des protéines de l'homogénat**

	Absorbance		Concentration (mg/ml)
	260nm	280nm	
<b>Homogénat</b>	0.570	0.710	<b>0.343</b>

Homogénat = S1 + S2 + S3 + S4

➤ **Test de la limite d'hémagglutination**

Dans ce test, Pour une concentration de départ définie, l'unité d'hémagglutination (UH) est définie comme étant le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observé. La limite d'hémagglutination est exprimé en fonction du rapport de la dilution pour le quelle on observe une hémagglutination.

**Tableau 19 : Résultats du test de la limite d'hémagglutination**

Dilution	½	¼	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/80192
Homogénat												
Lecture	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
Témoin-												
Lecture	-	-	-									

(+++): Très forte agglutination

(++): Forte agglutination

(+): faible agglutination

(-): absence d'agglutination

Nos résultats montrent que l'activité hémagglutinante d'homogénat a été très forte à partir du 1<sup>er</sup> jusqu'au 6<sup>ème</sup> puits ; avec des concentrations de 171.5µg/ml, 85.7µg/ml, 42.87µg/ml, 21.43µg/ml, 10.71µg/ml, 5.35µg/ml. Elle diminue un peu au niveau du 7<sup>ème</sup> puits, 8<sup>ème</sup> puits avec respectivement des concentrations de 2.67 µg /ml, 1.33µg/ml. Elle diminue encore plus

au niveau du 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> puits avec des concentrations de 0.66µg/ml et 0.33µg/ml. Cependant l'activité hémagglutinante des lectines de l'homogénat disparaît au niveau du 11<sup>ème</sup> puits avec une unité hémagglutinante (UH) de 0.165µg/ml.

Les résultats expliquent que ces protéines ont la capacité d'hémagglutination assez importantes puisqu'elles peuvent provoquer une hémagglutination des érythrocytes de lapin jusqu'à 0.33µg/ml.

Ces résultats sont presque identiques à ceux obtenus avec les lectines contenues dans le champignon « *Térfezia Boudiéri* » appelé truffe blanche (champignon du Sahara algérien), ces dernières ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes à partir de 3.5µg/ml (TrFBL1) (Zitouni et al, 2014).

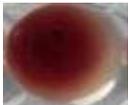
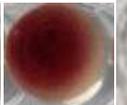
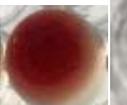
Tableau 20 : dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm et 260nm

Dilution	[Homogénat] (mg/ml)	Dilution	[Homogénat] (mg/ml)
2	0.171	128	0.026
4	0.085	256	0.0013
8	0.042	512	0.00066
16	0.021	1024	0.00033
32	0.010	2048	0.00016
64	0.0053	4096	0.000083

### ➤ Test de l'effet de température sur l'hémagglutination

L'homogénat est incubé à 5 degrés différents de température, un test d'hémagglutination est ensuite effectué afin de voir jusqu'à quel degré de température les lectines présentes dans l'homogénat peuvent-elles résister.

Tableau 21 : résultat du test de l'effet de température sur l'hémagglutination

T	Homogénat									Témoin			Lecture
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
40													++
60													+++
80													+

90			-
100			-

(+++): Très forte agglutination

(++): Forte agglutination

(+): Faible agglutination

(-): Absence d'agglutination

Ces résultats montrent que notre homogénat contient des lectines qui peuvent résister à des degrés élevés de température allez jusqu'à 80c°. On observe une forte agglutination à 40c° et une très forte agglutination a 60c°, puis une diminution a 80c°. A 90c° et 100c° l'agglutination est totalement absente ce qui explique que les lectines sont complètement dénaturé lors de ces incubations ; ceci n'inclut pas le fait que les lectines sont des molécules thermorésistantes.

### ➤ Test de l'effet de la température sur la limite d'hémagglutination

Ce test est réalisé avec l'homogénat incubé a 40 c° 60c° et 80c° (les températures auxquelles les lectines ont résisté) Tableau : résultat du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination

**Tableau 22 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination**

Tc°	Homogénat												Lecture	Témoin-
	½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096		
40c°													++	
	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-		
60c°													+++	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-		
80c°													+	
	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- (+++): Très forte hémagglutination
- (++): Forte hémagglutination
- (+): Faible agglutination
- (-): Absence d'agglutination

A 40°C, il y'a une assez forte agglutination dans les quatre premiers puits qui diminue dans le cinquième sixième et septième puits et qui disparaît au niveau du huitième puits (dilution 1/258) correspondant à la concentration 1.32 µg/ml.

A 60°C, il y'a une très forte agglutination dans les six premiers puits, elle se dégrade au niveau du septième et huitième puits, puis elle devient faible dans le 9<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> puits et qui disparaissent complètement dans le 12<sup>ème</sup> puits (dilution 1/4096) correspondant à une concentration de 0.08 µg/ml.

A 80°C, il y'a une très forte agglutination dans les trois premiers puits, mais elle diminue au niveau du 4<sup>ème</sup> puits et disparaît complètement dans le 5<sup>ème</sup> puits (dilution 1/32) correspondant à une concentration de 10.71 µg/ml.

Le traitement thermique de l'extrait brute de champignon *polypore soufré* a différents températures 40°C, 60°C, 80°C pendant 45min n'est pas suffisant pour dénaturé totalement notre protéines (l'activité hémagglutinante). Ces résultats indiquent que nos hémagglutinines sont très résistantes à la température « thermorésistant », elles n'ont pas pour autant gardé l'intégralité de leur pouvoir hémagglutinant, il se peut que les lectines ont été dénaturé mais pas totalement, il y'aurait probablement eu un réarrangement moléculaire en vue de gardé l'intégrité du site de reconnaissance spécifique des sucres.

Les lectines présentes dans notre champignon « *polypore soufré* » sont moins résistantes que les lectines du champignon « *Ganoderma capense* », ces dernières ont une thermostabilité spectaculaire, leur activité hémagglutinante n'est pas affectée même après incubation à 100 °C pendant 60min (Patrick H.K Ngai, 2004).

### ➤ Test de l'effet du pH sur l'hémagglutination

Les résultats sont représentés dans le tableau...

**Tableau 23 : résultats du test de l'effet du PH sur l'hémagglutination**

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>Lecture</b>	-	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+
<b>T-</b>												

**A** : poudre de champignon dilué dans des tampons à différents pH de 1 à 12 plus hématies à 3%

T : Témoin négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence agglutination

Le tableau montre une absence totale d'activité hémagglutinante dans les puits correspondant aux pH acide 1 ; 2 et 3. L'activité apparait à partir du 4<sup>ème</sup> puits à pH=4 jusqu'au 9<sup>ème</sup> puits pH=9. Elle diminue au niveau des puits suivants (pH=10 ; 11,12).

D'après les résultats obtenus on estime que notre champignon n'a aucune activité hémagglutinante dans les milieux très acide et que cette dernière diminue dans les milieux très basiques, mais elle est forte dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 9.

On déduit que la structure des lectines peut être affectée par le changement de pH.

### ➤ Test de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination

Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 24 : résultat du teste de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination**

Ph	½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	Témoin
4													
Lecture	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- - -
5													
Lecture	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	- - -
6													
Lecture	+++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	- - -
7													
Lecture	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	- - -
8													
Lecture	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	- - -

9																	
Lecture	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10																	
Lecture	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11																	
Lecture	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12																	
Lecture	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T : témoin négatif

(+++) : Très forte hémagglutination

(++) : Forte hémagglutination

(+) : Faible hémagglutination

(-) : Absence d'hémagglutination

A pH=4, l'activité hémagglutinante est faible elle commence à disparaître à partir du 4<sup>ème</sup> puits (dilution 1/16) avec une concentration de 21.43 µg/ml ; pareil pour pH=5 ou l'hémagglutination disparaît au 5<sup>ème</sup> puits (dilution 1/64) correspond à 5.35 µg/ml.

A partir du pH=6 l'activité hémagglutinante augmente et disparaît au 9<sup>ème</sup> puits (dilution 1/512) avec une concentration de 0.66 µg/ml.

A pH [7 ; 8] l'activité est exponentielle ; elle atteint ses limites avec respectivement les concentrations suivantes : 0.33 µg/ml ; 0.008 µg/ml cette dernière est à son sommet à pH=8 puis elle commence à diminuer progressivement de pH=9 jusqu'à pH=12.

Ces résultats expliquent clairement que notre lectine a un pHi basique se rapprochant de 8.

Les résultats obtenus sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines du champignon «*Ganoderma capense*», l'activité hémagglutinante de ces lectines est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11. (Patrick H.K Ngai, 2004)

➤ **Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines**

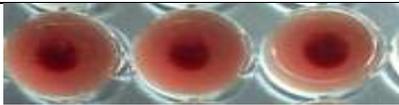
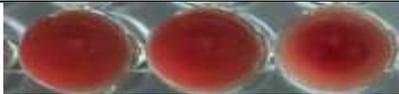
• **Test de la limite d'hémagglutination**

Après avoir observé les résultats de la limite d'hémagglutination le facteur de dilution est de 1/128.

➤ **Test d'inhibition**

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau.

**Tableau 25 : Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines**

Sucre	Résultat	Lecture
Lactose		+++
Cellulose		-
Maltose		-
Saccharose		-
Fetuin		+++
Inuline		-
BSA		-
Museum		+++
Ovalbumine		+++
Caséine		+++
Sarbose		-
Manopyranoside		-

Raffinose		-
Inositol		+++
Sucrose		-
Xylitol		-
Fucopyronoside		-
Galactose		-
Galactopyrosamide		-
Ficose		-
Glucosamine		-
Mannose		-
Glucose		-
Rhamose		-
<b>Témoin -</b>		

Les résultats montrent que la cellulose, le Maltose, Saccharose, Inuline, BSA, Sarbose, Manopyranoside, Raffinose, Sucrose, Xylitol, Fucopyronoside, Galactose, Galactopyrosamide, Ficose, Glucosamine, mannose, Glucose, Rhamose et le Galactose n'ont pas influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines provenant du champignon *polypore soufré*. Ceci veut dire que ces dernières n'ont aucune affinité pour ces saccharides, par contre le lactose, fétuin, muséum, ovalbumine, caséine, et l'inositol ont inhibé l'agglutination des hématies. Ceci veut dire que ces derniers se sont attachés aux lectines puis ont occupé les sites actifs (domaines de reconnaissance) censés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, donc ces lectines présentent une affinité pour ces six derniers sucres.

➤ **Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine**

Afin de déterminer la concentration minimale à laquelle l'inhibition de l'agglutination n'est plus observée et de déduire par cela avec quel sucre nos lectines présentent une plus grande affinité, un test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides (lactose, inositol) et les glycoprotéines (caséine, fetuin, ovalbumine, muséum) est réalisé, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau

**Tableau 26 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine**

Sucre		½	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Lactose	H												
	T-												
Lecture		-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
Inositol	H												
	T-												
Lecture		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Caséine	H												
	T-												
Lecture		-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fetuin	H												
	T-												

<b>Lecture</b>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>Ovalbumine</b>	H												
	T-												
<b>Lecture</b>		-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++
<b>Mucine</b>	H												
	T-												
<b>Lecture</b>		-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

H : Homogénat

T- : Témoin négatif

Dans le cas du lactose, l'agglutination apparaît au niveau du 7<sup>ème</sup> puits (dilution 1/128) là où la concentration du sucre est égale à 0.053mg/ml et s'accroît dans les cinq puits restants. Donc ce sucre a une affinité moyenne avec les lectines de notre champignon.

Concernant l'inositol, on remarque une forte agglutination toute au long des douze puits. On dit que ce sucre n'a donc pas une affinité avec ces lectines.

C'est presque le même pour la caséine, où l'agglutination apparaît dès le 2<sup>ème</sup> puits là où la concentration du sucre est 8.54mg/ml. Donc la caséine n'a pas presque une affinité avec les lectines de champignon *polypore soufré*.

Pour la fetuin, l'agglutination a lieu dans le 10<sup>ème</sup> puits (dilution 1/1024) avec une concentration du sucre égale à 0.042mg/ml. Ceci indique que nos lectines ont une très forte affinité avec la fetuin.

Ce n'est pas le cas pour des résultats obtenus à partir de lectines extraites de l'espèce « *Morus nigra* », ces dernières ont une moindre affinité avec les sucres des surfaces cellulaires des érythrocytes par rapport à la glycoprotéine « la fetuin » (Necib et al. 2015)

Concernant l'ovalbumine et mucine, l'agglutination apparait respectivement au niveau du 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> puits avec ces concentrations de 0.48mg/ml et 0.30mg/ml. Donc on estime que ces deux sucres présentes une certaine affinité pour nos lectines.

Sur ce, parmi les six sucres utilisés, les lectines présentent une affinité pour seulement cinq d'entre eux, ceci dit, le degré d'affinité pour chacun d'entre eux est différent, **nos lectines sont donc spécifiques pour la fetuin car c'est celui avec laquelle elles présentent une plus forte affinité.**

Ceci n'est pas le cas des deux lectines Discl et Discll, extraites à partir de l'espèce « *Dictyostelium discoideum* » dont Les tests d'inhibition d'hémagglutination ont été fait en présence d'un ligand mono-saccharidique. Discl a une affinité plus forte pour le GalNAc que pour le galactose. La Discll présente presque la même affinité pour les deux sucres testés. **(Karoline S.A, 2008)**

Entre autres, la lectine TrFBL1 extraite de la truffe blanche du Sahara algérien « *Térfèzia Boudiéri* » semble avoir une spécificité envers essentiellement le Fucose qui s'est lié sur son site actif ou encore appelé « domaine de reconnaissance des glucides », et qui l'a empêché de provoquer une hémagglutination des érythrocytes jusqu'à une concentration équivalente à 0,39 mMolaire. **(Zitouni et al., 2014).**

### **3. La Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium**

Quatre fractions sont obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium. Culot 20% ; culot 50% ; culot 75% ; surnageant 75%.

On passe ces quatre fractions au test d'hémagglutination afin de pouvoir identifier la fraction qui donne une très forte agglutination.

#### **➤ Test de la limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium**

**Tableau 27 : Agglutination des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium**

Fraction	%de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Activité hémagglutinante	Lecture
culot 1	25%		+
culot 2	50%		+++
culot 3	75%		++
S1	75%		-

(+++): Forte Agglutination

(+): faible Agglutination

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : sulfate d'ammonium

De 25%(culot) de saturation de sulfate d'ammonium, l'activité hémagglutinante est très faible

De 50%(culot) de très forte agglutination est obtenue.

De 75%(culot) l'activité hémagglutinante est faible.

De 75%(surnageant) une disparition d'hémagglutination.

#### 4. Dessalage par chromatographie d'exclusion moléculaire

Cette chromatographie nous a permis de purifier notre homogénat et d'en extraire 56 fractions. On effectue un dosage de ces fractions à 280nm les résultats obtenus sont notés dans le tableau suivant

**Tableau 28 : résultats du dosage des 56 fractions obtenues après purification des protéines (annexe 7)**

F	V	A	F	V	A	F	V	A	F	V	A
1	2	0.051	15	30	0.002	29	58	0.331	43	88	0.049
2	4	0.091	16	32	0.679	30	60	0.199	44	90	0.003
3	6	0.685	17	34	0.339	31	62	0.157	45	92	0.003
4	8	0.677	18	36	0.303	32	64	0.127	46	94	0.016

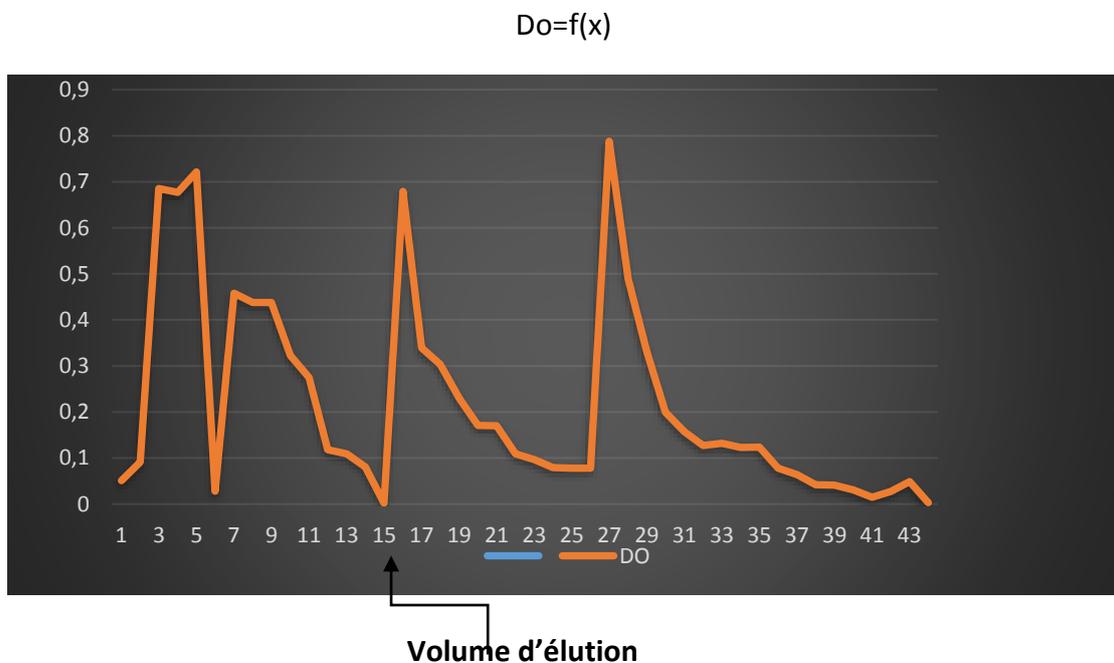
5	10	0.721	19	38	0.230	33	68	0.132	47	96	0.045
6	12	0.028	20	40	0.171	34	70	0.123	48	98	0.011
7	14	0.458	21	42	0.170	35	72	0.124	49	100	0.011
8	16	0.438	22	44	0.109	36	74	0.078	50	102	0.020
9	18	0.438	23	46	0.097	37	76	0.064	51	104	0.020
10	20	0.323	24	48	0.079	38	78	0.042	52	106	0.007
11	22	0.275	25	50	0.078	39	80	0.041	53	108	0.007
12	24	0.118	26	52	0.078	40	82	0.031	54	110	0.026
13	26	0.109	27	54	0.788	41	84	0.015	55	112	0.033
14	28	0.081	28	56	0.489	42	86	0.027	56	114	0.023

F : fraction

V : volume

A : absorbance

On a tracé la courbe représentant le profil d'élution : absorbance 280nm en fonction du numéro de fraction



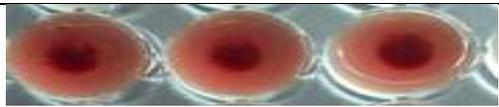
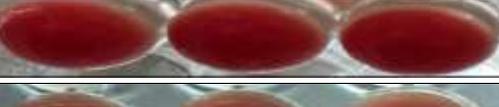
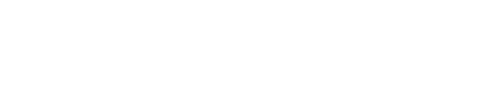
**Figure 15 : courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance à 280nm en fonction du volume d'élution des fractions protéiques.**

D'après la courbe on remarque qu'on a plusieurs pics majeurs ; suivant ces piques on a choisis les tubes qui doivent subir le test d'hémagglutination

**Les tubes : 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 17, 27, 28, 29**

➤ **Test d'hémagglutination après dessalage**

**Tableau 29 : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les 56 fractions obtenues après purification des protéines.**

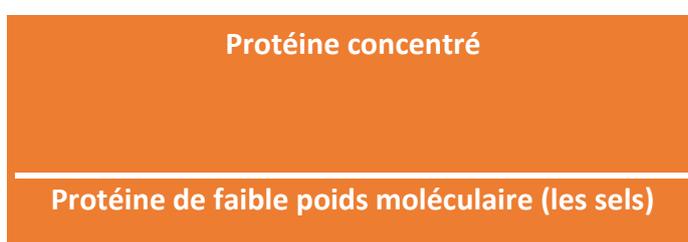
Tube	Résultat	Lecture
3		-
4		-
5		-
6		+++
7		-
8		-
9		-
16		-
17		+++
27		+++
28		+++
29		+++



En effet les fractions 6, 17, 27, 28 et 29 contiennent bien nos lectines, elles feront donc l'objet d'un test de pureté lors de l'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide mais avant cette étape on doit concentrer et lyophiliser notre mélange des cinq tubes.

- **La concentration des protéines**

Après avoir mélangé les cinq fractions obtenues on les centrifuge puis on récupère le tube concentrateur et on remarque qu'il Ya 2 phases :



Les protéines de faible poids moléculaire sont au fond du tube et ils sont jetés par la suite. Les protéines concentrées sont soumises à une lecture au spectrophotomètre à des longueurs d'onde de 280 nm et 260 nm

**Tableau 30 : résultats du dosage des protéines concentrées**

	Absorbance		Concentration (mg/ml)
	260nm	280nm	
<b>Protéine concentrée</b>	0.142	0.302	<b>0.360</b>

Après cette étape on met notre échantillon dans une boîte de pétrie et on la met dans le congélateur (pour aider l'lyophilisateur).

- **La lyophilisation**

On met la boîte de pétrie dans un lyophilisateur et après 4heures on récupère la poudre d'échantillon qui fera donc l'objet d'un test de pureté lors de l'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

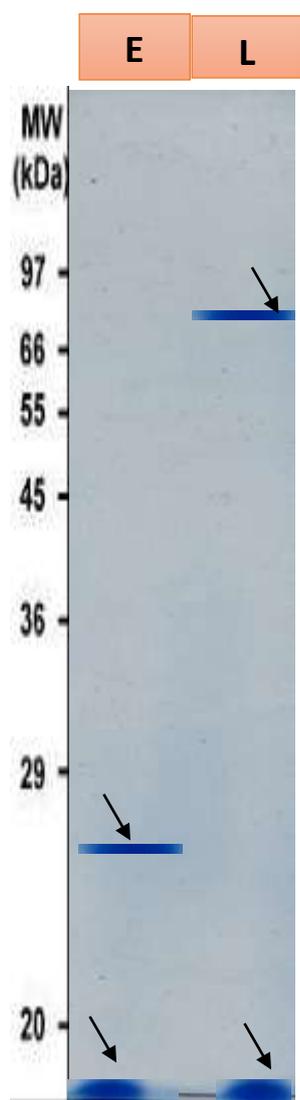
## 5. SDS-PAGE

Les échantillons soumis à l'électrophorèse sont : l'extrait brut et le lyophilisat, leurs concentrations sont reprises dans le tableau 25.

**Tableau 31 : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse**

	Concentration (mg/ml)
Extrait brut	0.385
Lyophilisat	0.360

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide nous a donné le profil électrophorétique suivant :



**Figure17 : profil électro phorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes**

La lecture de cet électro-phorégramme a pour but de relever la mobilité des bandes qui sont apparues en estimant les distances parcourues par chacune d'elles dans le gel de séparation, ceci permet d'évaluer la pureté et la masse moléculaire de chaque protéine en comparant avec la migration électro phorétique et la masse moléculaire d'un standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire connu (Précision Plus, protéine non colorée, Biorad).

Les échantillons : extrait brute et lyophilisat présentent chacun deux (2) sous-unités se situant respectivement dans des zones dont le poids moléculaire est proche de 8 KDa, 25 KDa (pour l'extrait brute), et de 8 KDa, 80 KDa (pour lyophilisat).

D'autres auteurs rapportent que les poids moléculaires des lectines fongiques sont d'une grande variabilité, ils se situent généralement entre 15KDa et 90KDa mais la majorité se situe entre 23KDa et 36KDa avec une à six sous-unités (**Feroz khan, 2001**). Quatre sous-unités furent trouvées chez la lectine de « *Pleurocybella porrigens* » (**Suzuki et al, 2009**) et la lectine extraite de « *Agaricus Blazei* » (**Kawagishi et al, 1988**).

## 6. Etude des propriétés anti-inflammatoire du champignon chez les rats

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire et par conséquent le volume de l'œdème sont représentés sous forme de moyennes et variance. Le traitement statistique ainsi que les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Toutes les données étaient normalement distribuées. Des comparaisons multiples entre les groupes ont été exécutées par des mesures répétées ANOVA.

Le tableau suivant résume l'ensemble de nos données :

**Tableau 32 : Résultats d'étude des propriétés anti-inflammatoire du champignon chez les rats**

		Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée en ml				
Lot	Temps	Rats				
		1	2	3	4	5
Témoin	0 min	1	1	1	1	1
Forme aldéhyde	30 min	2.5	2.6	2.5	2.6	2.5
	60min	3	2.8	2.7	2.4	2.5
	90min	3	3.1	3	3	2.6
Diclofénac + forme aldéhyde	30min	2.5	2.7	2.1	2	2.1
	60 min	2.3	2.3	2.2	2.3	2.1
	90 min	2.1	2.4	2	1.9	2.4
Molécule + forme	0min	1	1	1	1	1
	30min	1.5	1.6	1.4	1.5	1.6

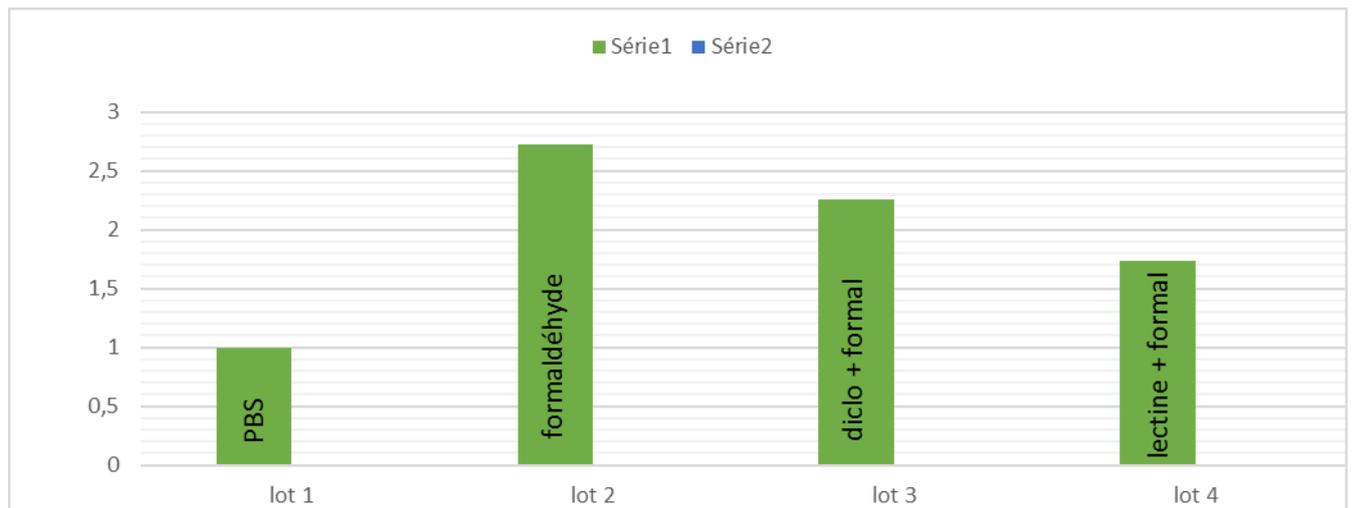
aldéhyde	60 min	2	2.2	1.9	2	2.1
	120min	2	2	1.6	1.9	2.1
	180min	1.7	1.9	1.6	1.1	1.2

➤ **Etude statistique (test anova) (tableau 33)**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre</i>			<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
	<i>d'échantillons</i>	<i>Somme</i>			
Ligne 1		5	5	1	0
Ligne 2		5	12,7	2,54	0,003
Ligne 3		5	13,4	2,68	0,057
Ligne 4		5	14,7	2,94	0,038
Ligne 5		5	11,4	2,28	0,092
Ligne 6		5	11,2	2,24	0,008
Ligne 7		5	10,8	2,16	0,053
Ligne 8		5	5	1	0
Ligne 9		5	7,6	1,52	0,007
Ligne 10		5	10,2	2,04	0,013
Ligne 11		5	9,6	1,92	0,037
Ligne 12		5	7,5	1,5	0,115

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Source de variation en groupe	21.4245	11	1.94768182	55.2533549	2,0278E-23	1.99458001
A l'intérieur des groupes	1.692	48	0.03525			
Total	23.1165	59				



**Figure 17 : effet anti inflammatoire d'un extrait de lectine après injection de formaldéhyde chez les rats**

Le volume de l'œdème (l'état inflammatoire) induit par le formaldéhyde augmente avec le temps. Après 90 minutes il est de 2.94 ml Cette valeur correspond à un pourcentage d'augmentation de 54,44% par rapport au volume initial du pied.

Pour le lot du Diclofénac + formaldéhyde, le volume de l'œdème augmente également proportionnellement avec le temps. Il est de 2,16ml après, avec 90 minutes avec un pourcentage d'augmentation de 45.2% par rapport au volume initial, et de 1.5 ml après 180 minutes avec un pourcentage de 34.8%

En comparant ces résultats avec ceux du lot témoin qui donne un volume de 1ml avec un pourcentage de 20%, on remarque clairement que l'injection du formaldéhyde seul provoque une très grande inflammation par rapport au lot négatif qui n'induit l'inflammation que de 10% grâce au Diclofénac (qui a été utilisé comme un anti inflammatoire).

Quant au lot traité par l'extrait +le formaldéhyde, on remarque qu'il a induit l'inflammation avec le temps de 20% par rapport au lot témoin. L'analyse de l'histogramme issue montre clairement l'influence engendrée par notre extrait de lectines.

On peut conclure aisément au vu des résultats obtenus que notre extrait (champignon) à réduit considérablement le volume de l'œdème. Avec beaucoup de réserves, et pour éviter toutes ambiguïtés, nous estimons qu'il va falloir procéder à d'autres types d'analyses pour pouvoir affirmer que nos lectines puissent avoir réellement un pouvoir anti –inflammatoire certain et comparable sinon mieux que celui du Diclofénac.

Notre champignon, comme tant d'autres pourrait donc être considéré comme un protecteur ayant un pouvoir anti- inflammatoire intervenant dans le métabolisme de différents organismes contre toutes formes d'agressions.

## VI. Conclusions générales

Les lectines occupent désormais une place prépondérante dans le monde de la biologie, notamment l'immunologie, la biologie cellulaire et moléculaire, ces glycoprotéines ont des propriétés diverses qui doivent être pleinement exploitées.

Dans le cadre des travaux de recherche effectués, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des lectines extraites à partir du champignon « *polypore soufré* ».

En réalisant différents tests d'hémagglutination, nous avons déduit que les lectines de champignon « *polypore soufré* » avaient la capacité d'agglutiner les érythrocytes, c'est à partir de là que nous avons poussé nos recherches en effectuant plusieurs autres tests biologiques.

Nos recherches ont montré que ces lectines pouvaient résister à des seuils élevés de température, leur thermo-stabilité s'étend jusqu'à 80°C.

L'effet du pH sur l'hémagglutination des érythrocytes de lapin en présence de lectines extraites de champignon « *polypore soufré* » les résultats obtenus montrent que le pH optimal est proche de 8.

De plus, nous avons démontré que ces lectines avaient une affinité avec des saccharides dont le lactose ; Fétuin ; mucine ; ovalbumine. Ces derniers peuvent adhérer au site de reconnaissance des lectines, sur ce, elles semblent avoir une spécificité envers essentiellement la Fétuin.

Dans le but d'éliminer les impuretés afin d'améliorer l'activité hémagglutinante de l'extrait brut, nous avons procédé au dessalage par chromatographie sur colonne d'exclusion moléculaire et par précipitation au sulfate d'ammonium : La filtration sur gel a donné 5 (cinq) fractions à fortes agglutinations tandis que la précipitation au sulfate d'ammonium est de 50% de saturation.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a permis d'estimer la pureté de notre lectine, les deux échantillons : extrait brute et lyophilisat présentent chacun deux (2) sous-unités se situant respectivement dans des zones dont le poids moléculaire est proche de 8 KDa, 25 KDa (pour l'extrait brut), et de 8 KDa, 80 KDa (pour lyophilisat).

Après les tests anti-inflammatoires on peut conclure aisément au vu des résultats obtenus que notre extrait (champignon) a réduit considérablement le volume de l'œdème. Avec beaucoup de réserves, et pour éviter toutes ambiguïtés, nous estimons qu'il va falloir procéder à d'autres types d'analyses pour pouvoir affirmer que nos lectines puissent avoir réellement un pouvoir anti-inflammatoire certain et comparable sinon mieux que celui du Diclofénac.

### ➤ Perspectives

Les travaux que nous avons effectués sont une initiation à de nombreuses autres perspectives, la poursuite des recherches sur ces lectines impliquerait au préalable l'utilisation de plusieurs autres techniques d'analyse biochimique et méthodes permettant de fournir une très bonne caractérisation et purification de ces protéines. Il serait possible d'utiliser le lactose ou la fétuin comme ligand dans la matrice d'affinité pour la purification de nos lectines. D'autre part, une électrophorèse en conditions non dénaturantes pourrait être réalisée afin de confirmer les résultats obtenus en conditions dénaturantes.

Ce travail mériterait également d'être étoffé par une étude cristallographique en vue de déterminer les structures en 3D des lectines et ainsi les comparer avec d'autres structures connues.

Les résultats de ces recherches pourraient également être suivis par des études sur l'activité antivirale, anticancéreuse et immuno-modulatrice de nos protéines.

Les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

## Références bibliographiques

- ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A.** The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461.
- Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014)** .Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol.*172, 672–686.
- Assreuy AMS. (1997)**. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation* .6, 201-210.
- Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005)**. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol.*(57) , 919-922.
- ATALAH. B. A., DE VLEESSCHAUWER. D., XU. J., FOUQUAERT. E., HÖFTE. M., VAN DAMME. E. J.** Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins towards important abiotic and biotic stresses. *J. Plant Physiol*, 2014. 171: 986–992.
- AGBNON.A., AKLIKOKOU , K ., AKPAGANA , K ., et GBEASSOR , M. etude des propriétés antiinflammatoire de la racine de *PLUCHEA OVALIS* ( PERS.) DC ( ASTERACEAE) chez le rat
- Bevilacqua, M.,** Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L. et al., (1991) Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67, 233.
- Boyd, W.C. and Shapleigh, E (1954).**Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) *Science*, 119,419.
- BABOSA. T.** In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2001**. 95 (5): 673-678.
- Banwell JG.** (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial over growth in the rat. *Gastroenrology*. 84, 506-515.
- Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012)**. Caracterisation structurale et fonctionnelle d'une lectines de type C des cellules de langerhans : la langérine. *Chimie et sciences du vivant*. Université de grenoble. 2012. pp 63-64.
- Delatorre, P., et al. (2006)** Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J Struct Biol*, 154, 280-286.

**Dam TK and Brewer CF. (2002)** . Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. Chem. Rev.102, 387-429.

**Edelman GM, Cunningham BA, Reeke GN, Becker JW, Waxdal MJ and Wang JL. (1972)**. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 2580-2584.

**FLEGG PB, WOOD DA, 1985**. Growth and fruiting. In: Flegg PB, Spencer DM, Wood DA, eds. The biology of the cultivated mushroom. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p141– 177.

**Gianluca Cioci** ; Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Biomolécules. Université Joseph-Fourier -Grenoble I, 2006. French.

**Goldstein,IJ,Hughes.R.C.,Monsigny,M.,Osawa,T.and Sharon,N.** What should be called a lectin? Nature 285 (1980) 66

**GRANT. G.** Lectins. In toxic substances in crop plants.ed.by the royal Society oh Chemistry, 1991. p: 339.

**Guillot, J., Kanska G., 1997** : Lectins in higher fungi. Biochem. System. Ecol., 25, 203- 230.

**Giollant, M., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., and Didier, E. (1993)**  
Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus* - research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. Plant Physiol., 101, 513-522.

**G. Kernaghan, K. A. Harper** Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone, April 2001

**Gomes J. (1994)**. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparaison with concanavalin A. Agent Action. 41, 132-135.

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

**Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980)**. What should be called a lectin? Nature.285, 60.

**Herrmann Stillmark(1888)** Ueber ricin,ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus

**Hardman KD and Ainsworth CF. (1972)**. Structure of concanavalin A at 2.4 A resolution. Biochemistry. 11, 4910-4919.

**HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S.** lectins : proteins with diverse Application. J. Appl. Pharm Sci, 2013. 31:93-103.

**HIBBETT DS, BINDER M, THORN RG, TIBELL L, UNTEREINER WA, WALKER C, WANG Z, WEIR A, WEISS ML, WHITE MM, WINKA K, YAO YJ, ZHANG N, 2007**. A higher- level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. 111: 509- 547.

**Himansha Singh, Sai Pantha Sarathi**, Inside of lectins-A review .International journal of scientific&Engineering Research, Volume3, Issue 4, April-2012. ISSN 2229-5518.

**Hirabayashi, J (2004)** Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan

**IMBERTY. A., MITCHELL. E. P., WIMMEROVÁ. M.** Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **2005**. 15: 525- 534.

**JEYAPRAKASH. A. A., KATIYAR. S., SWAMINATHAN. C. P., SEKAR. K., SUROLIA. A.** Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol*, 2003, 332: 217-228.

**Jain D, Kaur KJ, Salunke DM. (2001).** Plasticity in protein-peptide recognition: crystal Structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys*. 80, 2912- 2921.

**Jaffe WG. (1980).** hemagglutinins (Lectins) . In toxic constituents of plant foodstuffs. New – York. Academic Press. pp 502.

**Karoline S.A., 2008** : Etudes structure-fonction de lectines (Discl et Discll) de Dictyostelium discoideum. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier.4

**Université Grenoble 1- Joseph Fourier. Kokourek, J. and Horejsi, V. (1981).** Definong a lectin .*Nature* ,290,188

**KAWAMURA. T., OGAWA. Y., AOKI. R., SHIMADA. S.** Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Dermatol. Sci*, 2014. 75 : 159–166.

**Kulkarni GV. (1998).** Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell. Research*.245, 170-178.

**Kostlanova, N., Mitchell, E.P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gilboagarber, N., Chambat, G., Wimmerowa, M. and Imberty, A. (2005)** The fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum*: a new type of b-propeller architecture formed by

**Lis, H. and Sharon, N. (1998)** Lectins carbohydrate-specific proteins that mediate cellular Recognition. *Chem. Rev.*, 98, 637-674.

**Lenka s., Imberty A., Jaroslav, k., 2006:** Modelisation moleculaire des lectines et des glycosyltransferases. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph fourier. universite grenoble i – joseph fourier.

**Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. and Wyns, L. (1998)** Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383, 9-36.

**LEE. Y.C., LEE. R. T.** Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res*, 1995. 28: 321-327.

**LEE. J. Y., KIM. J. Y., LEE. Y. G., BYEON. S. E., KIM. B. H., RHEE. M. H., CHO. J. Y.** In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2007. 30(11): 2043-2051.

**LAM. S. K., NG. T. B.** Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, 2010. 17: 457–462.

**Merritt, E.A., and Hol, W.G.J. (1995)** AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 165-171.

**Myoshim. Et Al (1982).** The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. vitaminol*, 28, 255-264.

**Mukherjee S , Zheng H , Derebe M G, Callenberg K M , Partch C L, Rollins D , Propheter D C, Jiang Q X.(2014).** Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*. 505, 103–107.

**Murdock LL, Shade RE .(2002).** Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectectes. *J.Agric. food. Chem.* 50 (22),6605-6611 .

**Ng T.B., 2004:** Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073. Nussenzweig, R. S. (1967) *Exp. Parasit.*, 21, 224

**Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2014).** Immunomodulatory activity of lectin extrated from THE RED MARINE ALGA PTEROCLADIELLA CAPILLACEA .Volume 4. Issue 1, 1693-1706.

**Necib Y, Bahi A, Derri N, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K.(2015).** Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1) , 1707-1719.

**Nachbar MS, Oppenheim JD. (1980).** Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2238 -2345

**Peumans W. J. and Damme E. J. M. V. (1995)** Lectins as plant defense proteins. *PlantPhysiol*. 109, 347-352.

**Pemberton 1994.** Agglutinins from some british higher fungi. *Mycol.Res.*, 98, 277-290

**Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008)** Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 1579-1591.

**Poiroux G. (2011).** Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et biochimie*. Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier. Pp, 35-50.

**Patrick H.K Ngai** *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 314, Issue 4, 20 February 2004, Pages 988–993.

**RUDIGER. H.** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, 1993. Pp: 31-46.

**Rudiger, H., and Gabius., H.J. (2001)** Plant lectins.Occurence,biochemistry,funtions and applications.*Glycoconj .J*,18,589-613

**RENKONEN K. O.** Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki), 1948. 26: 66.

**Renato De A, Moreira. (1991).** Plant lectins, chemical and biological aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Vol. 86. Suppl. II, 211-218.

**REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOVON. S. H .** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. The Journal of Phytopharmacology, 2014. 3(1): 44-51.

**RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G.** Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel*. Biologie Structurale et Nanobiologie. France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, 2011. p: 11.

**SHARON. N., LIS. H.** Legume lectins-A large family of homologous proteins. FASEB J, 1990. 4: 3198-3208. SHARON. N. (1996) Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. Adv. Exp. Med. Biol., 408: 1-8.

**Sharon, N. and Halima, Lis. (2003)** Lectins. Kluwer Academic Publishers

**SHARON. N., LIS. H.** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, 2004. 14: 53-62.

**Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M. and Surolia, A. (2007)** Subunit assembly of plant lectins. Curr Opin Struct Biol, 17, 498-505.

**Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999)** Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. J. Bacteriol., 181, 1059-1071.

**She Q B, NG T B, Liu W K A. (1998).** novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. Biochemical and Biophysical Research Communication. 247, 106-111.

**SZE S C W, Ho J C K, Liu W K. (2004).** *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. J. Cell. Biochem. y. 92, 1193-1202.

**SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUEBARREIRA. M. C.** The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. Glycoconj J, 2013. 30:641-657.

**Suzuki, T., Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi and H. Dohra et al, 2009.** Purification characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens* biosci.

**Topfer-Petersen, E., Romero, E., Varela, P.F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L. and Calvete, J.J. (1998)** Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. Andrologia, 30, 217-224.

**TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A., ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A.** Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. 106: 15633- 15638.

**TANNE. A., NEYROLLES. O.** C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence*, 2010. 1: 285–290.

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

**Wiley,D.C,and Skehel,J.J.(1987).**The structure and function of the hemagglutinin.

**Wu AM, Sugii S, Herp A. (1988).** A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, 819-847.

**WIMER. B. M.** Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm*, 1996. 11: 57-75.

**Wang H, Ng TG. (1998).** Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*. 253, 143-146.

**Weiwei Zhang, Guotin tian, Xueran Geng, Yongchang Zhao, Tzi Bun Ng, Liyan Zhao et Hexiang Wang.** Isolation et caractérisation d'une nouvelle lectine à partir du champignon comestible *Stropharia rugosoannulata* 2014.

**Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao YR, Bi WJ, Zhao XF, Wang JX. (2014).** L-type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 397–405.

**YOUNG. N. M., OOMEN. R. P.** Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 1992, 228, 924–934.

**Yr Li, QH Liu, HX Wang and TB Ng.** Une nouvelle lectine avec de puissantes activités inhibitrices de la transcriptase inverse anti tumorale, mitogène et du VIH-1 à partir de champignon comestible *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochemical and biophysical Acta (BBA)*, 2008 ; V.1780(1) : 51-57.

**Zitouni. A ;** Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de *Terfèzia boudiéri* (Truffe Blanch

## Annexes

### Annexe 1 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1M ; pH = 7,4). Pour 1000ml de PBS

Réactif	Concentration	Quantité
phosphate di-sodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10 mM	1,44g
Phosphate de mon potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 mM	0,24g
Chlorure de Sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de Potassium (KCl)	2,7 mM	0,2g
Eau distillée		1L

### Annexe 2 : Préparation de NaCl à 0.9%

Chlorure de Sodium (NaCl)	0,9g
Eau distillée	100ml

### Annexe 3 : Solutions préparées pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

#### ➤ Solutions mère d'acrylamide à 40%

Acrylamide	40g
Eau distillée	100ml

#### ➤ Solution mère de Bisacrylamide à 2%

Bisacrylamide	2g
Eau distillée	100ml

#### ➤ Solution stock de SDS à 10%

Sodium dodécylsulfate (SDS)	10g
Eau distillée	100ml

➤ **Solution d'Ammonium persulfate APS à 1%**

APS	0,1g
Eau distillée	10ml

➤ **Tampon Tris HCl pH = 8,8**

Tris	60,57g
Eau distillée	400ml
Ajuster le pH à 8,8 et compléter le volume jusqu'à 500ml avec de l'eau distillée	

➤ **Tampon Tris HCl pH = 6,8**

Tris	30,285g
Eau distillée	200ml
Ajuster le pH à 6,8 et compléter le volume jusqu'à 250ml avec de l'eau distillée	

➤ **Tampon d'électrophorèse**

Réactif	Quantité
Glycine	70,55g
Tris	15g
SDS	5g
Eau distillée	5000ml

**Annexe 4 : Préparation du gel de séparation (T : 12,52% ; C : 0,97%)**

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	<b>2.4</b>
Eau distillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	<b>1</b>
TEMED	<b>0.02</b>

### Annexe 5 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	<b>1</b>
Bisacrylamide 2%	<b>0.3</b>
Eau ditillée	<b>10.2</b>
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14
APS 1%	0,7
TEMED	0,014

### Annexe 6 : Préparation d'une solution de Coloration pour le gel d'électrophorèse

TCA 60%	Solution mère de bleu de Coomassie R250	Eau distillée
50ml	12,5ml	250ml

➤ Solution mère de Bleu de coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	5g
Ethanol 95°	500ml

L'éthanol est soumis à une agitation, le bleu de coomassie est ensuite ajouté, afin qu'il ne prenne pas de masse, le laisser sous agitation au minimum deux heures, la solution est ensuite filtrée.

### Annexe 7 : Absorbances et concentrations des cinquante fractions obtenues après purification des lectines sur colonne de DEAE-Cellulose

Fraction	Absorbance à 260nm	Absorbance à 280nm	Concentration (mg/ml)
1	0.030	0.051	0.056
2	0.056	0.091	0.098
3	0.311	0.685	0.825
4	0.354	0.677	0.780
5	0.354	0.721	0.848
6	0.022	0.028	0.026
7	0.276	0.458	0.500

8	0.211	0.438	0.518
9	0.228	0.438	0.505
10	0.142	0.323	0.392
11	0.112	0.275	0.341
12	0.054	0.118	0.141
13	0.046	0.109	0.133
14	0.041	0.081	0.094
15	0.001	0.002	0.002
16	0.011	0.679	1.044
17	0.154	0.339	0.408
18	0.149	0.303	0.356
19	0.118	0.230	0.266
20	0.108	0.171	0.182
21	0.121	0.170	0.171
22	0.101	0.109	0.092
23	0.082	0.097	0.088
24	0.066	0.079	0.006
25	0.054	0.078	0.116
26	0.046	0.078	0.085
27	0.274	0.788	1.013
28	0.128	0.489	0.660
29	0.145	0.331	0.402
30	0.097	0.199	0.234
31	0.069	0.157	0.190
32	0.059	0.127	0.152
33	0.066	0.132	0.154
34	0.067	0.123	0.139
35	0.057	0.124	0.148
36	0.045	0.078	0.061
37	0.035	0.064	0.072
38	0.035	0.042	0.038
39	0.035	0.041	0.036
40	0.028	0.031	0.026
41	0.027	0.015	0.002
42	0.026	0.027	0.022
43	0.026	0.049	0.056
44	0.002	0.003	0.003
45	0.002	0.003	0.003
46	0.022	0.016	0.008

47		0.045	
48		0.011	
49		0.011	
50		0.020	
51		0.020	
52		0.007	
53		0.007	
54		0.026	
55		0.033	
56		0.023	

Le calcul des Concentration a été effectué selon la méthode de Warburg et Christian : [Protéine] (mg/ml) = 1,55A280 - 0,76A260

## Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines du champignon polypore soufré (*Polyporus sulphureus*)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée.

Les lectines forment une famille de protéine et de glycoprotéine hétérogène qui reconnaissent certaine structure oligosaccharide, ce sont des protéines ubiquitaire, polyvalente et d'origine non immunitaire, qui se lient de manière réversible et spécifiquement aux hydrate de Carbone. Elles sont multivalentes et provoquent dans certains cas l'agglutination des cellules, elles sont trouvées pratiquement dans tous les organismes vivants.

Les champignons y compris les champignons microscopiques et levure appartiennent à une importante division d'organisme qui fait l'objet d'un important intérêt ces dernières années dans diverse applications biotechnologique et leur potentiel biomédicale. Notre objectif se trouve dans la caractérisation partielle des lectines extraite d'un champignon appelée « *polypore soufré* ».

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests, afin de trouver une activité hémagglutinante, trouver leur Phi, thermo-stabilité, leur interaction et affinité avec les sucres. Elles sont ensuite dessalées par une chromatographie d'exclusion moléculaire. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

L'effet anti-inflammatoire de champignon « *polypore soufré* » a été évalué sur les rats Wistar de poids allant de 100 à 120 grammes. Le Diclofénac et l'extrait brut de ce champignon sont administrés par voie intra péritonéale avant l'induction de l'inflammation (l'œdème de pied) par le formaldéhyde injecté par voie sous-cutanée.

**Mot clés :** Lectine ; Agglutination ; Hétérogène ; Ubiquitaire ; Multivalente ; Polypore soufré ; Affinité ; Dessalage ; Anti-inflammatoire ; Œdème

Laboratoire : Biochimie

### Membres du jury

**Président du jury :** Necib.Y (Pr-UFM Constantine)

**Rapporteur :** Zitouni.A (MC-UFM Constantine)

**Examineur :** Hafi.A (MAA-UFM Constantine)