



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم : الميكروبيولوجيا **Département : Microbiologie**

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Intitulé :

L'étude de l'extraction et la purification d'une lectine à partir d'une souche fongique pathogène *Aspergillus fumigatus*

Préparé par : **HAMMANI Doha**
et
SAIGHI Hiba

Le : 15 /07/2021

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme ABDELAZIZ .O	(MCB- UFM Constantine 1)
Rapporteur : Mr BOULAHROUF. K	(MCB- UFM Constantine 1)
Examineurs : Mme MEZIANI .M	(MAA- UFM Constantine1)

**Année universitaire
2020- 2021**

Remerciements

*A l'issue du cycle de notre formation nous tenons à remercier Dieu le
tout puissant*

Nos remerciements les plus sincères vont à :

*Monsieur **BOULAHROUF Khaled** Maitre de Conférence à
l'Université des Frères Mentouri Constantine pour tout le soutien et
l'encadrement qu'il nous a donné*

*Le corps enseignant administratif de la Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie des Frères Mentouri Constantine*

Nos vifs remerciements vont aux membres de jury :

*La présidente **ABDELAZIZ Ouided** Maitre de Conférence à
l'Université des Frères Mentouri Constantine et l'examinatrice Mme
MEZIANI Meriem Maitre Assistante à l'Université des Frères
Mentouri Constantine*

Pour avoir accepté de juger notre présent travail

*Nous tenons à remercier également tous ceux qui nous ont aidés de
prés et de loin pour l'élaboration de ce mémoire*

Merci

Dédicace

*Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu, de m'avoir donné la force et le courage de
mener à bien ce modeste travail*

Je dédie cet humble travail à :

A mon défunt père et ma chère mère

A mes sœurs : Rym & Maïssa

A mon petit frère : Maher Kalil-Allah

A mon binôme : Doha

A mon très cher ami : Issam

A toute la famille SAIGHI & BOULHABEL sans exception, ainsi que mes amies

« Djihene, Moufida, Asma, Norhane, Ghada & Maroua »

Hiba

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes parents qui ont veillé à ma réussite :

Mon très cher père

Mon idole dans la vie, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection

Ma très chère mère

Mon symbole de la tendresse et de la gentillesse, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles

*A mes belles sœurs **Rihab** et **Anfel** et mes chers frères*

Abd El Nour** et **Ishak

Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

*A mes familles **HAMMANI** et **BOUHEROUR***

A mon binôme

Hiba

A mes amies

Norhane, Ghada

A mes proches et à tous ceux que j'aime

Doha

Résumé

Les lectines sont des protéines polyvalentes et ubiquitaires, elles se trouvent dans une variété d'organisme, y compris les animaux, les plantes, les champignons, les bactéries et les virus. Actuellement, les espèces fongiques pathogènes sont reconnues comme une source potentielle de nouvelles lectines ayant des applications biotechnologiques et thérapeutiques. Dans cette étude, nous nous intéressons à l'identification, l'extraction et la purification d'une lectine spécifique du fucose de 32 kDa Chez la souche *A. fumigatus*. L'extraction a été réalisée selon deux procédures : le broyage dans l'azote liquide et la sonification, à partir de conidies au repos ou gonflées, de tubes germinatifs et mycélium. L'activité la plus élevée a été obtenue par sonification de conidies au repos. Un test d'héماغglutination a été effectué pour les extraits précédents en utilisant des érythrocytes de lapin, les résultats ont montré une activité lectinique plus élevée dans les conidies au repos et gonflées et une activité plus faible dans les tubes germinatifs et le mycélium de 5 jours. D'autre part, le test d'inhibition de l'héماغglutination par l'implication des saccharides et des glycoprotéines a révélé la spécificité des lectines pour l'acide sialique. Ensuite, trois méthodes ont été utilisées pour la purification ; filtration sur gel qui a mis en évidence des fractions actives dans le second pic d'héماغglutination et le premier pic d'absorbance correspondant à [35-45], puis la chromatographie d'échange d'ions qui a démontré la présence d'une lectine dans l'intervalle [25mM- 3M] NaCl, et enfin la chromatographie d'interaction hydrophobe qui a enregistré l'activité de la lectine dans le pic correspondant au sulfate d'ammonium 0.1 M. L'analyse de ces fractions actives par SDS-PAGE a permis d'élucider la présence d'une masse moléculaire de 32 kDa correspondant à la lectine d'intérêt.

Les mots clés : lectine (32 kDa), *A. fumigatus*, fucose, l'acide sialique, purification héماغglutination, extraction, chromatographie.

المخلص

للكتينات هي عبارة عن بروتينات متعددة الاستخدام والانتشار، تتواجد لدى مجموعة متنوعة من الكائنات الحية تشمل الحيوانات، النباتات، الفطريات، البكتيريا والفيروسات. حاليا تعتبر الأنواع الفطرية السامة المصدر الرئيسي للكتينات الجديدة ذات الاستعمال البيو تكنولوجي والطبي. يهمننا في هذه الدراسة التحقق من اللكتين الخاص بالفوكوز 32kDa في السلالة *A. fumigatus* وكيفية استخلاصه و تنقيته. تم استخلاص اللكتين من الكونيديا في حالة راحة، الكونيديا المنتفخة، الانبوب الجرثومي والميسيليوم وفقا لإجراءين: الطحن في النيتروجين السائل والصوتيات، وقد حققت الصوتيات اعلى نشاط في الكونيديا المنتفخة. أظهرت نتائج اختبار التراص للمستخلصات السابقة باستخدام مستقبلات الارنب، نشاطا لكتينيا عاليا في الكونيديا بحالتها ونشاطا منخفضا في الانبوب الجرثومي والميسيليوم ذو الخمسة ايام. من ناحية أخرى، كشف اختبار تثبيط التراص باستعمال السكريات والجليكوبروتينات عن خصوصية اللكتين لحمض السياليك. ثم استخدمت ثلاث طرق للتنقية، أولا الترشيح الهلامي الذي كشف عن نشاط في الذروة الثانية للتراص والذروة الأولى للامتصاص في المجال [35-45] ; ثم الفصل الكروماتوغرافي بالتبادل الايوني الذي اظهر وجود اللكتين في المجال [25mM-3M] من NaCl ; وأخيرا الفصل الكروماتوغرافي بالتفاعل الكاره للماء الذي سجل نشاط لكتيني في الذروة 0.1 M لكبريتات الامنيوم. أوضح تحليل هذه النشاطات باستعمال SDS-PAGE عن وجود كتلة جزيئية ذات 32kDa تتناسب مع اللكتين المطلوب.

الكلمات المفتاحية: اللكتين(32kDa)، *A. fumigatus* ، الفو كوز، حمض السياليك، التنقية، التراص، الاستخلاص، الفصل الكروماتوغرافي.

Abstract

Lectins are versatile and ubiquitous proteins, found in a variety of organisms, including animals, plants, fungi, bacteria and viruses. Currently, pathogenic fungal species are recognized as a potential source of new lectins with biotechnological and therapeutic applications. In this study, we focus on the identification, extraction and purification of a 32 kDa fucose-specific lectin in the *A. fumigatus* strain. The extraction was performed by two procedures: grinding in liquid nitrogen and sonication, from resting or swollen conidia, germ tubes and mycelium. The highest activity was obtained by sonification of resting conidia. A hemaagglutination test was performed for the above extracts using rabbit erythrocytes, the results showed higher lectin activity in resting and swollen conidia and lower activity in germ tubes and 5-day-old mycelium. On the other hand, the hemaagglutination inhibition test by involving saccharides and glycoproteins revealed the specificity of lectins for sialic acid. Then, three methods were used for purification; gel filtration which revealed active fractions in the second hemaagglutination peak and the first absorbance peak corresponding to [35-45], then ion exchange chromatography which demonstrated the presence of a lectin in the [25mM- 3M] NaCl range, and finally hydrophobic interaction chromatography which recorded lectin activity in the peak corresponding to 0.1 M ammonium sulfate. Analysis of these active fractions by SDS-PAGE elucidated the presence of a molecular mass of 32 kDa corresponding to the lectin of interest.

Keywords: lectin (32 kDa), *A. fumigatus*, fucose, sialic acid, purification, hemagglutination, extraction, chromatography.

Liste des abréviations

AB : Les sous unités A et B de toxine bactérienne

ALP : *alkaline phosphatase*

CEI : chromatographie échangeuse d'ions

CIH : Chromatographie d'interaction hydrophobe

ConA : *Concanavaline A lectin*

ConM : *Canavalia maritima lectin*

CRD : *carbohydrate recognition domain*

CYA 37 : *Czapek Yeast Agar 37°C*

CZA : *Czapek Solution Agar*

g: gravitation

HAU: *hemmagglutination activity unit*

kDa: kilodalton

MEA: *Malt Extract Agar*

MBL: *Mannane binding lectin*

NANA: N- acétylneuraminique

PA, PA-IL et PA-III : *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas aeruginosa lectin I et II*

PBS: Tampon phosphate salin

PDB: *Protein data bank*

PHA: *phytohemagglutinine*

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PNA : *Peanut agglutinin*

SEC : chromatographie d'exclusion stérique

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

VIH-1 : Virus immunodéficience humaine-1

YPD : *Yeast extract peptone*

Liste des figures

Figure 1. Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN) (Lenka et al., 2006).....	8
Figure 2. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (Lenka et al., 2006)	8
Figure 3. Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie <i>Escherichia coli</i> (Lis & Sharon, 1998)	9
Figure 4. Structure tridimensionnelle de la lectine de l'arachide (PNA) (Rougé et al., 2010).....	10
Figure 5. Interactions lectine-glucide à la surface des cellules (Sharon & Lis, 2004).....	11
Figure 6. Tétramère de la protéine ConM de <i>Canavalia maritima</i> complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre et al., 2006)	13
Figure 7. Modèle de trimère de protéine de liaison au mannose avec des ligands oligosaccharidiques (Weis & Drickamer, 1994)	14
Figure 8. Représentation schématique des applications des lectines en agriculture (a), en glycobiologie (b) et en médecine (c) (Tsaneva & Van Damme, 2020).	18
Figure 9. Cycle de vie d'un Ascomycète typique (Taylor et al., 2015).....	19
Figure 10. Représentation d'une tête aspergillaire (Thierry, 2011).	21
Figure 11. Colonies d' <i>A.fumigatus</i> présentant une pigmentation de surface bleu-vert typique sur une gélose Czapek (adapté de https://mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Sep08.html#page-top).	23
Figure 12. Observation macroscopique de <i>A. fumigatus</i> sur les milieux de cultures (CYA37, CZA, MEA) (Zulkifli & Zakaria, 2017 ; Afzal et al., 2013).....	24
Figure 13. Aspect microscopique de têtes aspergillaires d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (Latgé et Steinbach, 2009).....	24
Figure 14. Observation microscopique de <i>A. fumigatus</i> (Zulkifli & Zakaria, 2017 ; Latgé, 1999).....	25
Figure 15. Cycle sexué et asexué du genre <i>Aspergillus</i> (Casselton et Zolan, 2002).....	26
Figure 16. <i>A.fumigatus</i> après 5 jours d'incubation sur la gélose extrait de levure-dextrose-peptone (YPD) (Caitlin et al., 2020).	29
Figure 17. Schéma explicatif les différentes étapes de l'extraction par broyage dans l'azote liquide.....	31
Figure 18. Schéma explicatif les différentes étapes de l'extraction par sonication.....	32
Figure 19. Schéma représentatif de la précipitation et centrifugation des fractions actives...37	37

Figure 20. Profil protéique d'éluion (•) et activité d'hémagglutination (○) à partir de la chromatographie par filtration sur gel (**Tronchin et al., 2002**).....44

Figure 21. SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes des fractions actives issues des différentes étapes de la procédure de purification (**Tronchin et al., 2002**)46

Figure 22. Un aperçu sur le processus de récupération d'une lectine d'origine fongique.49

Liste des tableaux

Tableau 1. Les exemples de lectine chez les organismes vivants.	3
Tableau 2. Historique de la découverte des lectines (Renato & col, 1991).	5
Tableau 3. Quelques lectines découvertes au cours des vingt dernières années.	6
Tableau 4. Origine, rôles et application des lectines fongiques (Varrot & Basheer, 2013).	17
Tableau 5. Taxonomie du genre <i>Aspergillus fumigatus</i>	22
Tableau 6. Les glucides et les glycoprotéines utilisés comme inhibiteurs.	34
Tableau 7. Activité d'héماغglutination des différents stades morphologiques d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (Tronchin et al., 2002).	39
Tableau 8. Résultats d'inhibition (Tronchin et al., 2002).	41
Tableau 9. Inhibition de l'héماغglutination par NANA et les sialoglycoprotéines (Tronchin et al., 2002).	43
Tableau 10. Résumé de la purification de l'héماغglutinine d' <i>A. fumigatus</i> (Tronchin et al., 2002).	48

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre I : Les lectines

Introduction	1
1. Les lectines	3
1.2. Historique	4
1.3. Structure	7
1.4. Purification des lectines.....	10
1.5. Spécificités des lectines	10
1.6. Distribution des lectines chez les êtres vivants	12
1.7. Rôle des lectines	16
1.8. Intérêt.....	17

Chapitre II : Généralités sur le champignon

1. Les Ascomycètes	19
1.1. Définition	19
2. Aspergillus.....	20
2.2. Aspergillus fumigatus.....	22
2.2.1. Habitat	22
2.2.2. Taxonomie.....	22
2.2.3. Caractères morphologiques	23

2.2.4. Systématique.....	25
2.2.5. Métabolisme secondaire	26
2.2.6. Toxicité et pouvoir pathogène	27

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Souche ascomycétale.....	28
2. Fermentation.....	28
3. Préparation des érythrocytes.....	29
4. Préparation d'extraits fongiques	30
4.1. Principe.....	30
4.2.1. Broyage dans l'azote liquide	30
4.2.2. L'extraction par sonication.....	32
5. Test d'hémagglutination.....	33
6. Test d'inhibition de l'hémagglutination	33
7. Procédures de purification.....	34
7.1. Fractionnement par filtration sur gel	35
7.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	35
7.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe	36
8. Electrophorèse	37

Chapitre IV : Résultats et Discussion

Résultats	39
1. Activité d'hémagglutination spécifique des extraits fongique	39
2. Inhibition de l'hémagglutination par divers glucides et glycoconjugués.....	41
3. Purification de l'hémagglutinine.....	44

3.1. Fractionnement sur gel de filtration	44
3.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	45
3.3 Chromatographie d'interaction hydrophobe.....	45
3.4. L'électrophorèse	45
4. Relation entre les activités d'hémagglutination et de sérine protéase.....	49
Discussion	50
Conclusion	53

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les lectines sont des protéines liant les sucres présents à la surface des cellules ou des glycoprotéines d'origine non immunitaire qui agglutinent les cellules et participent à la précipitation des glycoconjugués (**Goldstein, 1986**). Elles sont nommées agglutinines pour leurs capacités d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués, ces molécules classées comme ubiquitaires en référence à leurs sites de localisation, car elles se trouvent chez tous les organismes tels que les plantes, insectes, animaux et aussi chez les microorganismes comme les bactéries, virus ainsi que les champignons (**Gioci, 2006**). Elles ont un rôle majeur dans la défense de l'hôte (**Singh et al., 2010**). Et présentent une application importante dans le domaine biomédical (**Singh et al., 2019**).

Ces glycoprotéines présentes dans les cellules des organismes sont extraites et purifiées par divers méthodes, notamment la chromatographie d'affinité, l'échangeuse d'ions en utilisant des gels tels que **sephadex TM** et **Shepharose TM**.

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux, il est rencontré le plus souvent en pathologie humaine et responsable d'un large éventail de maladies affectant exclusivement des patients débilisés. Le plus souvent, la contamination se fait par voie aérienne et le site anatomique privilégié de l'infection est l'arbre respiratoire (**Fillaux, 2013**).

Maintes d'expériences ont été réalisées par des chercheurs étrangers pour l'extraction et la purification des lectines à partir du champignon *Aspergillus fumigatus*.

Dans notre étude, nous avons analysé l'article scientifique « *Purification and Partial Characterization of a 32-Kilodalton Sialic Acid-Specific Lectin from Aspergillus fumigatus* », le travail est réparti comme suit :

- ❖ Une étude bibliographique sur les lectines et le champignon pathogène.
- ❖ Les méthodes utilisées lors du travail expérimental.
- ❖ Les résultats et la discussion.

➤ **Objectif du travail**

L'étude choisie consiste à purifier et caractériser partiellement des lectines extraites du champignon pathogène « *Aspergillus fumigatus* ».

Le protocole et les méthodes utilisées sont les suivants :

- L'étude a été réalisée afin d'étudier la présence des lectines chez *Aspergillus fumigatus* ainsi que leurs poids en kDa.
- L'étude de la présence des lectines par le test d'héماغglutination avec des érythrocytes de lapin.
- L'étude de l'affinité de ces lectines envers les glucides par le test d'inhibition.
- Purification successive des différents extraits fongiques.
- Électrophorèse et l'estimation du poids moléculaire par SDS-PAGE.
- La relation entre les activités d'héماغglutination et la sérine protéase.

Bibliographie

Chapitre I : Les lectines

1. Les lectines

1.1. Définition

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines de liaison aux sucres d'origine non immunitaire (**Janand Vtislav, 1981**) qui se lient spécifiquement à des mono-, oligo- ou polysaccharides (**Wolfgang et al., 2007**) et capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible (**Lis & Sharon, 1998**).

Le nom «lectines» dérivée du mot latin «*lectus*» qui est le participe passé du verbe «légère», qui veut dire «sélectionner» ou «choisir» (**Liener et al., 1986**). Les lectines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KDa. Elles sont capables de se lier aux résidus de sucre des parois cellulaires ou des membranes qui sont conjugués à des lipides ou à des protéines. Cette réaction modifie la physiologie de la cellule (**Wolfgang et al., 2007**). Sont dépourvues d'une activité enzymatique envers les sucres auxquels, elles se lient et ne nécessitent pas de groupes hydroxyle glycosidiques libres de ces sucres pour leur liaison ; Elles ne sont pas des enzymes ou des anticorps (ou peut-être d'autres groupes de protéines) (**Hartmuts et al., 1981**). Sont des protéines 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 (**Ghopkins & Evrard, 2003**). Ces protéines ont de liaison aux hydrates de carbone qui reconnaissent spécifiquement diverses structures de sucre et servent de médiateur à une variété de processus biologiques, tels que les interactions cellule-cellule et hôte-pathogène, le renouvellement des glycoprotéines sériques et les réponses immunitaires innées (**Vijayan & Nagasuma, 1999**). Les lectines sont présent dans toutes les branches du règne vivant : les microorganismes (virus, bactéries, champignons), les plantes, les insectes et les animaux (**Tableau 1**).

Tableau 1. Les exemples de lectine chez les organismes vivants.

Les organismes vivants	Exemple de lectine
Animal	Lectine de type S
Vegetal	Lectine d'haricot rouge : <i>phytohe-magglutinine (PHA)</i>
Micro-organisme	Lectine de champignon (<i>Agaricus campestris</i>) : la concanavaine A
Insecte	Lectine de type c

1.2. Historique

La première lectine est découverte par P. H Stillmarka en 1888, qui a été décrite dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Doprat (maintenant Tartu, Estonie), que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (Sharon & Lis, 2004), par la suite Hellin H à démontrer à son tour la présence d'autres hémagglutinines toxique.

En 1919, Sumner, Hames B, de l'université de New York ont extraient la Concavoline A sous forme cristalline, l'extraction est faite à partir du pois (*Canavalia ensiformis*), (Sumner, 1919). Après des années de recherches écoulées, Sumner et Howell ont pu mettre en évidence la spécificité de ces protéines pour les sucres avec l'inhibition de l'hémagglutination de la Concanavoline A (Sumner & Howell, 1936). Ces protéines agglutinantes et spécifiques aux sucres ont eu le nom de « Lectine », leur présence est répandue chez les plantes, invertébrés et autres (Sharon & Lis, 2004).

En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytaires humains d'un groupe sanguin, ces agglutinines sont extraites à partir de graines et plantes, elles certifient d'avoir une importance théorique et pratique (Boyd & Sharpleigh, 1954). Le tableau ci-dessous (Tableau 2) représente les éventuelles découvertes.

Ces dernières années, les chercheurs ont fait d'autres découvertes. Tout Comme Turner en 2003 a mis en évidence le rôle de la lectine liant le mannose dans la santé et la maladie (Turner, 2003), en 2010 Rougé, Culerrier, Granier, Rancé et Barre ont extrait la lectine de l'arachide dans les légumineuses (Rougé *et al.*, 2010).

Les découvertes Les plus récentes sont en 2020, la Purification et la caractérisation d'une lectine mitogène spécifique de la xylose provenant de *Fusarium sambucinum* par Singh, Thakur et Kennedy. Egalement Une lectine liant le glucose à partir de graines de *Leucaena leucocephala* et son activité mitogène contre les lymphocytes humains par Madayi, Surya et Elyas (Singh *et al.*, 2020 ; Madayi *et al.*, 2020). Le tableau ci-dessous (Tableau 3), représente quelques découvertes de lectines au cours des vingt dernières années.

Tableau 2. Historique de la découverte des lectines (Renato & col, 1991).

Année	Auteur	Découvertes
1884	Warden & Waddel /Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine <i>d'Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	Stillmark	Activité hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine <i>d'Abrus precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d' hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la <i>Concanavalina A</i> (Con A)
1936	Sumner & Howell	Spécificité du sucre de la concanavaline A

1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme lectine
1966	Boyd	Lectines des algues
1977	Ofek <i>et al</i>	Rôle des lectines bactériennes dans l'infection
1990	Yamauchi et Minamikawa	L'expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

Le tableau ci-dessous (**Tableau 3**), représente quelques découvertes de lectines au cours des vingt dernières années.

Tableau 3. Quelques lectines découvertes au cours des vingt dernières années.

Année	Auteur	Découvertes
2002	Tronchin <i>et al</i>	Purification et caractérisation partielle d'une lectine spécifique de l'acide sialique de 32 kilodaltons d' <i>Aspergillus fumigatus</i>
2003	Turner	Le rôle de la lectine liant le mannose dans la santé et la maladie
2005	Rabijns <i>et al</i>	Analyse structurale de la lectine MornigaM du mûrier noir (<i>Morus nigra</i>), liée à la jacaline, en complexe avec le mannose.
2007	Khan <i>et al</i>	Purification et caractérisation d'une lectine du champignon <i>endophyte</i> <i>Fusarium solani</i> ayant une spécificité de sucre complexe

2010	Rougé <i>et al</i>	La lectine de l'arachide
2016	Bhari <i>et al</i>	Activité des lectines dans les extraits mycéliens des espèces de <i>Fusarium</i>
2018	Alyousef <i>et al</i>	Isolement et caractérisation d'une lectine ayant des activités antibactériennes, anti-film et antiprolifératives à partir d' <i>Acinetobacter baumannii</i> d'origine environnementale
2020	Singh <i>et al</i>	Purification et caractérisation d'une lectine mitogène spécifique de la xylose provenant de <i>Fusarium sambucinum</i>
2020	Madayi <i>et al</i>	Une lectine liant le glucose provenant des graines de <i>Leucaena leucocephala</i> et son activité mitogène contre les lymphocytes humains

1.3. Structure

Les progrès de la biologie structurale ont permis d'élucider les structures de la plupart des familles de lectines, aboutissant à une classification précise des lectines en fonction de leur topologie.

1.3.1. Structure simple

Elle est principalement composée des monomères (**Figure 1**) (pas forcément identiques) d'une masse moléculaire n'excède pas 40 kDa et comprend toutes les lectines (végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines) (**Lenka et al., 2006**).

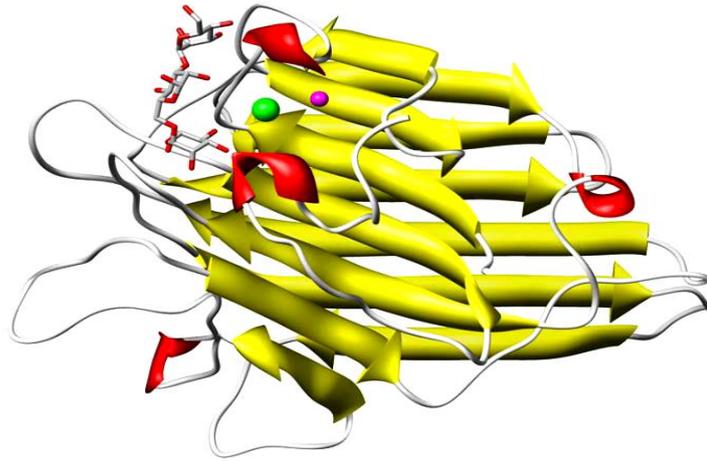


Figure 1. Représentation graphique d'un monomère de *concanavoline A* de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN) (Lenka *et al.*, 2006).

1.3.2. Structure mosaïque

Elle est constituée des molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison, cette catégorie comprend diverses protéines de différentes sources (virus (**Figure 2**), animaux) (Lenka *et al.*, 2006).

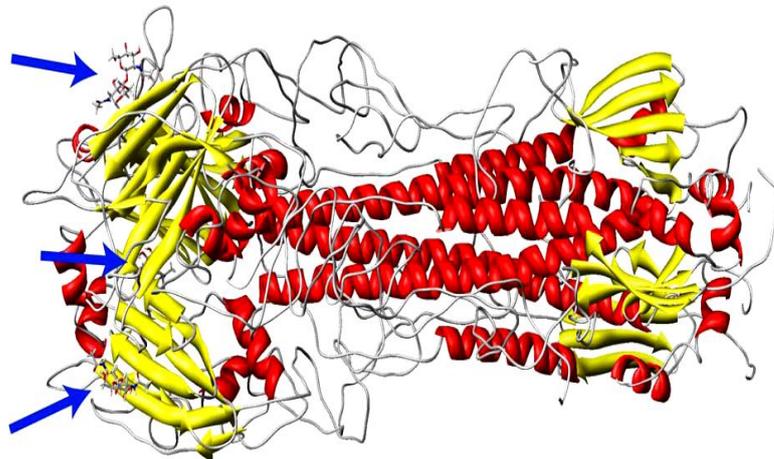
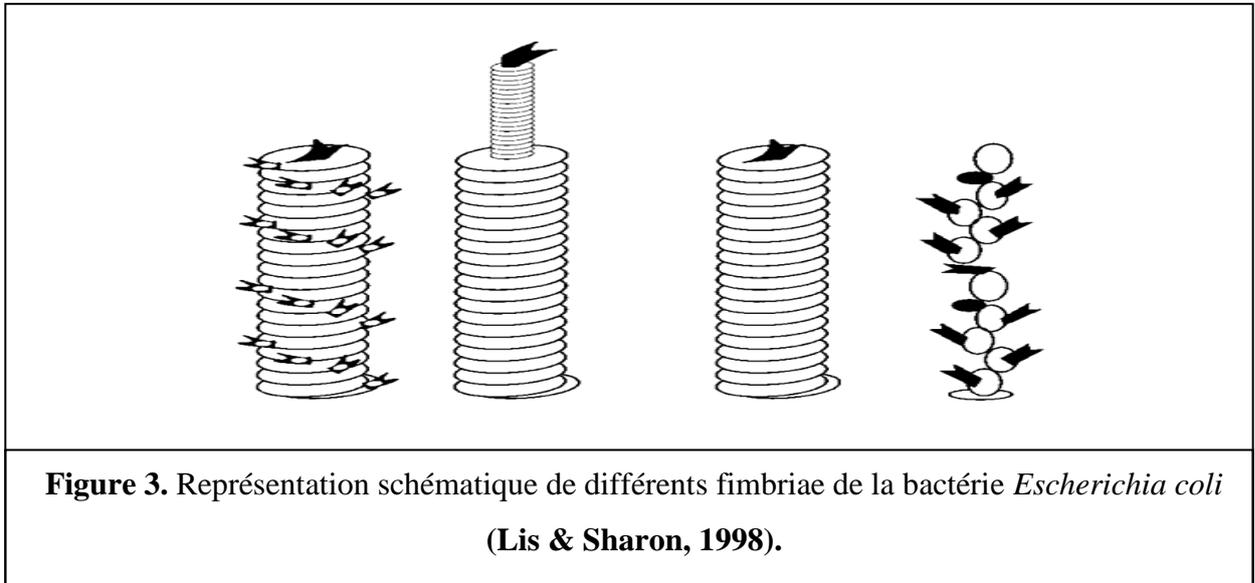


Figure 2. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

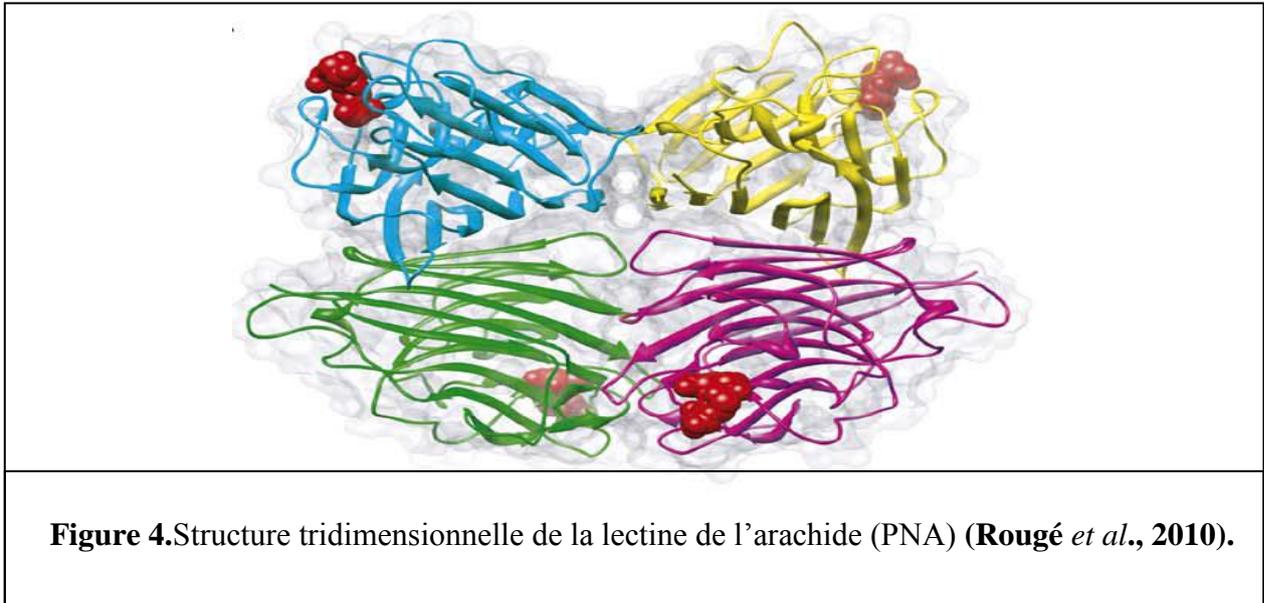
1.3.3. Assemblage macromoléculaire

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries ; ou elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de longueurs ; appelées fimbriae (**Figure 3**) ou pili (**Lenka et al., 2006**).



1.3.4. Tridimensionnelle

C'est une structure cristalline qui est constituée de sous-unités (**Figure 4**). Il s'agit généralement d'une séquence peptidique invariante ou très bien conservée qui forme le domaine structural minimal nécessaire à la reconnaissance du ligand. La structure quaternaire d'une lectine peut être un multimère formé par l'association non covalente de deux (dimère) à cinq sous-unités (pentamère), la deuxième classe est de type β -propeller où le domaine de reconnaissance est répété plusieurs fois dans la structure, la dernière classe montre la présence de deux CRD distincte reliée par un domaine de jonction (linker) (**Gianluca, 2006**).



1.4. Purification des lectines

Les lectines purifiées sont essentielles pour établir leurs propriétés moléculaires. Et hautement souhaitable pour leurs nombreuses applications (Sharon, 2007).

Diverses méthodes de purification notamment la chromatographie d'affinité, chromatographie d'échange ionique, la chromatographie d'interaction hydrophobe et la filtration sur gel peuvent être utilisées, le critère majeur pour un bon rendement lors de la purification est de choisir un protocole de purification simple (Lam & Ng, 2010).

La méthode de purification la plus efficace qui peut être réalisée est la chromatographie d'affinité, dans des colonnes contenant des polysaccharides pour tirer parti de la spécificité des lectines pour les sucres et de la disponibilité de matrices de gel à base de sucre pour la chromatographie, en particulier le SephadexTM à base de glucose et le SepharoseTM à base de galactose (Nascimento *et al.*, 2012).

1.5. Spécificités des lectines

1.5.1. Spécificité de reconnaissance

Les glycanes (oligosaccharides et polysaccharides) constituent un vaste groupe de biomolécules aux structures diverses, que l'on retrouve à l'intérieur ou à la surface des cellules (Figure 5). Ces substances sont principalement présentes sous la forme de glycoconjugués, notamment les glycoprotéines (Park, 2008).

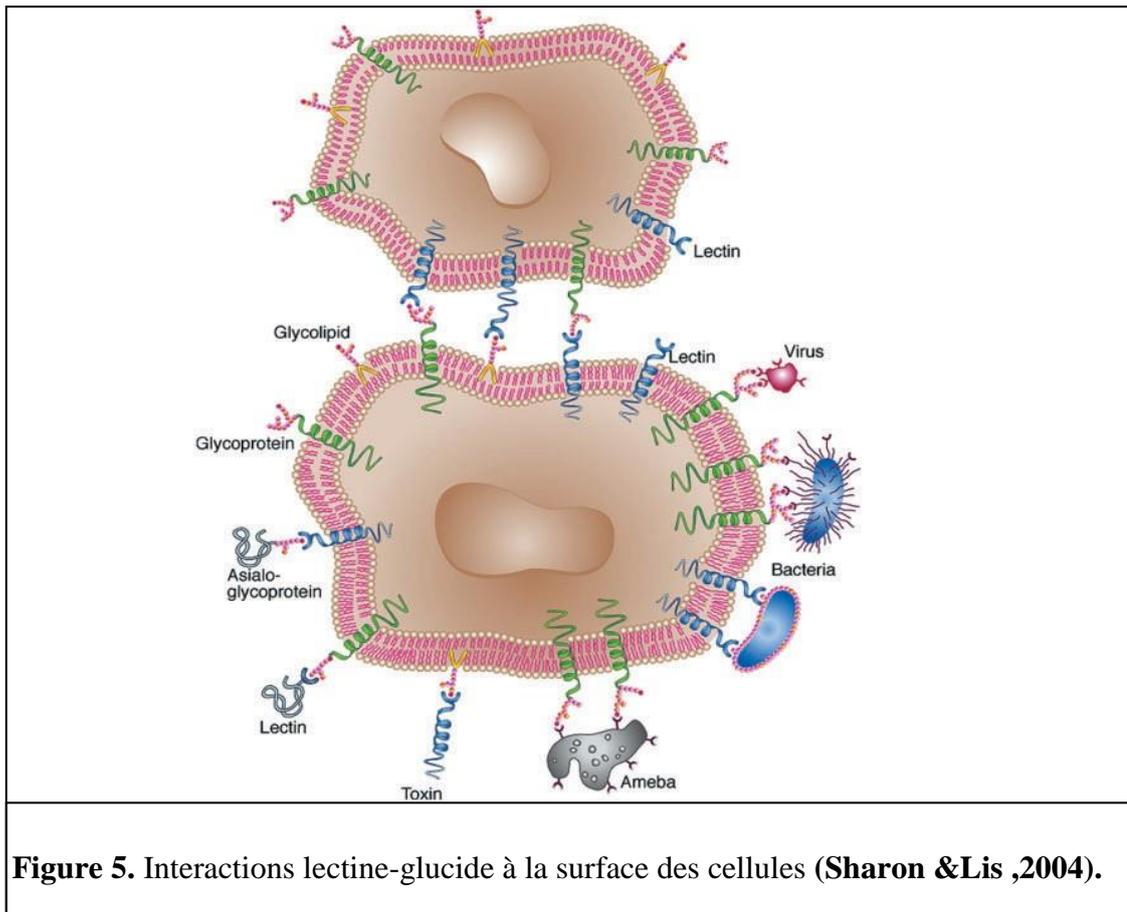


Figure 5. Interactions lectine-glycane à la surface des cellules (Sharon & Lis ,2004).

Les informations de reconnaissance ont été admises sur la base d'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre. Les sites de liaisons des lectines spécifiques pour les monosaccharides sont majoritairement des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine, contrairement pour les lectines spécifiques pour les oligosaccharides leurs sites sont plus profonds et établis une excellente complémentarité pour le ligand. Les liaisons hydrogènes entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes, ce qui permet d'aboutir à une bonne affinité. Les chaînes latérales sont souvent impliquées dans les liaisons hydrogènes avec les ligands. Les groupements NH ou CO de la chaîne principale de la protéine participent souvent à la reconnaissance (Vyas, 1991).

1.5.2. Spécificité d'affinité

Les lectines sont classées en cinq groupes, en fonction du monosaccharide pour lequel elles ont la plus grande affinité : mannose, galactose/N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, fucose et acide N-acétylneuraminique, ces derniers sont des constituants des surfaces des cellules eucaryotes qui ont une influence sur les activités biologiques des lectines (Sharon & Lis, 1998).

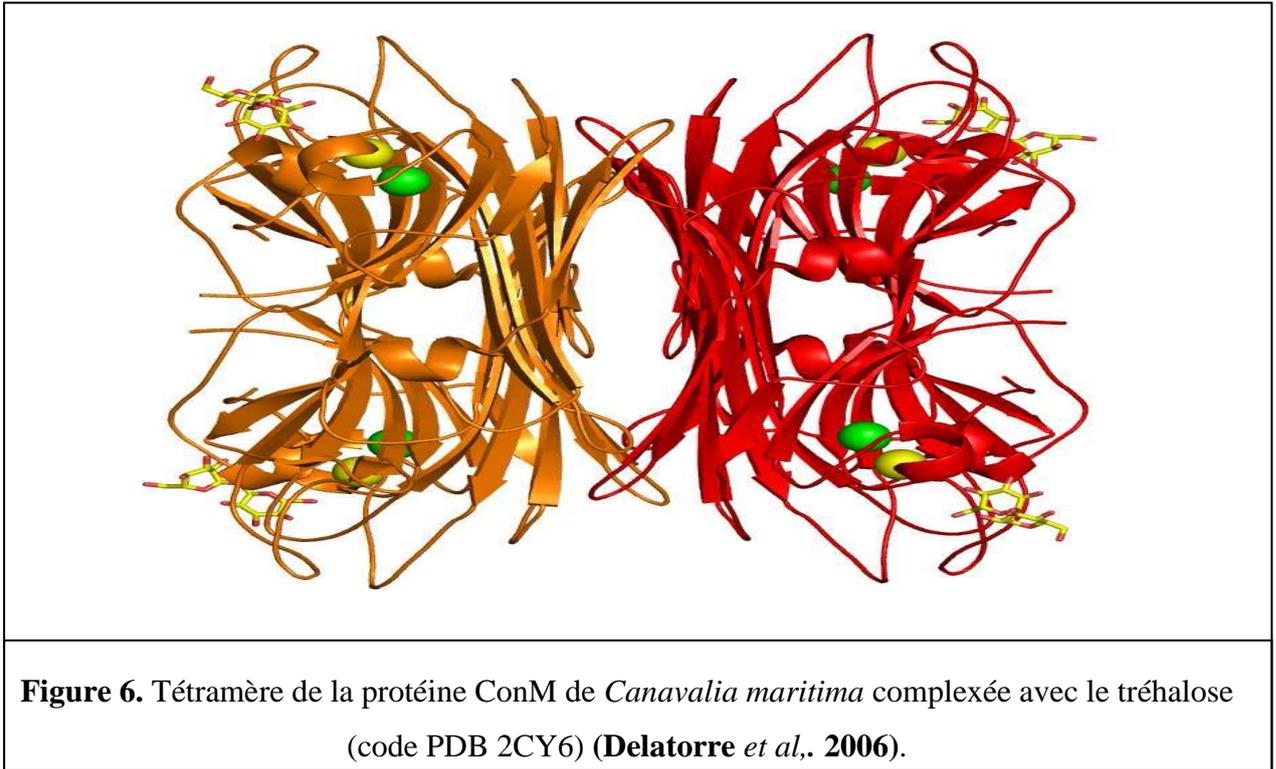
Pour étudier le mécanisme d'action des lectines « Interaction glucides-protéines », on utilise le test d'hémagglutination comme première méthode pratique, du moment que les érythrocytes sont munis sur leurs surfaces cellulaires de nombreux groupes d'hydrates de carbones. Les lectines ayant des spécificités du sucre différentes peuvent souvent provoquer l'hémagglutination, si les lectines sont multivalentes. La structure glucidique à laquelle une lectine se lie spécifiquement peut être sondée avec un panel de sucres comme inhibiteurs. Les résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination seront souvent immédiatement utiles pour l'étape suivante de l'investigation, qui est l'isolement et la purification de la lectine. Un sucre inhibiteur ou ses dérivés conjugués à un support solide peu solide pourrait servir de milieu d'affinité pour cette lectine (Lee, 1995).

1.6. Distribution des lectines chez les êtres vivants

➤ Chez les végétaux

La distribution des lectines a été étudiée de manière plus intensive chez les plantes de la famille des Leguminosae, qui présente des homologies de séquence et des similarités structurales. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (Edelman, *et al.*, 1972, Hardman & Ainsworth, 1972). Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé « b jelly roll » formé par deux feuillets b superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. En outre d'autres familles de lectines végétales sont identifiées : des Gramineae (céréales) auxquelles appartient la lectine du germe de grain de blé (WGA), les Monocotylédones qui présentent des lectines spécifiques pour le mannose, La famille des Moraceae qui fixe le galactose tel que la jacaline isolée des graines d'*Artocarpus integrifolia* (Sankaranarayanan, *et al.*, 1996) ; et les Amaranthaceae et Euphorbiaceae. En se basant sur l'architecture globale des domaines des lectines végétales, quatre principaux groupes peuvent être distingués : les mérolectines, les hololectines, les chimérolectines et superlectines (Van Damme *et al.*, 1998).

La figure ci dessous (Figure 6) montre un exemple d'une protéine légumineuse ConM chez la *Canavalia maritima*.



Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

➤ Chez les animaux

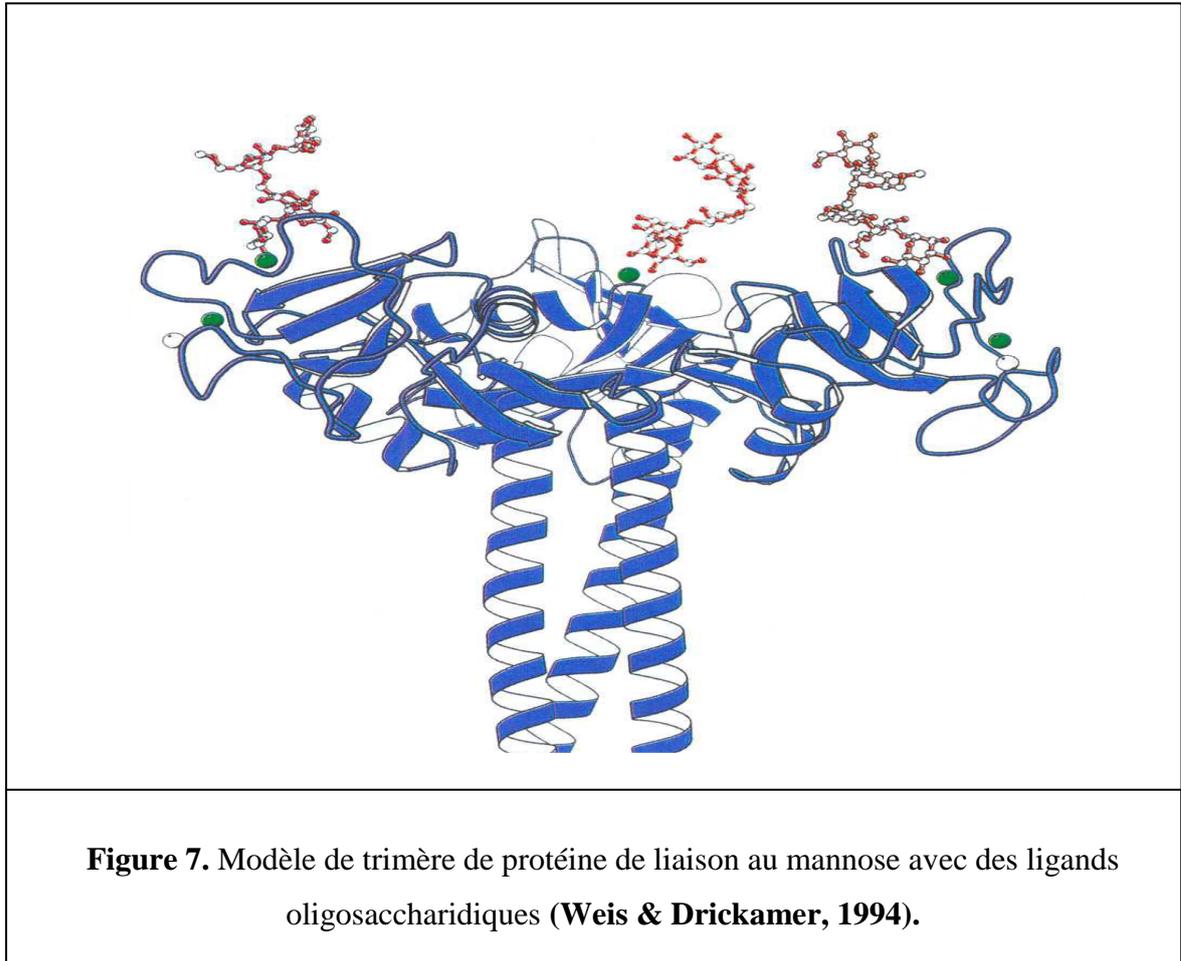
Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les galectines, les lectines de type C et les siglecs. Sont principalement intracellulaires : famille de calnexine, de type M, de type L et de type P ou extracellulaire : type C, type R, siglecs et galectines (Arason, Clausen & Bannett, 1996 ; Braakman, 2001).

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses lectines ont été découvertes chez les vertébrés. Ce travail a été stimulé par un intérêt pour les fonctions biologiques de ces protéines. Les lectines peuvent être classées en deux groupes : les lectines solubles qui peuvent jouer un rôle dans la sécrétion ou l'organisation des glycoconjugués extracellulaires (Barondes, 1984) et les lectines membranaires qui sont intégrées dans les membranes et sont apparemment impliquées dans la translocation des glycoconjugués dans les cellules (Ashwell & Harford, 1982).

La présence de lectines a été démontrée chez les invertébrés terrestres et marins. Ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et ont donc des spécificités pour les glucides (Figure 7) présents à la surface d'organismes pathogènes (Vasta, 1992).

Chez les invertébrés, les lectines sont distribuées dans toutes les classes et sous-classes étudiées. En voici quelques exemples : les gastéropodes avec la lectine d'escargot CHA-II de *Cepaea hortensis* (Gerlach *et al.*, 2002), les échinodermes avec l'hémagglutinine De l'oursin

Hemicentrotus pulcherrimus (Yamada & Aketa, 1982), les crustacés avec la lectine du crabe *Charybdis japonica* (Umetsu, et al., 1991), et les insectes avec la lectine du Sphinx du tabac *Manduca sexta* (Yu & Kanost, 2000).



➤ Chez les microorganismes

La reconnaissance des sucres à la surface des cellules hôtes implique l'utilisation de lectines par les microorganismes pathogènes : virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes. 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 & Varrot, 2008 ; Sharon, 1996).

L'exemple le plus marquant de lectine virale est l'hémagglutinine du virus de la grippe (*Influenza virus*). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur à la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (Weis et al., 1990).

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines fimbriales (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (Imberty et al., 2005).

Les lectines fimbriales se trouvent dans des organelles de surface des bactéries (pili et flagelles) qui ont diverses fonctions telles que la reconnaissance des glycanes de l'hôte et l'adhésion aux surfaces cellulaires cibles. Il existe trois types de pili : les types IV, les types I et les types P (**karoline, 2008**), dans les trois différents types de fimbria qui ont été observés (type I, type P et type IV), l'organisation structurale est similaire, les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues à ce jour appartiennent aux pili de type I ou de type P et montrent que les domaines de la lectine adoptent des repliements similaires. Basés sur une structure allongée de type β -sandwich (**Soto and Hultgren, 1999**).

La famille des toxines est constituée de protéines secrétées par les bactéries qui exercent une activité toxique sur les cellules hôtes (**karoline, 2008**) ; L'endommagement de la cellule peuvent se produire par la rupture de la paroi cellulaire, l'inhibition de la synthèse des protéines ou l'activation des métabolismes secondaires, ces toxines sont de type AB (**Merritt & Hol, 1995**).

La famille de lectines solubles comprend des protéines cytoplasmiques telles que PA-II et PA-III de *Pseudomonas aeruginosa* spécifiques respectivement de le α -D-galactose et le α -L-fucose. (**Karoline, 2008**) ; ces protéines ont une affinité pour les sucres et ne présentent pas d'activité enzymatique (**Kostlanova et al., 2005**).

Environ 80 % des lectines fongiques sont isolées de champignons. Au fil des ans, des agglutinines ont été largement signalées dans les champignons supérieurs britanniques, les champignons japonais, les champignons australiens et les champignons d'Asie du Sud-Est .Un grand nombre de lectines ont été de champignons comestibles.

Parmi les Basidiomycètes, un grand nombre de lectines a été rapporté dans des genres tels que *Boletus*, *Lactarius*, *Phallus*, *Russula* et des familles telles que Hygrophoraceae et Tricholomataceae. Récemment, une large gamme de lectines de champignons a été explorée dans la famille des Russulaceae, en particulier avec deux genres, *Russula* (les fragments) et *Lactarius* (les capsules de lait) qui sont impliqués dans les associations mycorhiziennes.

Les lectines sont largement distribuées dans les fructifications et les mycéliums végétatifs des champignons, dans les conidies des champignons filamenteux ainsi que dans les levures. Diverses lectines mycéliennes intracellulaires, extracellulaires et de surface des Basidiomycètes ont été isolées. Les lectines associées aux mycéliums intracellulaires et de surface ont été signalées par des genres de champignons tels qu'*Agrocybe*, *Coprinus*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Ganoderma*, *Gymnopilus*, *Panaeolus*, *Pleurotus*, *Punctularia*, *Pycnoporus*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, *Volvariella*, etc. Bien que l'existence des lectines de champignons et leurs rôles potentiels dans la toxicité, les mécanismes de défense et la

mycorrhisation soient connus depuis plusieurs décennies (**Guillot & Grazyna, 1997 ; Sarup et al., 2019**).

Les lectines des protozoaires sont localisées à la surface des parasites comme les micronèmes (MIC), ces protéines sont libérées à la surface du parasite juste avant l'invasion des cellules hôtes et jouent un rôle important dans l'identification, l'attachement et la pénétration de la cellule hôte (**Blumenschein et al., 2007**).

1.7. Rôle des lectines

Les lectines ce sont des glycoprotéines présentes dans divers espèces vivantes, elles peuvent être détectées par l'héماغglutination grâce aux érythrocytes des animaux « lapins – rats » et parfois aux globules rouges humains.

Elles ont la capacité de reconnaître et d'adhérer aux cellules pathogènes grâce à des récepteurs, qui activent le système de défense, elles contrôlent également la concentration de protéines dans le sang.

Divers rôles ont été postulés pour les lectines fongiques, végétales et de champignons ; aucun d'entre eux ne s'exclut mutuellement, et chacun a son rôle spécifique en fonction des circonstances. Ainsi que dans la croissance et la morphogénèse. L'initiation et la croissance souvent explosive des sporomes s'accompagnent d'une dépolymérisation du matériel stocké et d'un mouvement intense des sucres, peut-être contrôlé par des lectines agissant directement sur les hydrates de carbone via leurs sites de liaison spécifiques. Au cours de leur croissance, de nombreux champignons construisent des organes spécialisés qui nécessitent une agrégation mycélienne. Implication dans la reconnaissance moléculaire pendant le stade précoce de la mycorrhization. L'observation de symbiose ectomycorrhizienne avec des spécificités strictes et la présence de lectines dans les cellules fongiques suggère que les lectines pourraient être impliquées dans la reconnaissance entre l'arbre et son symbiote (**Guillot & Kanska, 1997**).

La MBL est une protéine du système de défense immunitaire inné, elle s'adhère aux sucres situés sur les surfaces microbiennes, cette liaison « MBL-sucre » va créer l'activation et le clivage de C4 et C3, et par la suite l'opsonophagocytose aura lieu (**Turner, 2003**).

La voie des lectines est initiée par la *mannane binding lectin* (MBL). Produite par le foie, cette protéine est essentielle à l'immunité innée, comme en témoigne la susceptibilité aux infections des enfants déficients en MBL (**Cavaillon, 2005**).

Dans les cellules animales, les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre de réponse de l'immunité innée (De Hoff *et al.*, 2009).

La paracoccine est une lectine présente dans *Paracoccidioides brasiliensis*. Elle se lie à la laminine de la matrice extracellulaire lors d'une infection. Cette liaison stimule la libération du facteur nécrotique tumoral (TNF α) ainsi que de l'oxyde nitrique (Kotecha & Poduval, 2019).

En outre les lectines ont plusieurs autres rôles pour l'application biotechnologique en fonction de leur origine (Tableau 4).

Tableau 4. Origine, rôles et application des lectines fongiques (Varrot & Basheer, 2013).

origine	Rôles	Reserve et application biotechnologique
➤ Champignons	➤ Protéine et stockage ➤ Croissance	➤ Purification des glycoprotéines ➤ Purification des hydrates de carbone
➤ Microfungi	➤ Morphogénèse ➤ Parasitisme	➤ Études glycomiques ➤ biomarqueurs
➤ Levure	➤ Infections ➤ Reconnaissance moléculaire ➤ Floculation des cellules de défense ➤ Processus d'accouplement	➤ Recherche sur le cancer ➤ Antiviraux ➤ Insecticide /vermicide ➤ Administration ciblée de médicaments

1.8. Intérêt

En soulignant l'importance des lectines dans certains processus biologiques chez l'homme, en particulier ceux mettant en jeu glycoprotéines et cellules circulantes : Hémagglutination, Spécificité vis-à-vis des groupes sanguins, Transformation lymphoblastique, Agglutination de cellules malignes, Hémagglutinine lectinique d'origine non

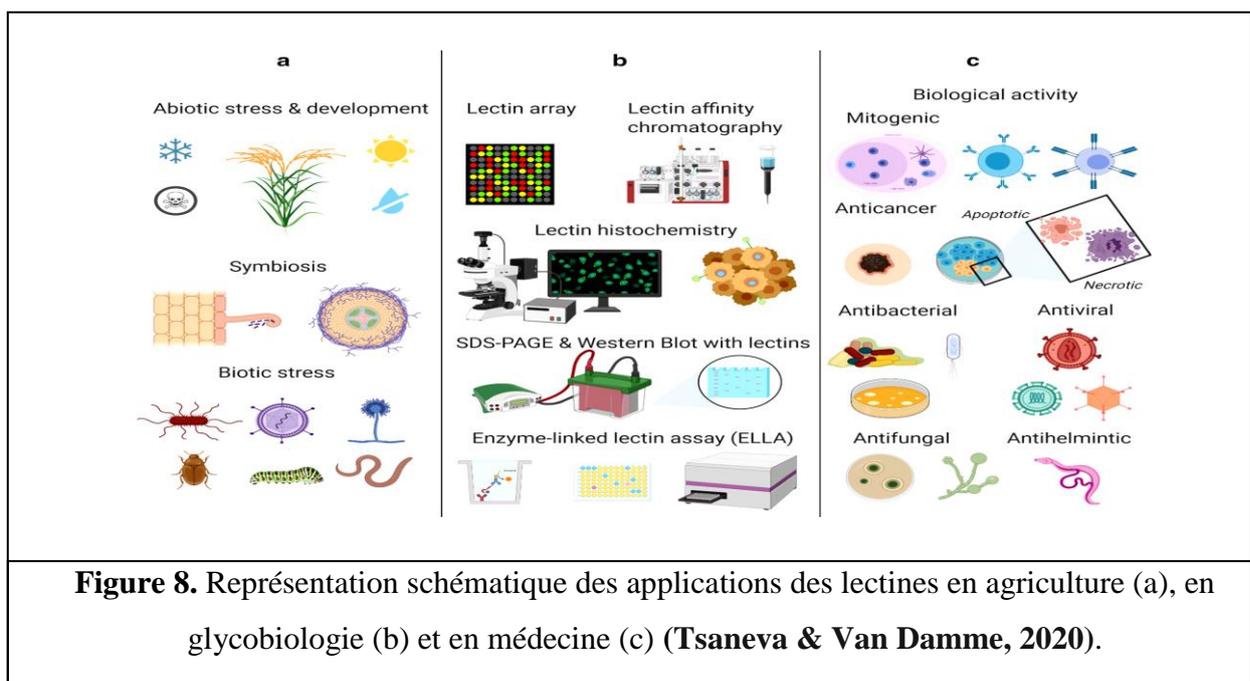
végétale (anti-A1), Clearance des asialoglycoprotéines, Activité lectinique de la fibronectine, Séparation des thymocytes matures et immatures, Participation à l'agrégation plaquettaire, Reconnaissance des terminaisons Gal et GalNac (Caron & Faure, 1982).

Les lectines peuvent être exprimées comme outil de la glycobiochimie : depuis leur découverte, les lectines ont été exploitées pour leur activité mitogène, leur spécificité de groupe sanguin, leurs glucides, leur implication dans la signalisation cellulaire et les réponses immunitaires, etc. (Figure 8). Aujourd'hui, les lectines sont non seulement activement étudiées par la chromatographie d'affinité et les réseaux de glycanes mais elles sont également utilisées comme outils en raison de leur liaison réversible et spécifique aux structures glucidiques, ce qui apporte de nouvelles perspectives en immunologie et en thérapie du cancer (Tsaneva & Van Damme, 2020).

L'importance des agglutinines lectiniques est présentée dans une série de processus physiologiques fondamentaux liés à la reconnaissance moléculaire et cellulaire : défenses contre l'infection, coagulation, vieillissement (Caron & Faure, 1982).

Les lectines peuvent être impliquées dans les réponses au stress biotique et abiotique et le développement des plantes, certaines entre eux sont utilisées comme agents insecticides, antifongiques, antibactériens et antiviraux (Tsaneva & Van Damme, 2020).

La lectine a une application prometteuse comme agent antimicrobien et antibiofilm pour contrôler les infections associées aux pathogènes multirésistants. De même, la capacité à contrôler la prolifération des cellules tumorales (Alyousef *et al.*, 2018).



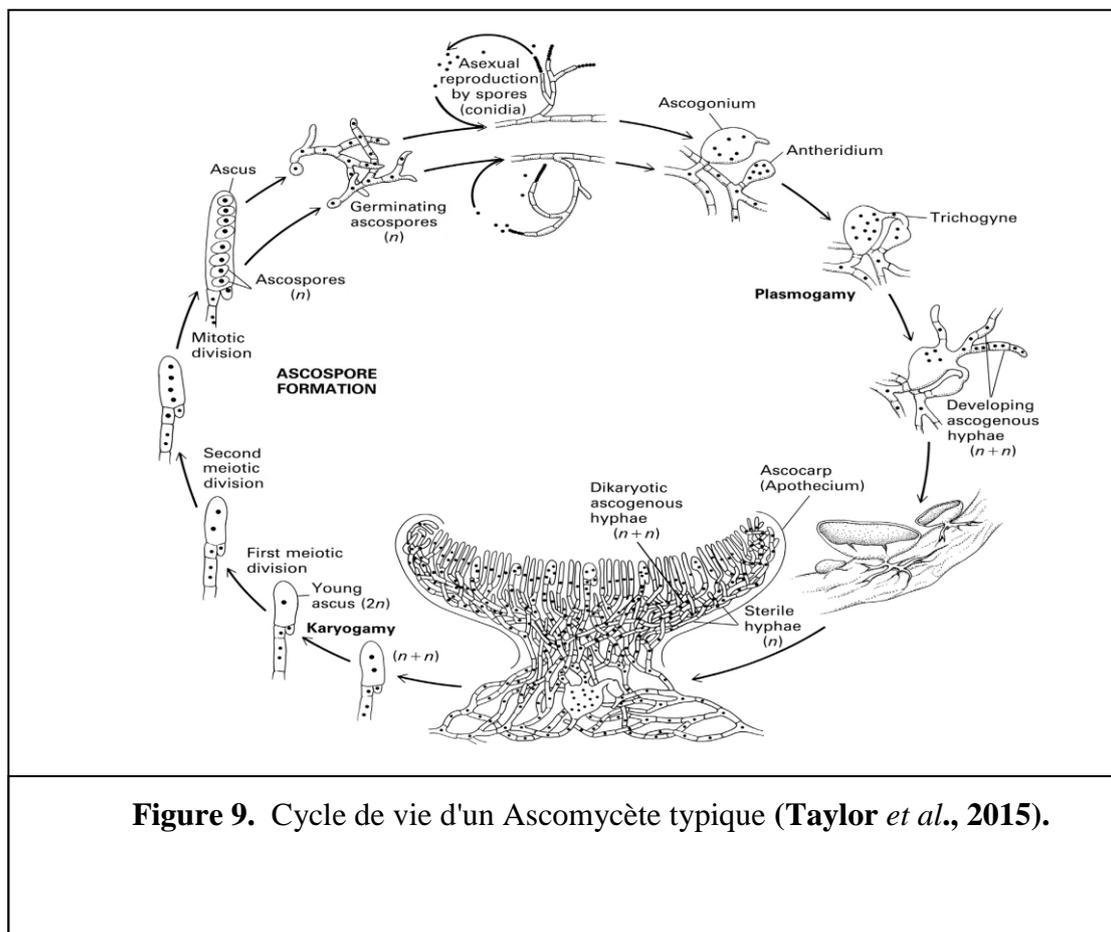
Chapitre II :
Généralités sur le
champignon

1. Les Ascomycètes

1.1. Définition

Les ascomycètes constituent la division Ascomycota, la plus importante, au sein du règne Fungi. Ce sont des champignons à mycélium qui produisent des ascospores endogènes. Ils peuvent être unicellulaires et thallophytes. Les hyphes des ascomycètes sont typiquement septées, avec des pores septaux qui fournissent une continuité à travers l'hyphe. De chaque côté du septum se trouvent des membranes de forme sphérique à hexagonale (Taylor *et al.*, 2015), la figure ci dessous (Figure 9) montre les différents étapes de cycle de vie des ascomycètes.

Certains ont des effets néfastes, tels que les maladies bien connues de l'orme hollandais et du châtaignier en Amérique du Nord .Il existe également des ascomycètes qui ont une interaction plus "positive" avec l'homme et en pathologie, comme *Penicillium*, *Aspergillus*, la levure de boulangerie et les truffes (pas celles au chocolat) (Taylor *et al.*, 2015).



1.2. Reproduction

Au milieu du siècle dernier ; De Bary et ses élèves ont reconnu qu'avant la formation des spores, un filament spécial apparaît, fusionne avec un autre, se ramifie et à l'extrémité donne naissance à des asques. (**Fraser, 1907**). En revanche, la reproduction sexuelle chez les ascomycètes filamenteux est un processus de développement plus complexe que chez les levures unicellulaires, qui nécessite la reconnaissance du soi et du non soi entre les cellules de types d'accouplement opposées ; la cellule femelle a un hyphe spécialisé « le trichogyne », alors que la cellule male est une cellule hyphale. La fécondation s'effectue quand le noyau de la cellule male pénètre dans le trichogyne, la caryogamie se produit entre les deux noyaux opposés haploïdes pour donner une cellule diploïde (Zygote). Le noyau fusionné est la seule cellule diploïde dans le cycle de vie et ne l'est que brièvement avant que la cellule ne se différencie en un méiocyte et que la méiose n'ait lieu, dans cette reproduction, une mitose suit généralement la méiose, et l'ascus mûr contient donc huit spores, deux fois le nombre typique des levures (**Richard & Turgeon, 2016**).

La reproduction peut être de deux types : asexuée par spores exogènes (conidies ou conidiospores) et sexuée par spores endogènes (ascospores), elles portent leurs spores sexuelles (ascospores) à l'intérieur d'une enveloppe appelée asci, qui est généralement cylindrique (**Volk, 2013**).

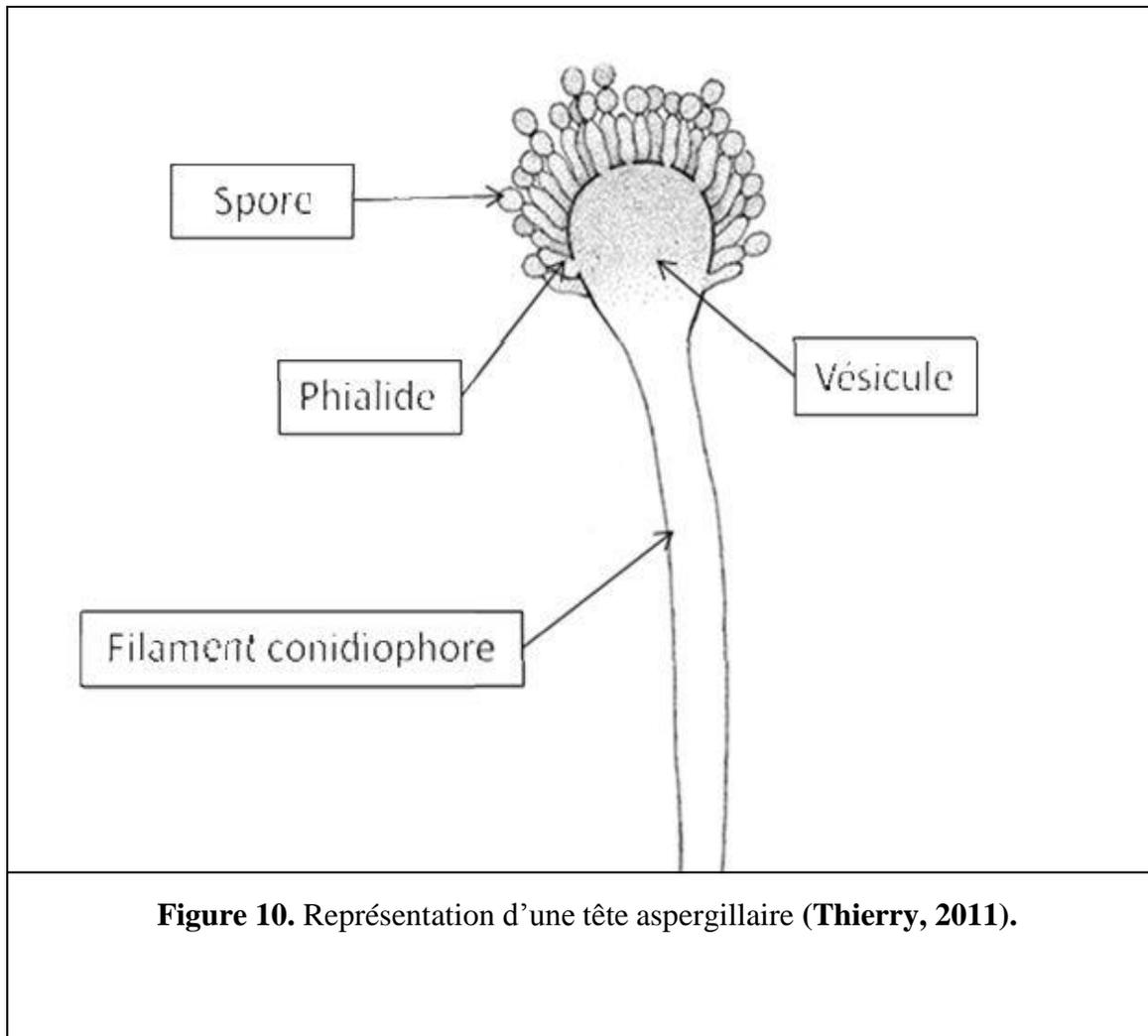
2. Aspergillus

2.1. Généralités

Les aspergillus sont des saprophytes qui se développent généralement sur des matériaux végétaux en décomposition. (**McCormick et al., 2010**). Aussi font partie des moisissures ubiquités dont les spores se propagent par voie aérienne, pour cela *Aspergillus* est la première étiologie des mycoses respiratoires d'où l'infection à augmenter chez les patients immunodéprimés (**Germaud, 2005**).

Les spores reproductives, appelées conidies, sont petites de tailles avec un aspect hydrophobe et produites en très grand nombre, elles restent en suspension dans l'air, après leurs libérations. Ces derniers peuvent rester viables pendant des mois. Leur développement commence par le gonflement des conidies dans les heures qui suivent leur arrivée dans un environnement permissif et suivi de la germination et l'élongation ultérieure des hyphes. (**Park & Mehrad, 2009**).

Morphologiquement *Aspergillus* est caractérisé par des filaments mycéliens septés et ramifiés, qui porte une tête ; cette dernière comporte un conidiospore qui au-dessus se trouve la vésicule sur laquelle les phialides et /ou métules se posent, les conidies apparaissent à partir des phialides (**Figure 10**).



Aspergillus ssp Se développe sur les milieux classiques de mycologie comme le milieu de Sabouraud. Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur gélose au malt ou sur milieu de Czapek qui constituent les milieux de référence pour ces champignons. Après 24 à 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures, selon les espèces) que les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune, ou noire selon les espèces. Enfin, les *Aspergillus ssp* Pousent à 22-25°C et à 37°C pour les espèces thermophiles (**Fillaux, 2013**).

2.2. *Aspergillus fumigatus*

2.2.1. Habitat

Espèce le plus souvent isolée chez les patients et responsable de 90 % des observations d'aspergillose invasive (AI), elle est retrouvée aussi bien dans les régions chaudes que froides du globe. Sa bonne tolérance aux températures élevées explique son abondance dans les composts et autres matières organiques dans lesquelles interviennent des phénomènes de décomposition avec élévation thermique (silos à grains, foin en balles, bagasse) (**Anderson et al., 1996 ;Morin,2003**).

2.2.2. Taxonomie

Le genre *Aspergillus* est maintenant attribué à la famille Trichocomaceae de l'ordre Eurotiales dans la classe Plectinomycetes du phylum Ascomycota, Actuellement, les espèces du genre *Aspergillus* sont taxonomiquement placées dans des sous-genres bien caractérisés, à savoir. *Aspergillus fumigatus* qui appartient à la section Fumigati du sous-genre Fumigati, (**Gugnani, 2003**). La délimitation des espèces au sein de la section Fumigati repose sur une approche polyphasique ; Sur la base de cette approche, (**Yaguchi et al., 2007**) ont proposé une subdivision de la section Fumigati en cinq classes parmi eux *Aspergillus fumigatus*. Depuis 2012, les taxonomistes recommandent d'appliquer une nomenclature à nom unique en conservant le nom d'*Aspergillus* pour toutes les espèces de ce genre (**Lamoth ,2016**). Le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) représente la taxonomie du genre *Aspergillus fumigatus*.

Tableau 5. Taxonomie du genre *Aspergillus fumigatus*.

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>fumigatus</i>

2.2.3. Caractères morphologiques

➤ Les Caractères macroscopiques

Les isolats de *A. fumigatus* ont été identifiés macroscopiquement sur la base des éléments suivants : la couleur et la texture des colonies, en général sont des colonies veloutées de couleur bleu-vert ou turquoise foncée ou gris-bleu ou grise (Zulkifli & Zakaria, 2017 ; Afzal *et al.*, 2013), et la taille des colonies , ces propriétés dépendent du milieu de culture utilisé.

Par exemple sur le milieu Czapek dox les colonies sont d'une pigmentation bleu-vert comme le montre la figure ci- dessous (Figure 11).

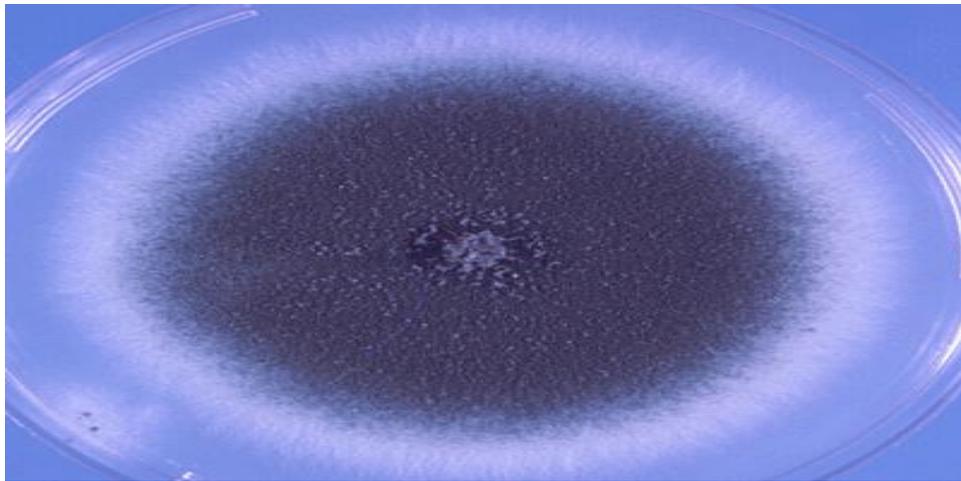


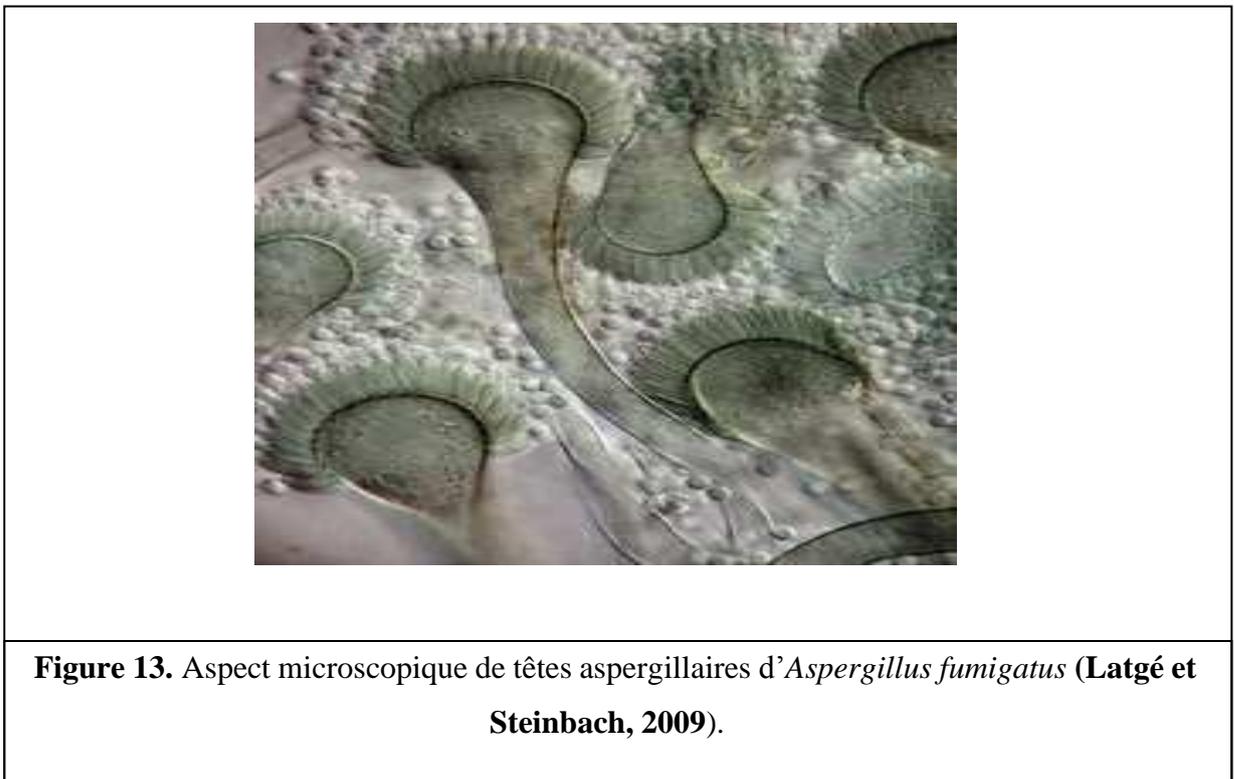
Figure 11. Colonies d'*A.fumigatus* présentant une pigmentation de surface bleu-vert typique sur une gélose Czapek (adapté de <https://mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Sep08.html#page-top>).

- Colonies sur CYA37 (Annexe 1) veloutées de couleur bleu-vert ou turquoise foncée et une croissance rapide (Zulkifli & Zakaria, 2017), (Figure 12).
- Colonies sur CZA (Annexe 1) atteignant 60 mm après sept jours à 25 °C. Colonie de couleur grise, hyaline inversée (Afzal *et al.*, 2013), (Figure 12).
- Colonies sur MEA (Annexe 1) atteignant 75 mm après sept jours à 25 °C. Couleur de la colonie gris bleu, colonie hyaline inversée (Afzal *et al.*, 2013), (Figure 12).



➤ Les Caractères microscopiques

L'observation microscopique aide à visualiser les différents constituants morphologiques du champignon tel que ; le conidiophore, phialides metule ... etc (Figure 13, 14).



-Têtes conidiennes sur CYA37 (Annexe 1) unisériées et des phialides parallèles incurvées dans un arrangement conidien (Zulkifli & Zakaria, 2017).

-Têtes conidiennes sur CZA (Annexe 1) colonnaires, 100 - 200 μ de long et 50 - 60 μ de large. Conidiophore en hyalin, 150 - 300 μ de long et 3 - 5 μ de large. Vésicule de forme ovale à flasque de 15 - 25 μ de diamètre. Sterigmata uniseriates, Phialides ampuliformes, 4 - 6 μ de

long sur 2 - 3 μ de large conidies globuleuses à prolates, 1,5 - 2,5 μ de diamètre (Afzal *et al.*, 2013).

-Têtes conidiennes sur MEA (Annexe 1) colonnaires, 200 - 300 μ de long et 50 - 60 μ de large, conidiophore hyalin, 200 - 325 μ de long et 3 - 5 μ de large, vésicule de forme ovale à flasque de 15 - 20 μ de diamètre, sterigmata uniseriats, phialides ampuliformes, 4 - 7 μ de long sur 2 - 3 μ de large, conidies globuleuses à prolates, 2 -3 μ de diamètre (Afzal *et al.*, 2013).

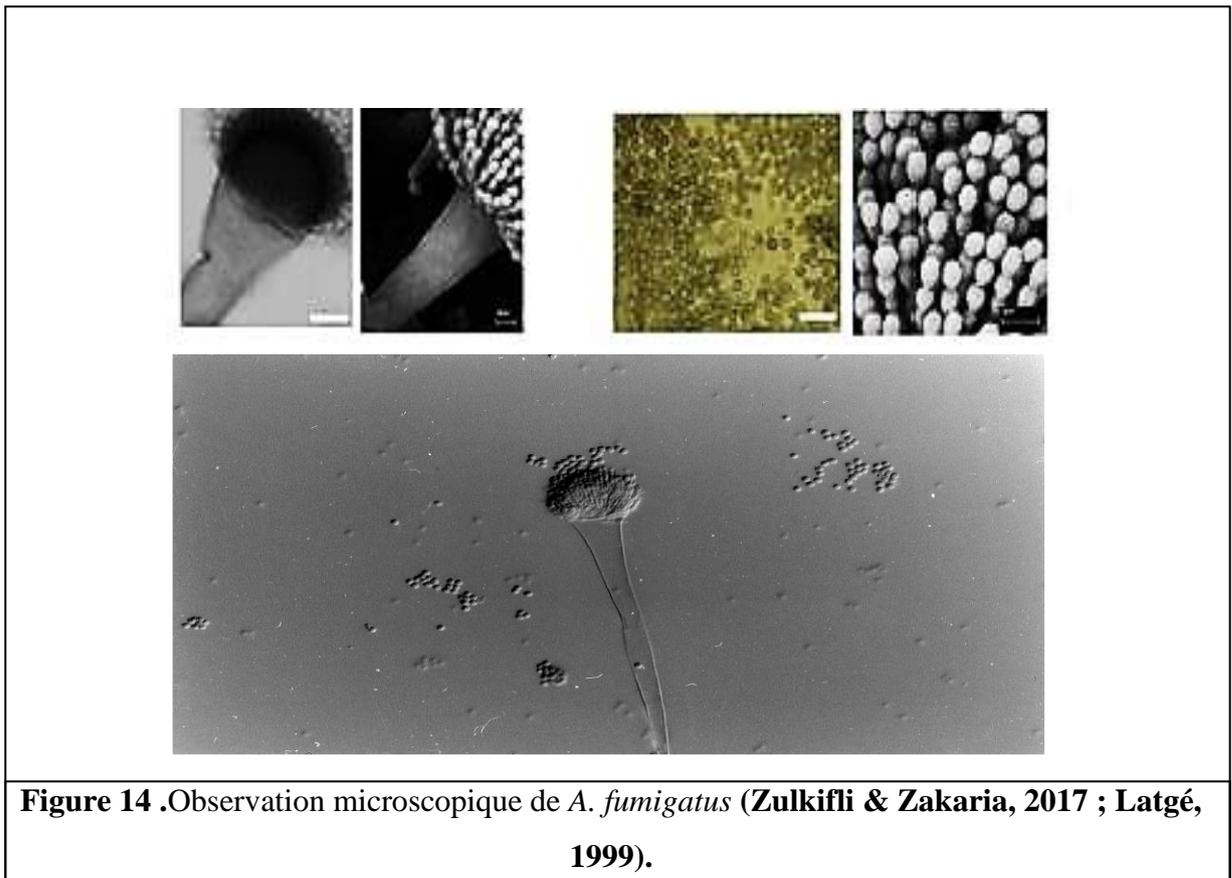
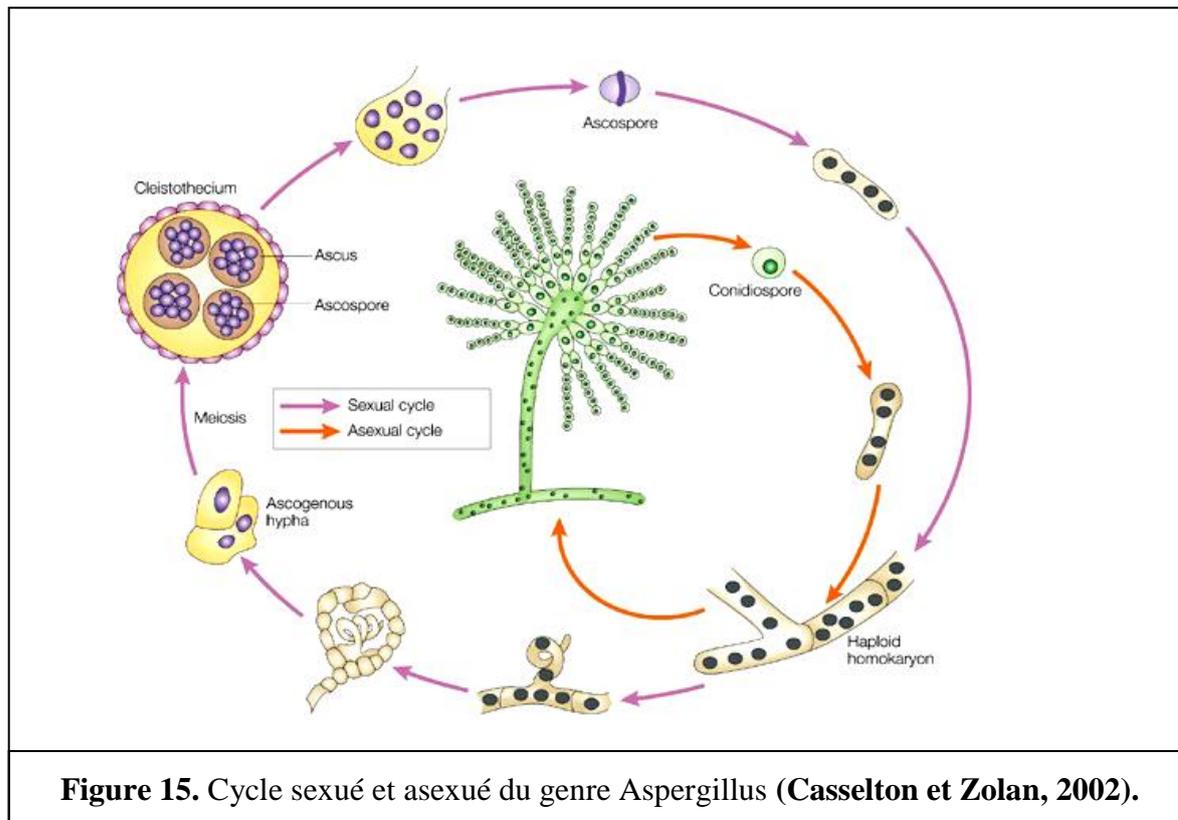


Figure 14 .Observation microscopique de *A. fumigatus* (Zulkifli & Zakaria, 2017 ; Latgé, 1999).

2.2.4.Systématique

Aspergillus fumigatus est considéré comme une espèce qui se produit que par voie asexuée ; alors des preuves ont montré qu'ils ont une reproduction sexuée (Dyer & Paoletti, 2005). Dans le genre aspergillus, seulement quelques espèces ont été classifiées comme ayant un cycle de reproduction sexuée parmi eux *Aspergillus fumigatus* (Kwon-Chung & Sugui, 2009). Cette reproduction nécessite deux cellules opposées de types MAT1-1 et MAT1-2 (O'Gorman *et al.*, 2008) .Les ascospores, produites par méiose des spores sexuelles fusionnées, qui sont enfermées dans des fructifications sexuelles appelées cléistothèces

(Sugui *et al.*, 2014). Par contre dans La reproduction asexuée se termine par la production de conidies haploïdes (Figure 15).



2.2.5. Métabolisme secondaire

A.fumigatus produit des métabolites secondaires toxiques dont le mieux étudié est la gliotoxine. Ce composé très actif possède un pouvoir d'immunosuppression en réduisant la phagocytose des macrophages et des polynucléaires (Müllbacher *et al.*, 1985). L'acide phtioïque produit en petite quantité par un nombre restreint de souches pourrait contribuer à la formation de granulome (Denning, 1998). Une hémolysine thermolabile est présente dans les extraits cytoplasmiques comme dans le filtrat de culture d'*A.fumigatus* (Ebina *et al.*, 1994).

Les recherches réalisées sur l'*A. fumigatus* ont révélé la présence d'autres métabolites secondaires, y compris des protéines telles que les hydrophobines, les tryptophanes et les lectines. En outre, d'autres enzymes ont été signalées, en particulier des enzymes extracellulaires, des P-galactosidases, et une sérine protéase, cette dernière étant capable de dégrader les principaux composants des membranes basales de l'hôte (Piechu *et al.*, 1990 ; Frisvad *et al.*, 2009).

2.2.6. Toxicité et pouvoir pathogène

Aspergillus, champignon filamenteux omniprésent dans la nature. Joue un rôle important dans la dégradation de la matière organique. Environ 10 à 20 % des espèces sont considérées comme pathogènes ou comme ayant d'autres effets néfastes. L'espèce la plus importante des *aspergillus* pathogènes est *Aspergillus fumigatus*. La principale voie d'infection causée par *A. fumigatus* est l'inhalation de conidies (Thywißen *et al.*, 2011). Il cause 90 % des aspergilloses invasives (IA) (Abad *et al.*, 2010), l'infection fongique invasive (IFI) représente un déterminant de la morbidité et la létalité chez les patients immunodéprimés (Rambach *et al.*, 2015). Les conidies non pigmentées d'*A. fumigatus* ont été tuées plus efficacement par les macrophages (Heinekamp *et al.*, 2013). Ce champignon provoque des dommages et des thromboses induites par l'inflammation (Rambach *et al.*, 2015). Autres caractéristiques de *A. fumigatus* ; connue comme agent de l'aspergillose pulmonaire chez l'homme, et comme agent d'avortement chez les animaux . Pour cela il faut approfondir les connaissances sur la réaction immunitaire antifongique sont un besoin urgent pour découvrir de nouvelles approches thérapeutiques pour l'aspergillose invasive (IA) (Rambach *et al.*, 2015).

Chapitre III

Matériel et Méthodes

1. Souche ascomycétale

Afin de décrire la spécificité d'une lectine envers les glycoconjugués contenant de l'acide sialique. Une lectine provenant de champignon pathogène pour l'homme est étudiée.

L'implication de l'acide sialique dans la biologie fongique a été plus étudiée chez la souche des ascomycètes *Aspergillus fumigatus* ; grâce à ses propriétés elle a été choisie pour la réalisation de cette étude.

2. Fermentation

A.fumigatus est cultivée sur gélose extrait de levure -peptone -dextrose à une température de 37 °C. Après 5 jours d'incubation (**Figure 16**) le mycélium aérien est gratté dans l'eau distillé stérile pour libérer les conidies.

La suspension formée est filtrée par un filtre en nylon de 25 et 10 µm de porosité ; la suspension conidienne à son tour est centrifugée (1200 g, 3 minutes), et remise en suspension dans l'eau stérile à une absorbance de 620 nm ajustée à 0,6 (environ 10⁸ conidies / ml).

Des aliquotes de 1,5 ml de la suspension conidienne ont été déposées dans des boîtes de pétri contenant 15 ml de milieu 199 (sigma) à pH 7,6 ensuite incubés à 37°C. Les éléments fongiques ont été centrifugés et mise en suspension dans une solution saline au phosphate (PBS) (0,15 M, pH 7,2).

Pour le pré culture : des flacons de (2 litres) contenant 1 litre de milieu (YPD) (**Annexe 1**) ont été inoculés avec environ 10⁷ conidies par ml et incubées pendant 5 jours à 37 ° C. Le mycélium a été récolté par filtration, lavé avec du PBS et brièvement pressé à sec (**Tronchin et al., 2002**).



Figure 16. *A.fumigatus* après 5 jours d'incubation sur la gélose extrait de levure-dextrose-peptone (YPD) (Caitlin *et al.*, 2020).

3. Préparation des érythrocytes

Le sang du lapin a été collecté dans des tubes contenant de l'EDTA (**Annexe 4**) pour la mise en évidence de la présence des lectines dans l'extrait fongique.

Le lavage des hématies a pour but de séparer les hématies du plasma ainsi pour l'élimination des immunoglobulines.

Une première centrifugation est préalablement réalisée à 3000 g pendant 5 minutes à 4 °C, le surnageant résultant est éliminé.

L'échantillon est préparé selon une série de lavage ; 3 lavages à la solution PBS contenant 10 mM d'EDTA, ensuite 2 autres lavages avec 20 volumes de tampon phosphate 75 mM (pH 7,2) contenant 75 mM de NaCl (**Tronchin *et al.*, 2002**).

Les érythrocytes ont ensuite été remis en suspension dans du PBS sous forme d'une suspension à 10% (vol / vol), fixés avec du formaldéhyde à 3% dans un tampon phosphate pendant 18 h à 37 ° C, lavés abondamment dans du PBS et stockés à 4 ° C jusqu'à utilisation (**Tronchin *et al.*, 2002**).

4. Préparation des extraits fongiques

4.1. Principe

Cette opération est réalisée afin de récupérer des substances hydrosolubles à partir d'une poudre mycélienne d'une souche fongique pathogène *A.fumigatus* dans une solution appropriée.

4.2. Technique

Des extraits fongiques ont été préparés à partir des différentes phases morphologiques du champignon (conidies au repos ou gonflées, tubes germinatifs et mycélium), et deux procédures d'extraction distinctes ont été utilisées : broyage dans l'azote liquide et l'extraction par sonication (**Tronchin et al., 2002**).

4.2.1. Broyage dans l'azote liquide

Les éléments fongiques ont été broyés dans un mortier avec de l'azote liquide. La poudre mycélienne congelée a été remise en suspension dans un volume égal de PBS et centrifugée à 50 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant a été recueilli et est ci-après appelé extrait fongique I (**Figure 17**).

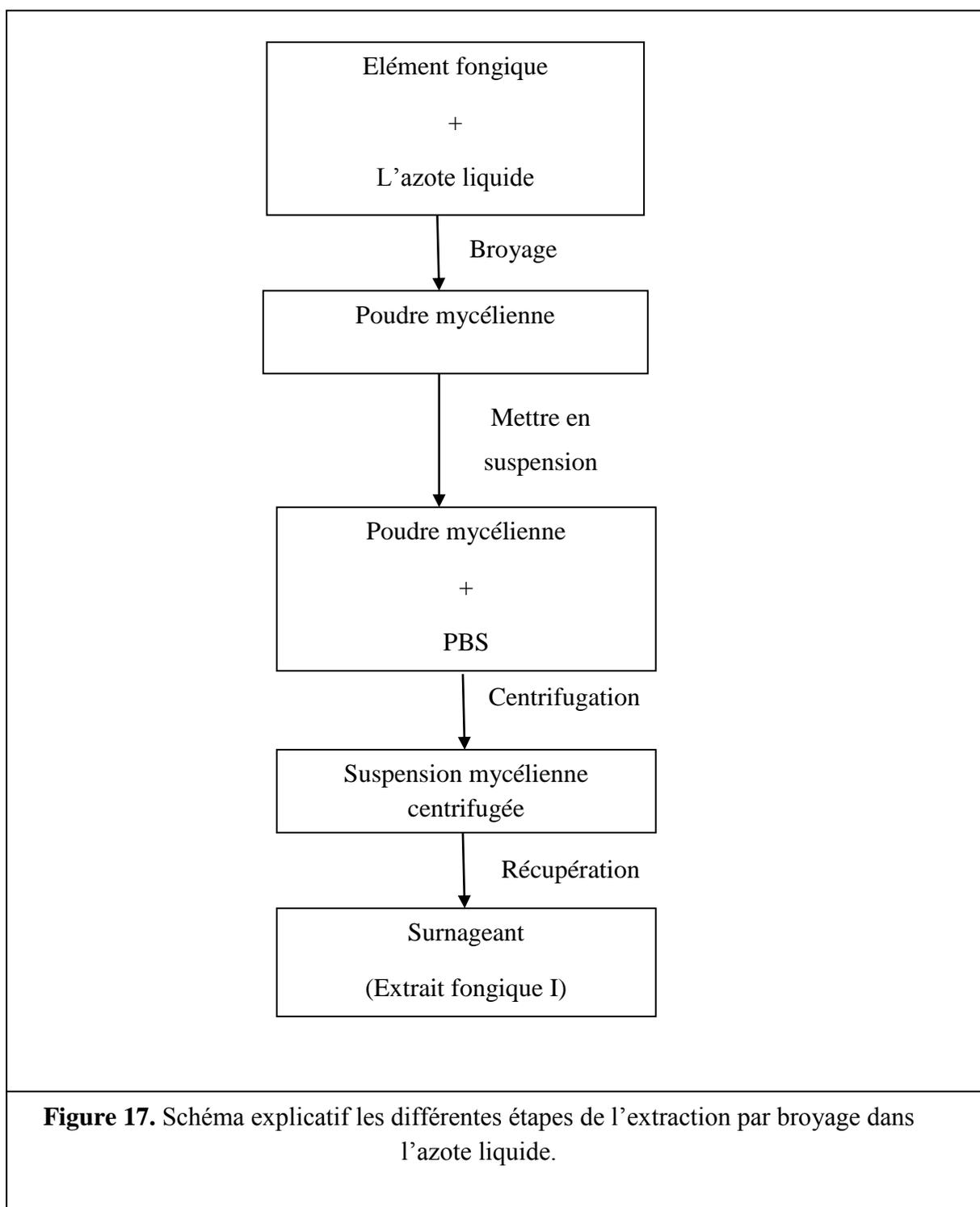
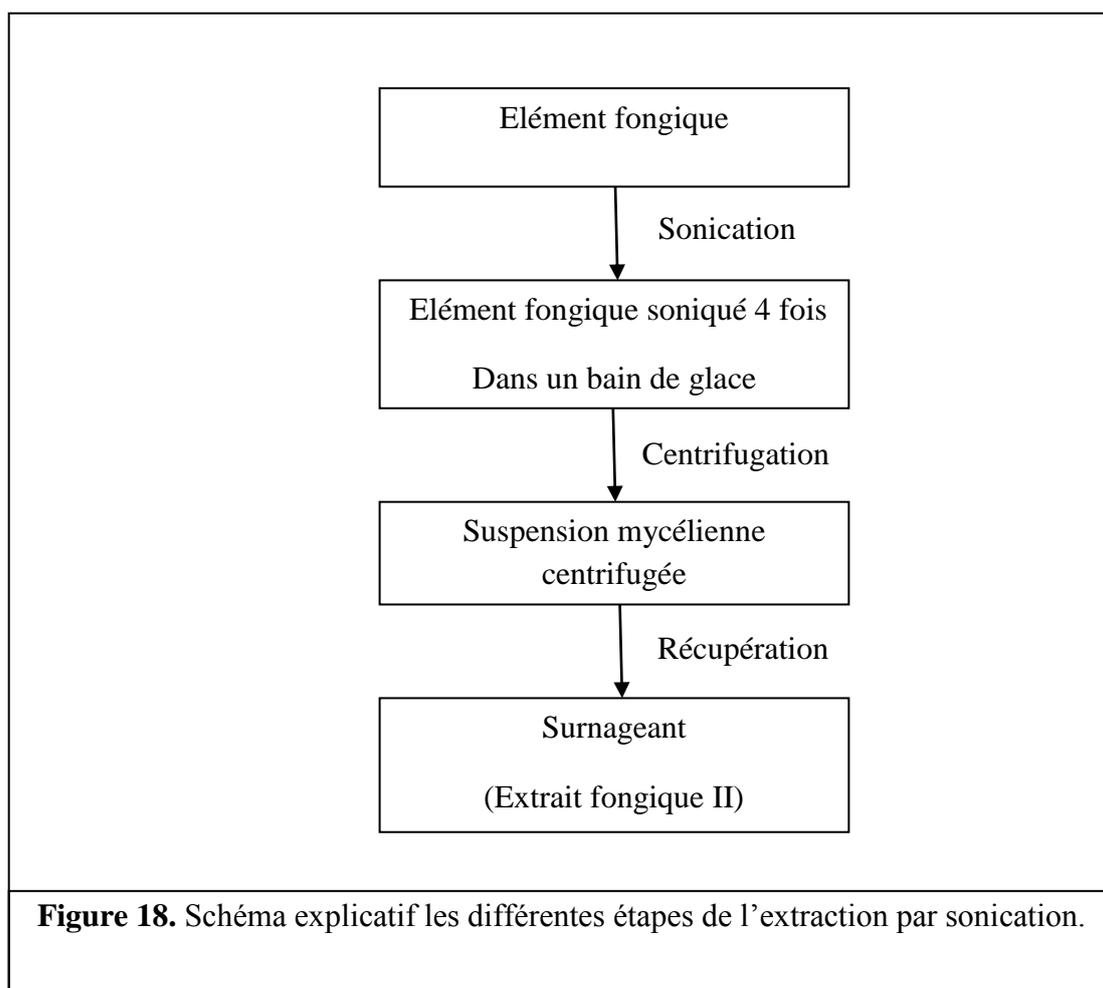


Figure 17. Schéma explicatif les différentes étapes de l'extraction par broyage dans l'azote liquide.

4.2.2. L'extraction par sonication

Les éléments fongiques ont été soniqués quatre fois à 200 W pendant 30 s (Sonifier Cell Disruptor ; Branson Ultrasonics Co.) dans un bain de glace. Après centrifugation à 50000 g pendant 30 min, le surnageant a été recueilli et est ci-après dénommé extrait fongique II (**Figure 18**).



La concentration protéique de chaque extrait a été déterminée par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**) (**Annexe 2**) avec de l'albumine de sérum bovin comme standard.

Dans certains cas, des extraits fongiques ont été incubés avec 0,2 M de 2-mercaptoéthanol ou 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) pendant 30 min à 37 ° C avant le test d'hémagglutination.

5. Test d'hémagglutination

Le test d'hémagglutination est une méthode simple et facile pour obtenir des données semi-quantitative sur la liaison au sucre et la spécificité d'une lectine (**Hirabayashi, 2014**).

Des érythrocytes de lapin ont été utilisés pour la détermination de l'activité d'hémagglutination pendant les procédures d'isolement et pour les tests d'inhibition. Cinquante microlitres de dilutions doubles en série des extraits fongiques ont été mélangés avec un volume égal d'une suspension d'érythrocytes à 1% dans des puits de plaques de microtitrage en forme de U. Après une légère agitation, on a laissé les plaques se déposer à température ambiante pendant 1 h et l'agglutination a été enregistrée visuellement. Le PBS a été utilisé comme contrôle négatif (**Tronchin et al., 2002**).

6. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Une lectine active agglutine les érythrocytes en reconnaissant un glucide à la surface des cellules et en formant un réseau réticulé en suspension. En diluant en série la lectine dans une plaque de microtitration à 96 puits en ajoutant une quantité constante d'érythrocytes, l'activité de la lectine peut être estimée (**Hirabayashi, 2014**).

Les tests d'inhibition de l'hémagglutination ont été réalisés en mélangeant 25 ul d'une dilution appropriée de l'extrait fongique (correspondant à 4 HAU) dans des plaques de microtitrage avec un volume égal de dilutions en série au double d'inhibiteurs potentiels. Après 30 min d'incubation à température ambiante, 50 ul d'une suspension d'érythrocytes à 1% ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été laissées à décanter à température ambiante pendant 1 h. Les contrôles contenaient 25 ul de PBS au lieu de la solution d'inhibiteur.

Des glucides (solutions mères à 400 mM dans PBS) et glycoprotéines (solutions mères à 10 mg / ml dans PBS), ont été testés comme inhibiteurs (**Tronchin et al., 2002**) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Les glucides et les glycoprotéines utilisés comme inhibiteurs.

Les glucides inhibiteurs	Les glycoprotéines inhibitrices
D- glucose	Acide <i>N</i> -acétyl-neuraminique (NANA)
D –galactose	acide colominique
D –mannose	thyroglobuline bovine
D –fructose	fibrinogène humain
D – fucose	fétuine bovine
L –fucose	mucine sous-maxillaire bovine
L –rhamnose	asialomucine bovine
D –glucosamine	orosomucoïde humain
D -galactosamine	La mucine bovine
<i>N</i> -acétyl- D -glucosamine	/
<i>N</i> -acétyl- D -galactosamine	/
D- tréhalose	/
D –lactose	/
D –mélibiose	/
D – maltose	/
D –saccharose	/

La mucine bovine a été utilisée après hydrolyse de ses groupements O-acétylés (**Ravindranath *et al.*, 1985**).

7. Procédures de purification

Dans cette étude, notre objectif est de récupérer une lectine à partir d'une solution liquide et de caractériser son activité.

Dans la section suivante, nous intéressons aux trois principales méthodes, utilisées pour la purification et la concentration des lectines : le fractionnement par filtration sur gel, la chromatographie échangeuse d'ions, la chromatographie d'interaction hydrophobe, et l'électrophorèse pour l'analyse.

7.1. Fractionnement par filtration sur gel

Pour cette chromatographie, les lectines ont été séparées selon leur taille sur une phase stationnaire constituée des billes poreuses, dont l'élution a été réalisée par un tampon (phase liquide).

En fonction du diamètre des pores, les petites protéines pourront passer à travers ces billes ou au contraire si elles sont trop grosses seront exclues de ce réseau.

L'extrait fongique I a été appliqué sur une colonne de filtration sur gel Highload Superdex TM 75 (60 x 1,6 cm ; Pharmacia) préalablement équilibrée avec du PBS. L'élution a été réalisée à température ambiante. Des fractions de 4 ml ont été recueillies à un débit de 1 ml / min. Ils ont été contrôlés pour la teneur en protéines à 280 nm et pour l'activité d'hémagglutination comme décrit précédemment. Les fractions réactives ont été rassemblées et du sulfate d'ammonium a été ajouté à une saturation de 80%. Après 1 h d'incubation à 4 ° C, le précipité a été recueilli par centrifugation, dissous dans 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,5) et dialysé contre le même tampon pendant 48 h (Tronchin *et al.*, 2002).

7.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Cette technique a pour but de purifier la lectine, sur une colonne Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), ensuite l'élution a été réalisée avec le même tampon à un débit de 1 ml / min par une augmentation progressive de la concentration de NaCl (25 mM à 3 M). Ce tampon diluant augmente progressivement le pH de la colonne jusqu'à atteindre pH colonne = pHi de la protéine, afin d'éluer la protéine d'intérêt (lectine). Des fractions de 4 ml ont été recueillies et vérifiées par spectrophotomètre pour l'activité d'hémagglutination (Tronchin *et al.*, 2002).

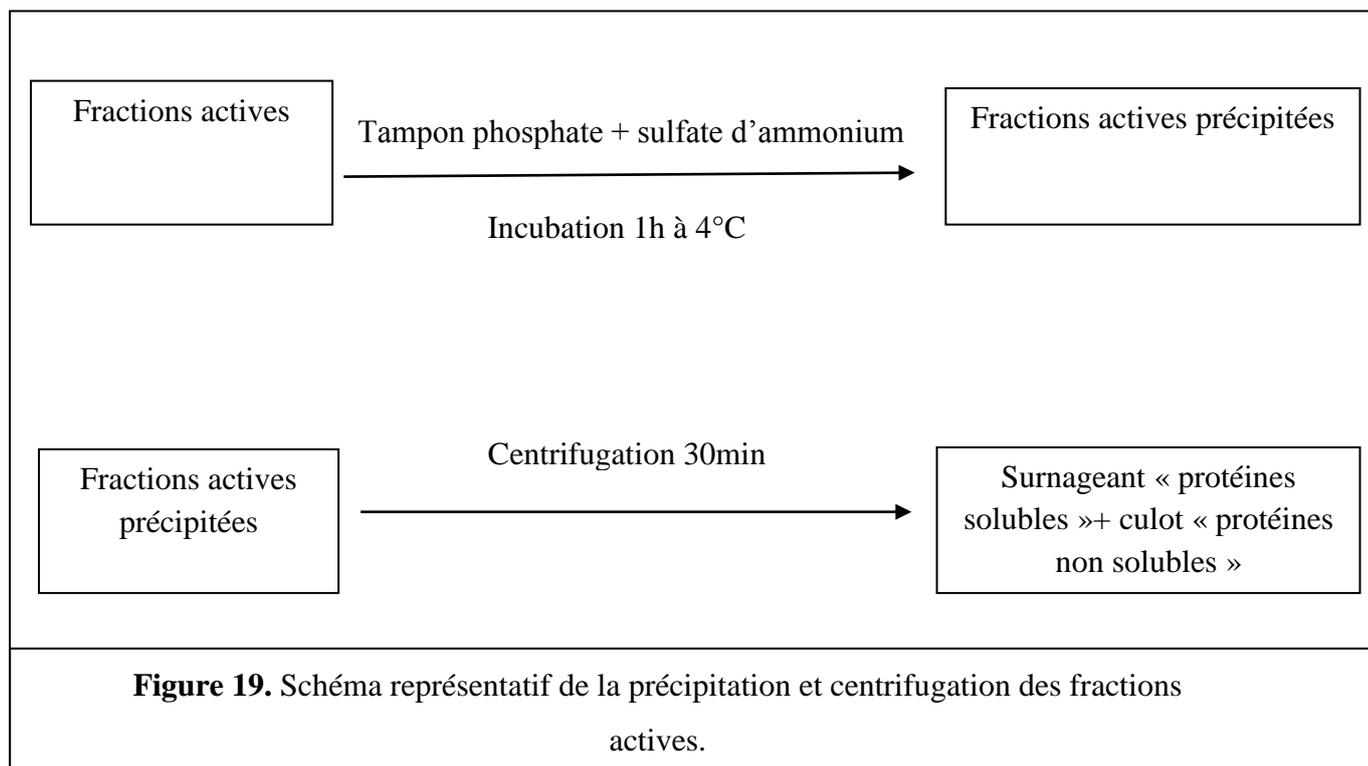
Les fractions de lectines positives ont été regroupées et dialysées contre une solution saline tamponnée au phosphate (0,1 M ; pH 7,2) en utilisant un tube de dialyse de peau de serpent (MWCO 10 kDa; Pierce Biotech, USA) (Boulahrouf, 2016).

7.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe

La chromatographie hydrophobe d'interaction (HIC) est une technique puissante utilisée pour la purification, la séparation et l'épuration des molécules de protéine sur la base de leur hydrophobicité, cette technique est moins dénaturante et les protéines seront récupérer à l'état natif.

La HIC est constituée d'une colonne chargée par une résine hydrophobe, cette hydrophobie peut interagir avec la surface hydrophobe de la protéine. Peu de protéines sont solubles uniquement dans l'eau et la plupart nécessitent au moins une petite concentration de sel pour rester repliées et stables. Lorsque la concentration en sel augmente, la surface de la protéine devient chargée, les molécules de protéines s'agrègent (**Duong & Gabelli, 2014**). Le sel a comme rôle ; faire disparaître le groupe hydrophobe ou bien ôter les molécules hydrophobes par l'ajout d'eau.

Pour cette chromatographie, les fractions actives ont été rassemblées et les protéines ont été précipitées par addition lente d'un volume égal d'un tampon phosphate 50 mM contenant 2,8 M de sulfate d'ammonium. Après 1 h d'incubation à 4 ° C. Une centrifugation à 17 000 g pendant 30 min est effectuée pour récupérer le surnageant qui contient les protéines solubles et élimine les résidus insolubles (**Figure 19**).



Le surnageant a ensuite été chargé sur une colonne de phényl-Superose HR 5/5 (Pharmacia) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate 50 mM contenant 1,4 M de sulfate d'ammonium. L'éluion a été réalisée à un débit de 0,5 ml / min par une diminution par étapes de la concentration en sulfate d'ammonium jusqu'à ce qu'une concentration de 0,1 M soit atteinte.

Le matériau lié résiduel a ensuite été élué en utilisant successivement un tampon phosphate 150 mM, 20% d'éthanol et de l'eau distillée. Des fractions de 4 ml ont été collectées, dialysées et vérifiées par spectrophotomètre pour l'activité d'hémagglutination (Tronchin *et al.*, 2002).

8. Electrophorèse

C'est une technique utilisée pour la séparation des acides nucléiques et des protéines chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. La séparation est effectuée en fonction de la taille, la charge et la forme de la molécule. Nous décrivons ici une technique sensible pour la détection des glycoprotéines séparées par électrophorèse sur gel de sodium dodécyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE).

Après chaque étape de purification, une aliquote des fractions présentant l'activité d'héماغglutination a été précipitée avec de l'acide trichloroacétique à 10% et analysée par électrophorèse sur gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) (12% d'acrylamide) selon la méthode de Laemmli (**Laemmli, 1970**) (**Annexe 3**). Les gels ont été colorés avec du bleu brillant de Coomassie R 25. La pureté de la lectine a été confirmée par coloration à l'argent. Les masses moléculaires des standards protéiques ont été déterminées avec un kit d'étalonnage d'électrophorèse de faible masse moléculaire (Pharmacia) (**Tronchin et al., 2002**).

Chapitre IV

Résultats et

Discussion

Résultats

1. Activité d'hémagglutination spécifique des extraits fongiques

La présence d'une lectine dans les extraits bruts préparés à partir de conidies au repos ou gonflées, de tubes germinatifs et de mycélium de la souche CBS 113.26 a été détectée par des tests d'hémagglutination avec des érythrocytes de lapin. L'activité lectine a été récupérée dans tous les extraits, quelle que soit la procédure d'extraction utilisée (**Tableau 7**).

Cependant, les extraits de conidies au repos ont présenté l'activité d'hémagglutination spécifique la plus élevée. Ensuite, une diminution de l'activité d'hémagglutination a été observée au fur et à mesure de la germination, l'activité la plus faible étant observée dans les tubes germinatifs et dans le mycélium de 5 jours (**Tronchin et al., 2002**).

Tableau 7. Activité d'hémagglutination des différents stades morphologiques d'*Aspergillus fumigatus* (**Tronchin et al., 2002**).

Stade morphologique	Extrait fongique	Concentration en protéine ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Activité d'hémagglutination (HAU / ml)	Activité spectrophotométrique (HAU / μg)
conidie au repos	I	27,5	800	29,1
	II	9,6	800	83,4
	I	26,6	400	15

Conidie gonflée				
	II	35,5	400	11,3
Tube germinatif	I	284,4	400	1,4
	II	50,9	400	7,9
Mycélium	I	194,8	800	4,1
	II	666,6	850	1,3

- L'activité spécifique (HAU/ 10^3 μg) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction (10^3 $\mu\text{g/ml}$).

L'activité spectrophotométrique révèle la présence des protéines dans les extraits fongiques, ce qui signifie le bon cheminement du travail.

L'observation d'un taux de (HAU/ μg) élevé pour l'extrait fongique des conidies au repos ainsi que chez les conidies gonflées, ce taux diminue dans le stade germinatif et mycélien.

L'efficacité de l'extraction de l'hémagglutinine dépendait du stade morphologique. Dans les conidies au repos, les meilleurs résultats ont été obtenus par sonication, alors que le broyage à l'azote liquide était plus efficace pour le mycélium. Cependant, des tests préliminaires ont montré que la purification de l'hémagglutinine nécessitait des quantités importantes de matériel fongique. Par conséquent, un homogénat de mycélium congelé (extrait fongique I) a été utilisé partout pour des expériences ultérieures (Tronchin *et al.*, 2002).

2. Inhibition de l'hémagglutination par divers glucides et glycoconjugués

Divers sucres et glycoconjugués ont été testés pour leurs capacités à inhiber l'agglutination des érythrocytes de lapin par la lectine.

Le glucose, le galactose, le mannose, le fructose, le fucose, le rhamnose, la glucosamine, la galactosamine, la *N*-acétyl- D -glucosamine, la *N*-acétyl- D -galactosamine, le lactose, le mélibiose, le tréhalose et le saccharose, à la concentration la plus élevée utilisée, n'ont pas inhibé l'activité d'hémagglutination de l'extrait fongique I de la souche CBS 113.26.

À l'inverse, il a été inhibé par le NANA et les glycoprotéines riches en acide sialique, c'est-à-dire la mucine sous-maxillaire bovine, la thyroglobuline, le fibrinogène et la fétuine (**Tableau 8**). De plus, des résultats similaires ont été obtenus avec la souche $\Delta 18$ non productrice d'ALP (**Tronchin et al., 2002**).

Tableau 8. Résultats d'inhibition d'hémagglutination (**Tronchin et al., 2002**).

Sucres et glycoconjugués	Présence/absence d'inhibition
Glucose	-
Galactose	-
Mannose	-
Fructose	-
Rhamnose	-
Glucosamine	-
Galactosamine	-
<i>N</i> -acétyl- D -glucosamine	-
<i>N</i> -acétyl- D -galactosamine	-
Lactose	-
Mélibiose	-

Tréhalose	-
Saccharose	-
mucine sous-maxillaire bovine	+
Thyroglobuline	+
Fibrinogène	+
Fétuine	+

(-) : absence d'inhibition, (+) : présence d'inhibition

D'après les résultats qui ont été démontrés par (Tronchin *et al.*, 2002), Les sialoglycoprotéines testées étaient des inhibiteurs plus puissants que NANA, indiquant que la lectine présentait une affinité plus élevée pour les acides sialiques liés. Parmi eux, la mucine sous-maxillaire bovine, était l'inhibiteur le plus puissant (Tableau 9). Traitement de base spécifique à l'hydrolyse des groupes de l'O -acétyle des acides sialiques ont légèrement affecté le pouvoir inhibiteur de la mucine, tandis que sa désialylation induisait une forte réduction.

Pour la mucine bovine la concentration minimale requise pour une inhibition complète à 4 HAU était de 83 µg / ml.

Elle était de 2,5 mg / ml pour sa forme désialylée (Asialomucine). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la désialylation était incomplète (environ 90%, selon le fabricant).

L'Orosomucoïde n'a pas inhibé la lectine. Contrairement aux autres sialoglycoprotéines testées, elle ne contient que des chaînes glucidiques liées N-glycosidiquement.

L'acide colominique est un homopolymère [poly- α - (2,8) -NANA], n'avait aucun effet inhibiteur à la concentration de 10 mg / ml, indiquant que la lectine avait moins d'affinité envers l'acide sialique subterminal que les résidus terminaux.

Tableau 9. Inhibition de l'héماغglutination par NANA et les sialoglycoprotéines
(Tronchin *et al.*, 2002).

Inhibiteur	MIC (équivalent lié à NANA) <i>a</i>
NANA	25 mM
Mucine bovine	83 µg / ml (32 µM)
Mucine bovine traîée	166 µg / ml (66 µM)
Asialomucine	2,5 mg / ml (96 µM)
Thyroglobuline bovine	625 µg / ml (28 µM)
Fibrinogène humain	5 mg / ml (86 µM)
Fétuine bovine	666 µg / ml (86 µM)
Orosomucoïde humain	- <i>b</i>
Acide colominique	-

- (-) Une concentration équivalente de NANA lié évaluée sur la base des données de la littérature.
- (-*b*), absence d'inhibition à la concentration la plus élevée utilisée (10 mg / ml).

3. Purification de l'hémagglutinine

3.1. Fractionnement sur gel de filtration

L'extrait fongique brut a été appliqué sur une colonne de filtration sur gel. L'élution avec du PBS a donné quatre pics protéiques (Tronchin *et al.*, 2002) (Figure 20).

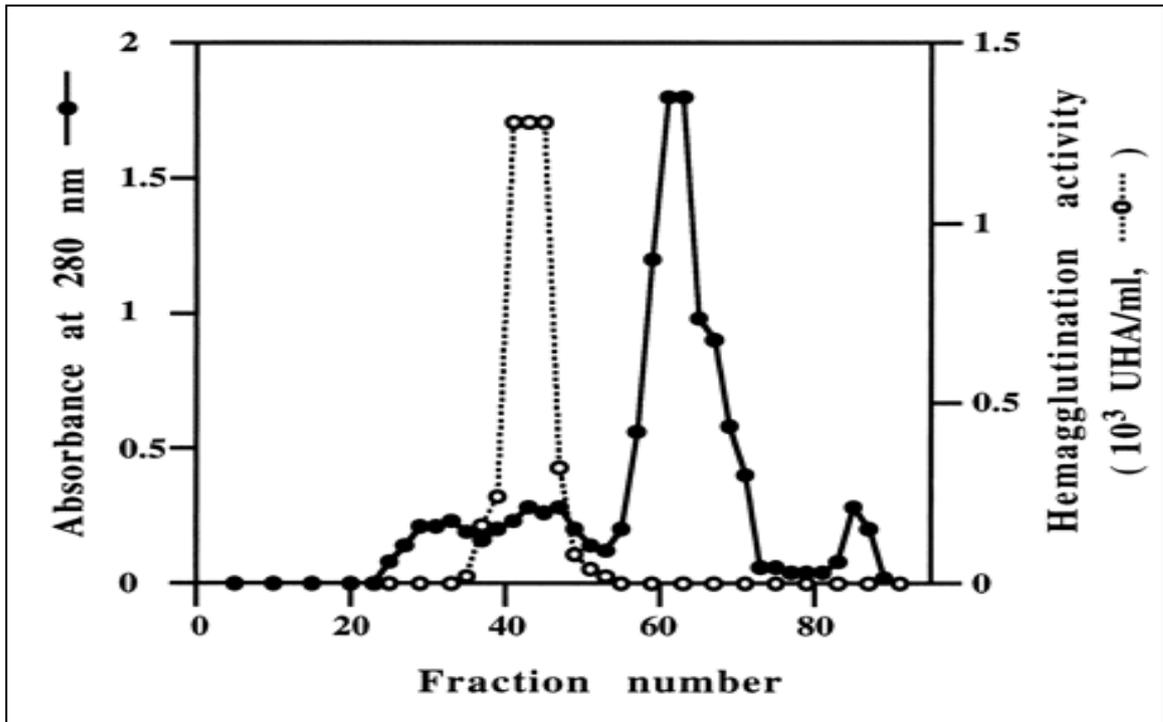


Figure 20. Profil protéique d'élution (●) et activité d'hémagglutination (○) à partir de la chromatographie par filtration sur gel (Tronchin *et al.*, 2002).

- **Le premier et les deux derniers pics représentés par (●) est celui de l'absorbance et les fractions**
 - dans les fractions 5 à 24 il y'a une absence d'absorbance.
 - dans les fractions 25 à 34, une faible absorbance qui ne dépasse pas les 0.25.
 - les fractions 35 à 45, une absorbance plus élevée vers 0.4.
 - les fractions 46 à 54, une faible absorbance est enregistrée.
 - les fractions 55 à 75, la forte absorbance est enregistrée d'une valeur 1.8.
 - les fractions 76 à 80, une absence d'absorbance.
 - les fractions + 80, une faible absorbance d'une valeur 0.3.
- **Le deuxième pic représenté par (○) correspond à l'activité d'hémagglutination**
 - Les fractions 5 à 34, une absence d'activité d'hémagglutination.

- Les fractions 35 à 45, une activité d'hémagglutination enregistrée d'une valeur de $1.4 * 10^3$ UHA/ml.
- Les fractions 46 à +80, pas d'activité d'hémagglutination.

La lectine d'intérêt a été trouvée dans l'intervalle [35-45] qu'est correspond à le pic 2 de l'activité de l'hémagglutination et le pic 1 de l'absorbance.

3.2. Chromatographie échangeuse d'ions

La lectine d'avantage a été purifiée par la chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne Mono Q HR 5/5. L'élution a été réalisée avec des concentrations croissantes de NaCl. L'activité d'hémagglutination a été trouvée dans les fractions correspondant à l'élution par 25, 50 et 75 mM de NaCl.

L'élution a été réalisée avec le tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,5) à un débit de 1 ml / min par une augmentation progressive de la concentration de NaCl (25 mM à 3 M) (**Tronchin et al., 2002**).

- La lectine d'intérêt a été trouvée dans l'intervalle [25mM- 3M] de NaCl.

3.3 Chromatographie d'interaction hydrophobe

La purification a été réalisée par Chromatographie d'interaction hydrophobe afin d'éluer la lectine d'intérêt, en utilisant un éluant avec de concentration décroissante par étapes de sulfate d'ammonium dans un tampon phosphate. L'activité lectine a été récupérée dans le pic d'élution correspondant au sulfate d'ammonium 0,1 M (**Tronchin et al., 2002**).

3.4 . L'électrophorèse

Afin de séparer et purifier les fractions actives rassemblées des différents tests précédents (SEC, CEI, HIC), l'électrophorèse a été utilisée. En appliquant le gel séparatif SDS-PAGE.

Ce dernier il a la capacité de supprimer les liaisons non covalentes de la protéine et permette sa dénaturation, par le changement de sa conformation initiale et l'apparition de nouvelles masses moléculaires dispersées (sous unités : primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires).

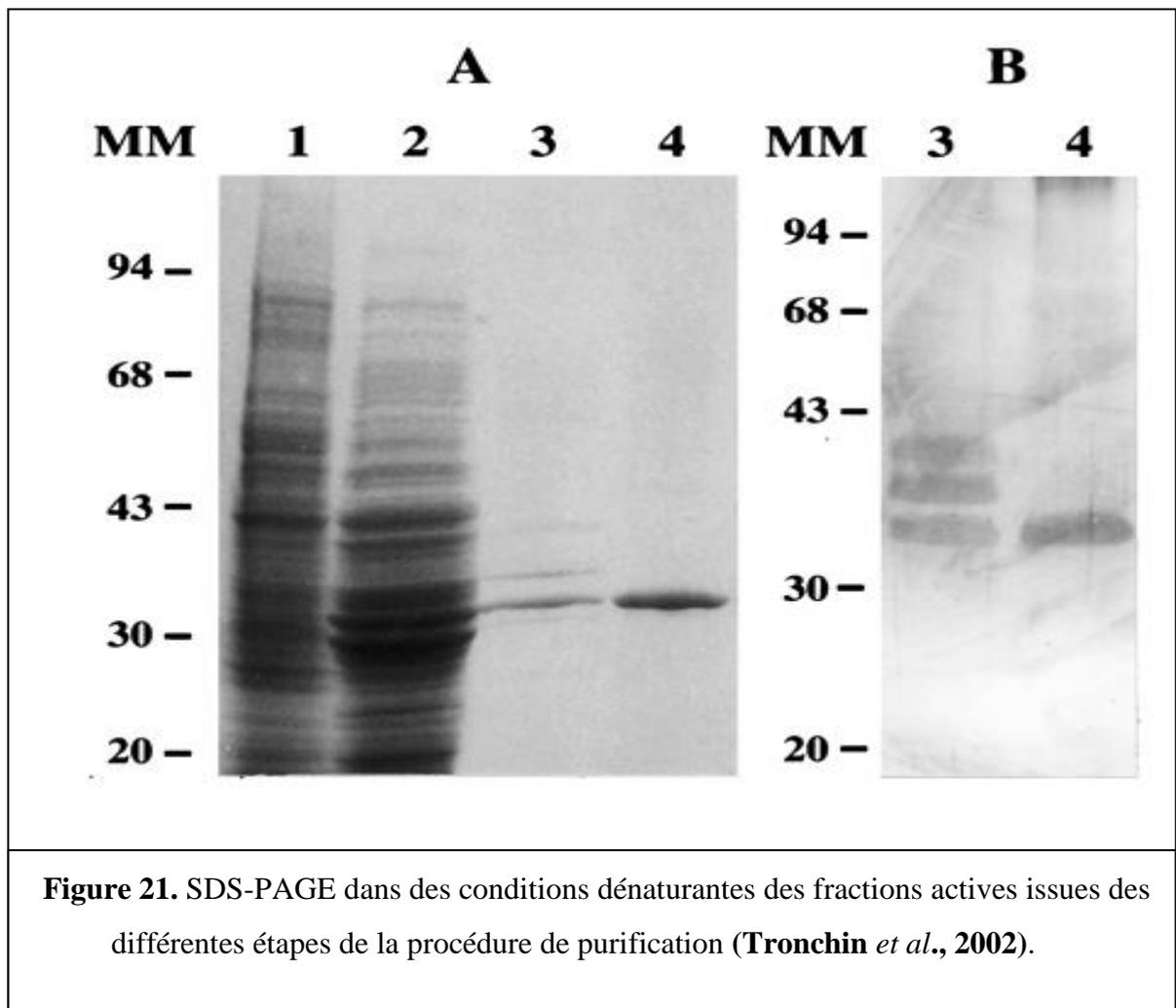
Au début, les fractions actives regroupées par filtration sur gel ont été analysées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie pour visualiser les différentes masses moléculaires, après la migration des sous unités vers l'anode ou la cathode, un grand nombre d'espèces ont été enregistrés visuellement, allant de 10 à 94 kDa (**Figure 21 A**).

L'analyse SDS-PAGE des fractions réactives regroupées par chromatographie échangeuse d'ions, a été effectuée par migration des molécules protéiques vers l'anode ou la cathode, où la coloration au bleu de Coomassie a montré de nombreuses bandes polypeptidiques, avec trois protéines majeures de 32, 35 et 40 kDa (**Figure 21 A**).

Les fractions actives de la chromatographie d'interaction hydrophobe ont été examinées par SDS-PAGE, la migration des molécules protéiques a montré une bande unique avec une masse moléculaire apparente de 32 kDa à la fois en présence et en l'absence de l'agent réducteur (**Figure 21 A**).

La coloration à l'argent du gel chargé avec les fractions réactives des deux dernières étapes de purification a démontré la pureté du produit final et l'intérêt de la chromatographie d'interaction hydrophobe (**Figure 21 B**).

La migration pour les trois étapes de purification a été effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi.



L'extrait fongique brut (puit 1) et les fractions actives obtenues à partir de la filtration sur gel (puit 2), des chromatographies échangeuse d'ions (puit 3) et d'interaction hydrophobe (puit 4) sont présentées. Les protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie (A) ou par coloration à l'argent (B). Les masses moléculaires (MM) des standards protéiques (en kilodaltons) sont indiquées à gauche (**Tronchin et al., 2002**).

D'après les résultats obtenus par l' SDS-PAGE (**Figure 21**), nous pouvons conclure que la meilleure technique pour la purification partielle de la lectine de 32 kDa est la chromatographie d'interaction hydrophobe.

Au cours de ces étapes de purification, l'activité spécifique de la lectine a augmenté de 21,7 fois, avec un rendement globale de 0,96% (**Tableau 10**) (**Tronchin et al., 2002**).

Tableau 10. Résumé de la purification de l'hémagglutinine d'*A. fumigatus* (Tronchin *et al.*, 2002).

Etape de purification	Volume Totale (ml)	Concentration de protéine (µg / ml)	Activité d'hémaagglutination (HAU / ml)	Récupération (%)	Activité de Spectrophotométre (HAU / µg)	Facteur De purification (fold)
Extrait brut	6,5	10,000	5 ,120	100	0,5	1
Filtration sur gel	38	175	640	73	3,7	7,1
Chromatographie échangeuse d'ions	6,8	26	160	3,3	6,2	11,9
Chromatographie à interaction hydrophobe	4	7	80	0,96	11,1	21,7

- L'activité spécifique (HAU/ 10^3 µg) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction (10^3 µg/ml).

4. Relation entre les activités d'hémagglutination et de sérine protéase

La relation entre l'hémagglutination et les activités de sérine protéase a été étudiée en utilisant PMSF, un puissant inhibiteur de toutes les sérines protéases, et une mutante sérine protéase négatif (ALP-non producteur $\Delta 18$). La préincubation de l'extrait fongique I dans du PMSF 1 mM n'a pas affecté l'hémagglutination. De plus, aucune différence dans l'activité d'hémagglutination n'a été trouvée entre les souches productrices d'ALP (CBS 113.26) et non productrices d'ALP ($\Delta 18$) (Tronchin *et al.*, 2002).

Nous pouvons résumer les phases précédentes dans le schéma ci-dessous (Figure 22).

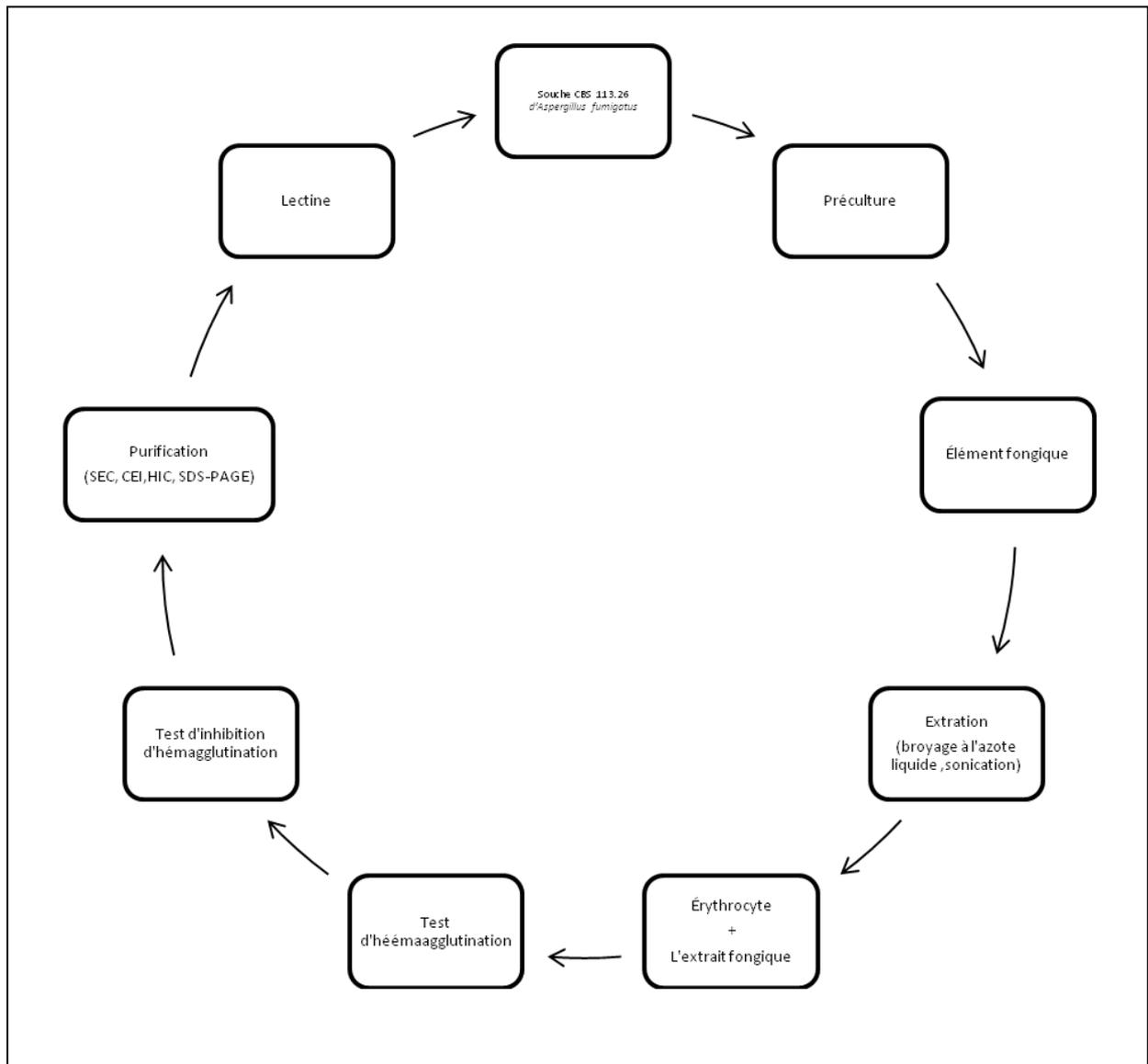


Figure 22. Un aperçu sur le processus de récupération d'une lectine d'origine fongique.

Discussion

La spécificité d'une lectine est démontrée par sa capacité d'adhérer et coloniser les cellules chez les organismes vivants.

Elle est effectuée par la reconnaissance des glycoconjugués et fréquemment médiée par des interactions glucides-protéines, cet événement est important dans les systèmes biologiques.

Les études qui ont été réalisées par (**Tronchin et al., 2002**), sur la souche d'*Aspergillus fumigatus* ont été démontrées qu'elle possède une lectine de 32 kDa qui agglutine les érythrocytes de lapin.

Pour savoir plus de données sur cette activité, une identification a été effectuée sur les hémagglutinines produites par les *Aspergillus*.

Les lectines responsables de l'adhérence et de la colonisation cellulaire ont été largement démontrées chez les organismes vivants. La reconnaissance des glycoconjugués est un événement important dans les systèmes biologiques et est fréquemment médiée par des interactions glucides-protéines. Cependant, très peu de données sont disponibles sur les hémagglutinines produites par les aspergilles (**Ishimaru et al., Lettre**). Ici, nous avons démontré que *A. fumigatus* possède une lectine de 32 kDa qui agglutine les érythrocytes de lapin.

Nous avons d'abord étudié la recherche de l'activité d'hémagglutination dans différents extraits fongiques et déterminé quels saccharides ou glycoprotéines étaient capables d'inhiber l'hémagglutination. Les extraits fongiques obtenus à partir de conidies au repos présentaient les activités d'hémagglutination spécifiques les plus élevées, en particulier celle obtenue par sonication, un traitement connu pour altérer les couches superficielles de la paroi cellulaire fongique (**Claverie-Martin et al., 1988**). Ces résultats ont conduit à la conclusion que la lectine était préférentiellement concentrée dans la paroi cellulaire des conidies, où elle pouvait fournir un mécanisme pour leur fixation aux cellules épithéliales ou à la matrice extracellulaire. En revanche, le broyage dans de l'azote liquide a entraîné une plus grande activité d'hémagglutination spécifique pour le mycélium, suggérant une localisation préférentielle de la protéine dans le cytoplasme plutôt que dans la paroi cellulaire. Néanmoins, la production d'anticorps spécifiques dirigés contre la lectine est nécessaire pour préciser sa localisation aux différents stades morphologiques du champignon.

Les dosages d'hémagglutination d'inhibition réalisés avec divers glucides ou glycoprotéines ont démontré la spécificité de la lectine pour les résidus d'acide sialique. Parmi les composés testés, seuls le NANA et les sialoglycoprotéines ont inhibé l'activité lectine. Les acides sialiques, que l'on trouve souvent sous forme de sucres terminaux des glycoconjugués, jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes biologiques (**Jansson & Nordbring-Hertz , 1984 ; Ramphal & Pyle , 1983 ; Ratanapo et al .,1998 ; Vazquez , 1996 ; Vazquez , 1997**). Dans un rapport précédent, il a été démontré que NANA et le sialyl lactose inhibaient la liaison de la laminine et du fibrinogène aux conidies d' *A. fumigatus* (**Bouchara et al., 1997**), suggérant une interaction médiée par une lectine spécifique de l'acide sialique de la paroi conidienne. De manière intéressante, un tel mode de reconnaissance des composants de la matrice extracellulaire a également été rapporté pour diverses bactéries, par exemple *Escherichia coli* (**Virkola et al .,1993**), *Helicobacter pylori* (**Hirno et al., 1996 ; Valkonen et al., 1993**) et *Pseudomonas aeruginosa* (**Plotkowski et al., 1996 ; Ramphal & Pyle , 1983**). Parmi les champignons, il a été démontré que *Hericium erinaceum* (**Kawagishi et al., 1994**) , *Penicillium marneffeï* (**Hamilton et al., 1998**) et *H. capsulatum* (**Mendes-Gianini et al., 2000**) possèdent également une lectine spécifique de l'acide sialique. En revanche, pour *A. fumigatus* une lectine spécifique du fucose de 32 kDa a été identifiée récemment (**Ishimaru et al., lettre**). Cette lectine pourrait fournir un mécanisme non seulement pour la fixation des conidies aux antigènes fucosylés de la membrane cellulaire épithéliale, mais également pour la reconnaissance des protéines de la matrice à travers les résidus fucose de leurs chaînes glucidiques. Curieusement, dans notre étude, nous n'avons observé aucune inhibition avec le fucose pour les deux souches que nous avons utilisées. Cet écart peut être lié à des différences de souches ou de conditions de culture.

La principale protéine présente dans la fraction éluée de la chromatographie hydrophobe a été caractérisée par SDS-PAGE comme une bande polypeptidique de 32 kDa. Puisqu'une ALP extracellulaire de 32 à 33 kDa appartenant au sous-ensemble subtilisine des sérine protéases a été isolée à partir de différentes souches d' *A. fumigatus* (**Larcher et al ., 1992 ; Monod et al., 1993**) , nous avons examiné si l'activité d'hémagglutination est soutenue par l'ALP. En effet, certaines protéines bactériennes ou parasitaires auraient des propriétés à la fois *fumigatus* (**Larcher et al ., 1992 ; Monod et al., 1993**) , nous avons examiné si l'activité d'hémagglutination est soutenue par l'ALP. En effet, certaines protéines bactériennes ou parasitaires auraient des propriétés à la fois enzymatiques et adhésives ou lectines (**Baker et al., 1991 ; Hytönen et al., 2001 ; Li et al., 1995 ; Madden et al., 1995**). Dans cette étude, l'absence d'inhibition de l'hémagglutination après le prétraitement des

extraits fongiques en présence de PMSF a indiqué que les activités d'hémagglutination et de protéase étaient indépendantes. De plus, un mutant de *A. fumigatus* dans lequel le gène codant pour la sérine protéase a été perturbé (souche ALP-non productrice $\Delta 18$) a présenté une activité lectine spécifique de l'acide sialique similaire, indiquant que les deux activités étaient soutenues par des protéines différentes.

Ensemble, ces résultats suggèrent la présence à la surface conidienne d'une lectine spécifique des résidus d'acide sialique. Compte tenu du rôle potentiel de la laminine et du fibrinogène dans l'adhérence des conidies d'*A. fumigatus* et de leur teneur élevée en glucides avec les résidus terminaux d'acide sialique (**Knibbs et al., 1989 ; Townsend et al., 1982**), nous étudions actuellement si la lectine de 32 kDa est impliquée dans la liaison de ces protéines.

Conclusion

Au cours des dernières années, les lectines fongiques sont devenu un pôle d'attraction majeur pour de nombreux chercheurs en raison de leur potentiel thérapeutique.

Les lectines dans les bactéries et les protozoaires ont été fréquemment étudiées, mais seulement quelques lectines dans les champignons pathogènes humains ont été décrits.

Aujourd'hui l'implication médicale des lectines fongiques comme anticancéreux, mitogènes, antiviraux, antimicrobiens et antioxydants est en cours de discussion.

Dans cette étude, notre objectif est d'étudier l'isolement et la purification d'une lectine de 32 kDa chez la souche *Aspergillus fumigatus*.

L'extraction par sonification des conidies au repos a donné lieu à l'activité spécifique la plus élevée, cette efficacité dépend du stade morphologique.

Différents extraits fongiques obtenus par sonication ou broyage dans de l'azote liquide à partir de conidies au repos ou gonflées, ainsi que de tubes germinatifs et de mycélium, ont été testés par hémagglutination sur des érythrocytes de lapin. Une activité lectinique a été trouvée dans tous les extraits testés. Cependant l'activité la plus faible a été observée dans les tubes germinatifs et le mycélium de 5 jours et la plus élevée dans les conidies au repos et gonflées.

De plus, des expériences d'inhibition de l'hémagglutination utilisant différents saccharides et glycoprotéines ont démontré la spécificité de la lectine pour les résidus d'acide sialique.

La purification de la lectine a été réalisée par filtration sur gel suivie de la chromatographie échangeuse d'ions et d'interaction hydrophobe.

La lectine par filtration sur gel a été observée dans les fractions actives de [35-45] correspondant au deuxième pic d'activité d'hémagglutination et au premier pic d'absorbance.

La chromatographie échangeuse d'ions a révélé la présence d'une lectine dans l'intervalle [25mM- 3M] NaCl.

L'activité de la lectine a été retrouvée par chromatographie d'interaction hydrophobe dans le pic d'élution correspondant au sulfate d'ammonium 0,1 M.

Par la suite, les fractions actives regroupées à partir des tests précédents et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl sulfate de sodium ont montré une masse moléculaire apparente de 32 kDa.

Ces résultats suggèrent que cette lectine peut contribuer à la fixation des conidies aux composants de la matrice extracellulaire par la reconnaissance des nombreux résidus d'acide sialique terminaux de leurs chaînes glucidiques.

Avec les dernières avancées biologiques, il reste encore un grand nombre d'espèces fongiques à analyser avec la possibilité d'obtenir d'autres types de lectines qui peuvent augmenter le catalogue d'applications biomédicales et biotechnologiques et présenter une source précieuse et prometteuse pour l'avenir.

*Références
bibliographiques*

A

Abad, A., Victoria Fernández-Molina, J., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Rementeria, A. (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 155–182.

Afzal, H., Shazad, S., & UnNisa, S.Q. (2013). Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of larkana district (Sindh, Pakistan). p 105-117.

Alyousef, A. A., Alqasim, A., & Aloahd, M. S. (2018). Isolation and characterization of lectin with antibacterial, antibiofilm and antiproliferative activities from *Acinetobacter baumannii* of environmental origin. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1139–1146.

Anderson, M.J., Gull, K., & Denning, D.W. (1996). Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 34: 87-93.

Arason, G.J. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology. Department of Immunology, National University Hospital of Iceland, Landspítalinn, 101 Reykjavik, Iceland.* 6, 277–289.

Ashwell, G., & Harford, J. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* 51, (1982). 531-554.

B

Baker, N. R., Minor, V., Deal, C., Shahrabadi, M.S., Simpson, D.A., & Woods, D.E. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin. *Infect. Immun.* 59:2859–2863.

Barondes, S.H. (1986). Vertebrate Lectins: Properties and Functions. The lectins: properties functions, and applications in biology and medicine. p.437-462.

Bhari, R., Kaur, B., & Singh, R. S. (2016). *Lectin activity in mycelial extracts of Fusarium species.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 775–780.

Bhowal, J., Guha, A.K., & Chatterjee, B.P. (2005). Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*, p 1973-1982.

Blumenschein, T. M. A., Friedrich, N., Childs, R. A., Saouros, S., Carpenter, E. P., Campanero-Rhodes, M. A., Matthews, S. (2007). Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *The EMBO Journal*, 26(11), 2808–2820.

Bouchara, J. P., Sanchez, M., Chevailler, A., Marot-Leblond, A., Lissitzky, J. C., Tronchin, G., & Chabasse, D. (1997). Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 65:2717–2724.

Boulahrouf, Kh. (2016). *Extraction, purification et caractérisation des lectines par des souches pures d'actinomycètes à partir de la rhizosphère de *Lectuca sativa*, *Vicia fabae*, *Prunus domestica* et *Pinus halepensis*. Tests biologiques des lectines caractérisées* (thèse de doctorat). Université des frères mentouri -1-Constantine.

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

Braakman, I. (2001). A novel lectin in the secretory pathway: an elegant mechanism for glycoprotein elimination. *EMBO Reports*2.666-668.

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

C

Caitlin, H., Kowalski. Robert, A., & Cramer. (2020). If looks could kill: Fungal macroscopic morphology and virulence, Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire, United States of America, p 1-8.

Caron, M., & Faure, A. (1982). Intérêt biologique des réactions entre lectines et glycoconjugués chez l'homme, *Revue Francaise de Transfusion et Immuno-Hématologie*, 25(5), 527–539.

Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics*, 3(9), 683–697

Cavaillon, J-M. (2005). Médiateurs de l'inflammation. *Sepsis Sévère et Choc Septique*, 23–49.

Cioci, G. (2006). *Étude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques.* (These de doctorat). Université joseph-fourier - grenoble I.

Clausen, H. & Bennett, E.P. (1996). A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin type O-linked glycosylation. *Glycobiology*, 6.635-646.

Claverie-Martin, F., Diaz-Torres, M. R., & Geoghegan, M. J. (1988). Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. *Curr. Microbiol.* 16:281–287.

D

De Hoff, P.L., Brill, L.M., & Hirsch, A.M. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomics* 282, 1-5.

Delatorre, P., Rocha, B. A. M., Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T., Cajazeiras, J. B., Souza, E. P., Cavada, B. S. (2006). Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *Journal of Structural Biology*, 154(3), 280–286

Denning, D.W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 26: 781-805.

Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 85–94.

Dyer, P. S., & Paoletti, M. (2005). Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Medical Mycology*, 43(s1), 7–14.

E

Ebina, K., Sakagami, H., Yokota, K., & Kondo, H. (1994). Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding aspergillus hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim Biophys Acta.* 1219: 148-150.

Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N., Becker, J.W., Waxdal, M.J. and Wang, J.L (1972). The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69.2580-2584.

F

FILLAUX, J. (2013). *Evaluation de la sensibilisation à Aspergillus fumigatus et du portage persistant comme facteurs de détérioration de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose au CHU de Toulouse* (thèse de doctorat). Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

Fraser, H. C. I. (1907). Recent Work on the reproduction of ascomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 3, 100–107.

Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F., & Larsen, T. O. (2009). Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 47(s1), S53–S71.

G

- Gerlach, D., Wagner, M., Schlott, B., Zahringer, U. & Schmidt, K.H (2002).** Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. *FEMS MicrobiolLett*, 214 .61-68.
- Germaud, P. (2005).** « *Aspergillus* » et système respiratoire. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Traité de Médecine Akos. 2 : 585–595*
- Ghopkins, W., & Evrard, C-M. (2003).** *Physiologie Végétale*. DE BOECK, 1ère édition .p 104-105.
- Gianluca, C. (2006).** *Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Biologie structurale et fonctionnelle* (thèse de doctorat). Université grenoble I – joseph fourier école doctorale chimie et sciences du vivant.
- Gugnani, H. C. (2003).** Ecology and taxonomy of pathogenic aspergillai. *Frontiers in Bioscience*, 8(6), s346–357.
- Guillot, J., Kanska G. (1997).** Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Ecol.*, 25, 203- 230.

H

- Hamilton, A. J., Jeavons, L., Youngchim, S., Vanittaakom, N., & Hay, R. J. (1998).** Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffeii* conidia. *Infect. Immun.* 66:6024–6026.
- Hardman, K.D. & Ainsworth, C.F. (1972).** Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 11.4910-4919.
- Hartmuts, F., Peter, Z., & Jutta, M. (1981).** *Lectins - definition and classification*. Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin, GDR, p.19-21.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2013).** *Aspergillus fumigatus melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence*. *Frontiers in Microbiology*, 3
- Hirabayashi, J. (2014).** *Lectins: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan, 601p.
- Hirno, S., Kelm, S., Schauer, R., Nilsson, B., & Wadström, T. (1996).** Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to -2, 3-linked sialic acids. *Glycoconj. J.* 13:1005–1011.
- Hytonen, J., Haataja, S., Gerlach, D., Podbieski, A., & Finne, J. (2001).** The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface

molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol. Microbiol.* 39:512–519.

I

Imberty, A., & Varrot, A. (2008). Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, (2008).567-576.

Imberty, A., Mitchell, E.P., & Wimmerová, M. (2005). Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 525–534.

Ishimaru, T., Bernard, E.M., Tamada, S., & Armstrong, D. (1996). Lettre, *Clin. Infect. Dis.* 23: 898.

J

Jan, K., & Vtíclav, H. (1981). Defining a lectin. *Nature*. the Department of Biochemistry, Charles University, the Institute of Molecular Genetics, Czechoslovakia Academy of Sciences, Prague, Vol.290, p.188.

Jansson, H. B., & Nordbring-Hertz, B. (1984). Involvement of sialic acid in nematodes chemotaxis and infection by an endoparasitic nematophagous fungus. *J. Gen. Microbiol.* 130:39–43.

K

Karoline, S. A. (2008). *Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de Dictyostelium discoideum* (thèse de doctorat). Université Joseph-Fourier - Grenoble I.

Kawagishi, H., Mori, H., Uno, A., Kimura, A., & Chiba, S. (1994). A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Herichium erinaceum*. *FEBS Letters*, 340(1-2), 56–58.

Khan, F., Ahmad, A., & Khan, M. I. (2007). Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457(2), 243–251.

Knibbs, R., Perini, F., & Goldstein, I. J. (1989). Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. *Biochemistry* 28:6379–6392.

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

Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? *Trends in Microbiology*, 17(11), 481–487.

Kotecha, H., & Poduval, P. B. (2019). Microbial lectins. *Advances in Biological Science Research*, 135–147

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Lam, S. K., & Ng, T. B. (2010). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 45–55.

Lamoth, F. (2016). *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Larcher, G., Bouchara, J. P., Annaix, V., Symoens, F., Chabasse, D., & Tronchin, G. (1992). Purification and characterization of a fibrinogen lytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett.* 308:65–69.

LATGE, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Laboratoire des Aspergillus, Institut Pasteur, 75015 Paris, France, 1999, Vol. 12, No. 2. p 310-350.*

Lee, Y.C. & Lee, R.T. (1995). Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.

Lenka, S., Imberty, A., & Jaroslav, K. (2006). Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases (Thèse de doctorat). université joseph fourier. université grenoble I.

Li, E., Yang, W.-G., Zhang, T., & S. L. Stanley, Jr. (1995). Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect. Immun.* 63:4150–4153.

Liener, I., Sharon, N., & Goldstein, J. (1986). The lectins Properties. Functions and Applications in biology and medicine. Academic Press INC. London LID.p 13-24.

Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev* 98, 673-674.

M

Madayi, D., Surya, P. H., & Elyas, K. K. (2020). A glucose binding lectin from *Leucaena leucocephala* seeds and its mitogenic activity against human lymphocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Madden, T. E., Clarck, V. L., & Kuramitsu, H. K. (1995). Revised sequence of the *Porphyromonas gingivalis* prtT cysteine protease/hemagglutinin gene: homology with streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal proteinase. *Infect. Immun.* 63:238–247.

McCormick, A., Loeffler, J., & Ebel, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol.* p. 1535-1543.

Mendes-Gianini, M. J. S., Taylor, M. L., Bouchara, J. B., Burger, E., Calich, V. L. G., Escalante, E. D., Hanna, S. A., Lenzi, H. L., Machado, M. P., Miyaji, M., Montero Da Silva, J. L., Mota, E. M., Restrepo, A., Restrepo, S., Tronchin, G., Vincenzi, L. R., Xidieh, C. F., & Zenteno, E. (2000). Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol.* 38(Suppl. 1):113–123.

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

Miyoshi, M., Nakabayashi, J., Hara, T., Yawata, T., Tsukamoto, I., & Hamaguchi, Y. (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 28(3), 255–264.

Monod, M., Paris, S., Sarfati, J., Jatton-Ogay, K., Ave, P., & Latge, J. P. (1993). Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:39–46.

Morin, O. (2003). *Aspergillus* et aspergillose : biologie. *EncyclMédChir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses.* 8-600-A-10: 1-7.

Müllbacher, A., Waring, P., & Eischner, R.D. (1985). Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying antiphagocytic and immunomodulating activity in vitro. *J Gen Microbiol.* 131: 1251-1258.

N

Nascimento, K. S., Cunha, A. I., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2012). An overview of lectins purification strategies. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), 527–541.

O

O’Gorman, C. M., Fuller, H. T., & Dyer, P. S. (2008). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471–474.

P

Park, S. J., & Mehrad, B. (2009). Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 535–551.

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

Plotkowski, M. C., J. M. Tournier, & E. Puchelle. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infect. Immun.* 64: 600–605.

R

Rabijns, A., Barre, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., De Ranter, C. J., & Rouge, P. (2005). Structural analysis of the jacalin-related lectin MornigaM from the black mulberry (*Morus nigra*) in complex with mannose. *FEBS Journal*, 272(14), 3725–3732.

Rambach, G., Blum, G., Latgé, J.-P., Fontaine, T., Heinekamp, T., Hagleitner, M., Speth, C. (2015). Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets. *Journal of Infectious Diseases*, 212(7), 1140–1149.

Ramphal, R., & M. Pyle. (1983). Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 41:339–344

Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W. & Chulavatnatol, M. (1998). Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). *Plant Sci.* 139:141–148.

Ravindranath, M. H., Higa, H.H., Cooper, E.L., & Paulson, J.C. (1985). Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* 260:8850–8856.

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

Richard, J.B., & Turgeon, B.G. (2016). Fungal sex: the Ascomycota. *Microbiol Spectrum* 4(5) : FUNK-0005.

Rougé, P., Culerrier, R., Granier, C., Rancé, F., & Barre, A. (2010). La lectine de l'arachide. *Revue française d'allergologie* 50, p 281–284.

S

Sarup Singh, R., Kaur Walia, A., & Kennedy, J.F. (2019). Mushroom lectins in biomedical research and development, *International Journal of Biological Macromolecules*.

Sharon, N. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408, 1-8.

Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, vol.14, and n ° 11, p 53R-62R.

Singh, R. S., Bhari, R., & Kaur, H. P. (2010). Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 99–126.

Singh, R.S., Kaur Walia, A., Kennedy, J.F. (2019). Mushroom lectins in biomedical research and development, *International Journal of Biological Macromolecules*.

Singh, R. S., Thakur, S. R., & Kennedy, J. F. (2020). Purification and characterisation of a xylose-specific mitogenic lectin from *Fusarium sambucinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*.

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

Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latge, J.-P., & Steinbach, W. J. (2014). *Aspergillus fumigatus* and Related Species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2), a019786–a019786.

Sumner, J. B. (1919). The globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. *J. Biol. Chem.* 37, 137-142.

Sumner, J. B., & Howell, S.F. (1936). Identification of hémagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32(2), 227-237.

T

Taylor, T.N., Krings, M., & Taylor, E.L. (2015). Fossil Fungi. p 129-171.

Thierry, S. (2011). *Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'Aspergillus fumigatus et de Chlamydomyces psittaci chez les oiseaux* (thèse de doctorat). Université L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).

Thywißen, A., Heinekamp, T., Dahse, H.-M., Schmalzer-Ripcke, J., Nietzsche, S., Zipfel, P. F., & Brakhage, A. A. (2011). Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Frontiers in Microbiology*, 2

Townsend, R., E. Hilliker, Y. T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, & Y. C. Lee. (1982). Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz ¹H NMR to characterize glucosidase-treated glycopeptides. *J. Biol. Chem.* 257: 9704–9710.

Tronchin, G., Bouchara, J. P., Ferron, M., Larcher, G., & Chabasse, D. (1995). Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(8), 714–721.

Tronchin, G., Esnault, K., Sanchez, M., Larcher, G., Marot-Leblond, A., & Bouchara, J.P. (2002). Purification and Partial Characterization of a 32-Kilodalton Sialic Acid-Specific Lectin from *Aspergillus fumigatus*, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, and Faculté de Pharmacie Angers, Francev.. No. 12, Vol. 70, p. 6891–6895.

Tsaneva, M., & Van Damme, E.J.M. (2020). 130 years of Plant Lectin Research. 2020. p 533-551.

Turner, M. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*, 40(7), 423–429.

U

Umetsu, K., Yamashita, K., & Suzuki, T. (1991). Purification and carbohydrate binding Specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis Japonica*). *J Biochem*, 109, 718-721.

V

Valkonen, K. H., M. Ringner, A. Ljungh, & T. Wadstroöm. (1993). High affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7:29–38.

Van Damme, E.J.M., 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 Rev. Plant Sci.*, 17, 575-692.

Varrot, A., Basheer, S.M., & Imberty, A. (2013) .Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Curr Opin Struct Biol* 23: 678–685.

Vasta, G.R.(1992).Invertebrate lectins: Distribution, synthesis, molecular biology and function. In Allen, H.J. and Kisailus, E.C. (eds), *Glycoconjugates, Composition, Structure and Function*. Marcel Dekker, New York.

Vazquez, L., G. Maldonado, C. Agundis, A. Pe´rez, E. L. Cooper, & E. Zenteno. (1997). Participation of a sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self-cells. *J. Exp. Zool.* 279:265–272.

Vazquez, L., L. Jaramillo, R. Lascurain, E. L. Cooper, P. Rosas, & E. Zenteno. (1996). Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B:355–359.

Vijayan, M., & Nagasuma, C. (1999). Lectines. Bioinformatics Centre, *Indian Institute of Science, Bangalore* 560 012, India, p 707-714.

Virkola, R., J. Parkkinen, J. Hacker, & T. K. Korhonen. (1993). Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 61:4480–4484.

Volk, T.J. (2013). Fungi. University of Wisconsin-La Crosse.p 624-640.

Vyas, N. K. (1991). Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(5), 732–740.

W

Weis, W.I., & Drickamer, K. (1994). Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. Department of Structural Biology, Fairchild Building, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University, 2, 1227-1240.

Weis, W.I., Brunger, A.T., Skehel, J.J., & Wiley, D.C. (1990). Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J MolBiol*, 212, 737-761.

Wolfgang, V., Markus, H., & Michael, K. (2007). SPR studies of carbohydrate–lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg, p 2983-2988.

Y

Yu, X.Q., & Kanost, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J BiolChem*, 275, 37373-37381.

Z

Zulkifli, A.N., & Zakaria, L. (2017). Morphological and Molecular Diversity of *Aspergillus* from Corn Grain Used as Livestock Feed. School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia. p 26-34.

Les sites web

Mycology online. (2008). Mould Identification: A Virtual Self-Assessment .Repéré à <https://mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Sep08.html#page-top>

Annexes

ANNEXE 1

Milieux de culture

Milieu YPD

Ce milieu complet permet la propagation des levures, il est composé de 1% d'extrait de levure, 2% de peptone et 2% et de glucose D (p/v).

Pour une préparation de 1 litre

Extrait de levure.....10g

Peptone Bacto.....20g

Glucose.....20g

pH (25 °C) = 6, 14 - 7, 14.

Pour une préparation de 2 litres

Extrait de levure.....20g

Peptone Bacto.....40g

Glucose.....40g

pH (25 °C) = 6, 14 - 7,14.

Milieu CZA

NaNO₃.....3g

K₂HPO₄.....1g

MgSO₄.7H₂O.....0.5g

KCl.....0.5g

FeSO₄.7H₂O.....0.1g

Saccharose.....30g

Agar.....15g

Milieu CYA

Milieu CZ1 L

Extrait de levure..... 5g

Milieu MEA

Extrait de malt30 g /L

Peptone mycologique..... 5 g /L

Agar..... 15 g /L

pH=5.4 ±0.2

ANNEXE 2

Dosage des protéines (Bradford 1976)

Compositions du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie100 mg.

Ethanol absolu.....50 ml.

Acide phosphorique à 85%.....100 ml.

ANNEXE 3

Électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

(Lammeli, 1970)

Tampon de séparation (pH 8,8)

Tris-HCL.....0,15M

SDS.....0,4g

Compléter à 100mL avec l'eau distillée

Annexe 4

Tube à EDTA

Ce tube est utilisé notamment pour :

- les numérations (globules blancs, globules rouges, plaquettes).
- l'hémoglobine glyquée.
- les groupes sanguins.

Purification and Partial Characterization of a 32-Kilodalton Sialic Acid-Specific Lectin from *Aspergillus fumigatus*

Guy Tronchin,^{1*} Karine Esnault,¹ Myriam Sanchez,¹ Gerald Larcher,¹
Agnes Marot-Leblond,² and Jean-Philippe Bouchara¹

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
Centre Hospitalier Universitaire,¹ and Faculté de Pharmacie,² Angers, France

Received 2 August 2002/Returned for modification 28 August 2002/Accepted 16 September 2002

Adherence of the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus* to the extracellular matrix components is considered a crucial step in the establishment of the infection. Given the high carbohydrate content of these glycoproteins and the role of carbohydrate-protein interactions in numerous adherence processes, the presence of a lectin in *A. fumigatus* was investigated. Different fungal extracts obtained by sonication or grinding in liquid nitrogen from resting or swollen conidia, as well as from germ tubes and mycelium, were tested by hemagglutination assays using rabbit erythrocytes. A lectin activity was recovered in all the extracts tested. However, sonication of resting conidia resulted in the highest specific activity. Purification of the lectin was achieved by gel filtration followed by ion-exchange and hydrophobic-interaction chromatographies. Analysis of the purified lectin by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed an apparent molecular mass of 32 kDa, which is similar to that of the alkaline protease already identified from different strains of *A. fumigatus*. However, as evidenced by the use of an alkaline protease-deficient mutant, the two activities were supported by distinct proteins. In addition, hemagglutination inhibition experiments using different saccharides and glycoproteins demonstrated the specificity of the lectin for sialic acid residues. Together these results suggest that this lectin may contribute to the attachment of conidia to the extracellular matrix components through the recognition of the numerous terminal sialic acid residues of their carbohydrate chains.

Usually a saprophyte, *Aspergillus fumigatus* grows and sporulates abundantly in a humid environment on decaying organic matter, leading to highly dispersible conidia. Therefore, this pathogen elicits by inhalation of its airborne conidia a wide spectrum of diseases, ranging from localized infections to invasive pulmonary aspergillosis. With the development of organ and bone marrow transplantations, the prevalence of this last clinical form has increased markedly during the past decades, and this fungus has become a major hospital pathogen (20, 27).

During the past few years, several groups have focused their research on the identification of cell wall factors associated with the pathogenicity of *A. fumigatus*. Indeed, the cell wall, located at the interface between the fungus and the host cells, plays a major role in the establishment of the infection. Thus, it has been demonstrated that the conidium's pigmentation contributes to fungal resistance against the host defense mechanisms and thus significantly influences the virulence of the fungus in a murine model (16, 22). Likewise, there is now accumulating evidence that adherence of the inhaled conidia to damaged epithelium, which is the initial event of the infection, is mediated by specific interactions of the fungus with some extracellular matrix components, i.e., type I and type IV collagens, fibrinogen, fibronectin, and basement membrane laminin (3, 6, 11, 31, 39). Some of the fungal receptors involved in these interactions have been identified at the molecular level. Attachment of conidia to fibronectin appeared to be

mediated by two polypeptides of 23 and 30 kDa (31), whereas laminin was specifically recognized by a 72-kDa cell wall receptor (41). In addition, a low-molecular-mass hydrophobic protein of the conidial wall has been characterized, but it does not seem to be involved in adherence to extracellular matrix components or to alveolar type II pneumocytes (30, 37).

Another type of interaction which could provide a mechanism for the attachment of the fungus to the host cells may be accomplished by the specific recognition of glycoconjugates on the epithelial cell membrane by lectins present at the surface of the cell wall. Lectins in bacteria and protozoa have been extensively studied (18, 24, 26, 33, 36), but only a few lectins in human pathogenic fungi including *Candida albicans* (5, 10), *Candida glabrata* (9), and *Histoplasma capsulatum* (28), as well as some dermatophytes and related keratinolytic fungi (2, 7), have been described. In *A. fumigatus*, a 32-kDa fucose-specific lectin, concentrated in conidia rather than in mycelium, has been identified by Ishimaru et al. (T. Ishimaru, E. M. Bernard, S. Tamada, and D. Armstrong, Letter, Clin. Infect. Dis. 23:898, 1996). Nevertheless, further studies are needed to characterize this lectin in *A. fumigatus*.

Keeping in view the potential role of lectins in the pathogenesis of microorganisms, we searched for molecules supporting hemagglutination activity in *A. fumigatus*. In the present paper, we describe the purification and the characterization of a 32-kDa lectin with specificity towards sialic acid-containing glycoconjugates.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and culture conditions. *A. fumigatus* CBS 113.26 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands) was grown on yeast extract-peptone-dextrose agar at 37°C, and conidia were obtained from 5-day-old cul-

* Corresponding author. Mailing address: Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite, UPRES-EA 3142, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex 01, France. Phone: 33 (0) 2 41 35 34 72. Fax: 33 (0) 2 41 35 36 16. E-mail: guy.tronchin@univ-angers.fr.

tures by scraping the aerial mycelium in distilled water as described earlier (40). They were then pelleted by centrifugation ($1,200 \times g$, 3 min) and resuspended in distilled water, and the absorbance at 620 nm of the obtained suspension was adjusted to 0.6 (approximately 10^8 conidia/ml).

Swollen conidia and germ tubes were obtained by inoculating 1.5 ml of the conidial suspension in petri dishes containing 15 ml of medium 199 (Sigma Laboratories) buffered at pH 7.6 as reported previously (40). After incubation at 37°C, the fungal elements were pelleted by centrifugation and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) (0.15 M, pH 7.2). For the production of mycelium, the strain was grown in yeast extract-peptone-dextrose broth. Flasks (2 liters) containing 1 liter of medium were inoculated with approximately 10^7 conidia per ml and incubated for 5 days at 37°C. The mycelium was harvested by filtration, washed with PBS, and briefly pressed dry.

An alkaline protease (ALP)-deficient mutant of *A. fumigatus* (ALP-nonproducing $\Delta 18$) kindly given by S. Paris (Pasteur Institute, Paris, France) was also used for some experiments.

Preparation of erythrocyte suspension. Rabbit blood was collected in tubes containing EDTA and centrifuged at $3,000 \times g$ for 5 min at 4°C. Erythrocyte suspensions were freshly prepared by washing the erythrocytes three times in PBS containing 10 mM EDTA, followed by two other washes with 20 volumes of 75 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 75 mM NaCl. Erythrocytes were then resuspended in PBS as a 10% (vol/vol) suspension, fixed with 3% formaldehyde in phosphate buffer for 18 h at 37°C, washed extensively in PBS, and stored at 4°C until used.

Preparation of fungal extracts. Fungal extracts were prepared from the different morphological phases of the fungus (resting or swollen conidia, germ tubes, and mycelium), and two distinct extraction procedures were used. For the first one, the fungal elements were ground in a mortar with liquid nitrogen. The frozen mycelial powder was resuspended in an equal volume of PBS and centrifuged at $50,000 \times g$ for 30 min. The supernatant was collected and is hereafter referred to as fungal extract I. For the other procedure, the fungal elements were sonicated four times at 200 W for 30 s (Sonifier Cell Disruptor; Branson Ultrasonics Co.) in an ice bath. After centrifugation at $50,000 \times g$ for 30 min, the supernatant was collected and is hereafter referred to as fungal extract II. The protein concentration of each extract was determined by the method of Bradford (4) with bovine serum albumin as a standard.

In some cases, fungal extracts were incubated with 0.2 M 2-mercaptoethanol or 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) for 30 min at 37°C before the hemagglutination assay.

Hemagglutination assays. Rabbit erythrocytes were used for the determination of hemagglutination activity during the isolation procedures and for inhibition assays. Fifty microliters of serial twofold dilutions of the fungal extracts was mixed with an equal volume of a 1% erythrocyte suspension in wells of U-shaped microtiter plates. After gentle shaking, the plates were allowed to settle at room temperature for 1 h and agglutination was recorded visually. PBS was used as a negative control. The hemagglutination titer was defined as the reciprocal of the highest dilution of the fungal extract that yielded visible hemagglutination activity. One hemagglutination unit (HAU) was defined as the amount of fungal extract which causes complete agglutination under the aforementioned conditions. The specific hemagglutination activity was recorded as the number of hemagglutination units per microgram of protein.

Hemagglutination inhibition assays. Hemagglutination inhibition assays were performed by mixing 25 μ l of an appropriate dilution of the fungal extract (corresponding to 4 HAU) in microtiter plates with an equal volume of serial twofold dilutions of potential inhibitors (see below). After 30 min of incubation at room temperature, 50 μ l of a 1% erythrocyte suspension was added to each well and plates were allowed to settle at room temperature for 1 h. Controls contained 25 μ l of PBS instead of the inhibitor solution. The MIC was defined as the lowest concentration of carbohydrate or glycoprotein required for complete inhibition of the hemagglutination.

The following sugars (stock solutions at 400 mM in PBS) and glycoproteins (stock solutions at 10 mg/ml in PBS), all from Sigma, were tested as inhibitors: D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-fructose, D- and L-fucose, L-rhamnose, D-glucosamine, D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, D-trehalose, D-lactose, D-melibiose, D-maltose, D-saccharose, N-acetylneuraminic acid (NANA), colominic acid, bovine thyroglobulin, human fibrinogen, bovine fetuin, bovine submaxillary mucin, bovine asialomucin, and human orosomucoid. Bovine mucin was also used after hydrolysis of its O-acetylated groups (35).

Purification procedures. (i) **Fractionation by gel filtration.** Fungal extract I was applied to a Highload Superdex TM 75 gel filtration column (60 by 1.6 cm; Pharmacia) previously equilibrated with PBS. Elution was carried out at room temperature. Fractions of 4 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min. They

TABLE 1. Hemagglutination activity of the different morphological stages of *A. fumigatus*

Morphological stage	Fungal extract	Protein concn (μ g/ml)	Hemagglutination activity (HAU/ml)	Sp act (HAU/ μ g)
Resting conidia	I	27.5	800	29.1
	II	9.6	800	83.4
Swollen conidia	I	26.6	400	15
	II	35.5	400	11.3
Germ tubes	I	284.4	400	1.4
	II	50.9	400	7.9
Mycelium	I	194.8	800	4.1
	II	666.6	850	1.3

were monitored for protein content at 280 nm and for hemagglutination activity as previously described. The reactive fractions were pooled, and ammonium sulfate was added to 80% saturation. After 1 h of incubation at 4°C, the precipitate was collected by centrifugation, dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), and dialyzed against the same buffer for 48 h.

(ii) **Ion-exchange chromatography.** The lectin was then purified by ion-exchange chromatography on a Mono Q HR 5/5 column (Pharmacia) equilibrated with a 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5). Elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 1 ml/min by a stepwise increase in the concentration of NaCl (25 mM to 3 M). Fractions of 4 ml were collected and checked for hemagglutination activity.

(iii) **Hydrophobic-interaction chromatography.** For hydrophobic-interaction chromatography, the active fractions were pooled and proteins were precipitated by slow addition of an equal volume of a 50 mM phosphate buffer containing 2.8 M ammonium sulfate. After 1 h of incubation at 4°C, insoluble residues were removed by centrifugation at $17,000 \times g$ for 30 min. The supernatant was then loaded on a phenyl-Superose HR 5/5 column (Pharmacia) previously equilibrated with 50 mM phosphate buffer containing 1.4 M ammonium sulfate. Elution was carried out at a flow rate of 0.5 ml/min by a stepwise decrease of ammonium sulfate concentration until a 0.1 M concentration was achieved. The residual bound material was then eluted by using successively 150 mM phosphate buffer, 20% ethanol, and distilled water. Fractions of 4 ml were collected, dialyzed, and checked for hemagglutination activity.

Electrophoresis. After each purification step, an aliquot of the fractions exhibiting the hemagglutination activity was precipitated with 10% trichloroacetic acid and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12% acrylamide) according to the method of Laemmli (21). The gels were stained with Coomassie brilliant blue R 25. The purity of the lectin was confirmed by silver staining. The molecular masses of protein standards were determined with a low-molecular-mass electrophoresis calibration kit (Pharmacia).

RESULTS

Specific hemagglutination activity of the fungal extracts.

The presence of a lectin in the crude extracts prepared from resting or swollen conidia, germ tubes, and mycelium of strain CBS 113.26 was detected by hemagglutination assays with rabbit erythrocytes. The lectin activity was recovered in all extracts, whatever the extraction procedure used (Table 1). However, extracts from resting conidia exhibited the highest specific hemagglutination activity. Then a decrease in the hemagglutination activity was observed as the germination occurred, the lowest activity being observed in germ tubes and in 5-day-old mycelium.

The efficiency of the extraction of the hemagglutinin was dependent on the morphological stage. In resting conidia, the best results were obtained by sonication, whereas grinding in liquid nitrogen was more efficient for mycelium. However, preliminary tests showed that purification of the hemagglutinin required important amounts of fungal material. Therefore, a

TABLE 2. Inhibition of hemagglutination by NANA and sialoglycoproteins

Inhibitor	MIC (equivalent NANA-bound concn) ^a
NANA	25 mM
Bovine mucin	83 µg/ml (32 µM)
Treated bovine mucin	166 µg/ml (66 µM)
Asialomucin	2.5 mg/ml (96 µM)
Bovine thyroglobulin	625 µg/ml (28 µM)
Human fibrinogen	5 mg/ml (86 µM)
Bovine fetuin	666 µg/ml (86 µM)
Human orosomuroid	— ^b
Colomonic acid	—

^a Equivalent concentration of NANA bound evaluated on the basis of data from the literature (15, 38).

^b —, absence of inhibition at the higher concentration used (10 mg/ml).

homogenate of frozen mycelium (fungal extract I) was used throughout for subsequent experiments.

Hemagglutination inhibition by various carbohydrates and glycoconjugates. Various sugars and glycoconjugates were tested for their ability to inhibit the agglutination of rabbit erythrocytes by the lectin. Glucose, galactose, mannose, fructose, fucose, rhamnose, glucosamine, galactosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, *N*-acetyl-D-galactosamine, lactose, melibiose, trehalose, and saccharose, at the highest concentration used, did not inhibit the hemagglutination activity of fungal extract I from strain CBS 113.26. Conversely, it was inhibited by NANA and the sialic acid-rich glycoproteins, i.e., bovine submaxillary mucin, thyroglobulin, fibrinogen, and fetuin (Table 2). Moreover, similar results were obtained with the ALP-nonproducing strain Δ18.

The sialoglycoproteins tested were more potent inhibitors than NANA, indicating that the lectin presented a higher affinity for linked sialic acids. Among them, bovine submaxillary mucin, which presented both terminal 9-*O*-acetyl and 5-*N*-acetyl sialic acids, was the most potent inhibitor (Table 2). Base treatment specific for hydrolysis of the *O*-acetyl groups of sialic acids slightly affected the inhibitory potency of mucin, whereas its desialylation induced a strong reduction. The minimum concentration required for complete inhibition at 4 HAU was 83 µg/ml for bovine mucin, whereas it was 2.5 mg/ml for its desialylated form. This could be explained by the fact that desialylation was incomplete (about 90%, according to the manufacturer). Indeed, when calculated in NANA-bound equivalent concentrations, the results were similar for all active glycoproteins, ranging from 28 to 96 µM (Table 2).

Orosomuroid did not inhibit the lectin. Unlike the other sialoglycoproteins tested, it contains only *N*-glycosidically linked carbohydrate chains. Likewise, colomonic acid, a homopolymer [poly- α -(2,8)-NANA], had no inhibitory effect at the concentration of 10 mg/ml, indicating that the lectin had less affinity towards subterminal sialic acid than terminal residues. Finally, treatment of the crude extract with 0.2 M 2-mercaptoethanol did not affect the hemagglutination activity.

Purification of the hemagglutinin. The crude fungal extract was applied to a gel filtration column. Elution with PBS yielded four protein peaks. The hemagglutination activity eluted in the second peak, corresponding to fractions 35 to 45 (Fig. 1). The active fractions were pooled and analyzed by SDS-PAGE. After Coomassie blue staining, a large number of molecular spe-

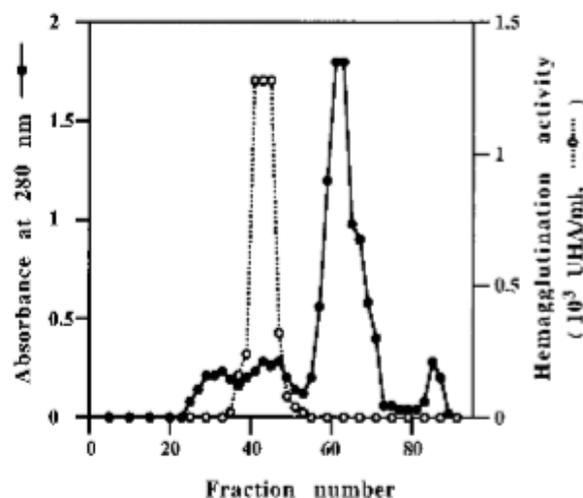


FIG. 1. Elution protein profile (●) and hemagglutination activity (○) from gel filtration chromatography.

cies were visualized, ranging from 10 to 94 kDa (Fig. 2A, lane 2).

The lectin was further purified by ion-exchange chromatography on a Mono Q HR 5/5 column. Elution was carried out with increasing concentrations of NaCl. The hemagglutination activity was found in fractions corresponding to elution by 25, 50, and 75 mM NaCl. SDS-PAGE analysis of the pooled reactive fractions showed after Coomassie blue staining numerous polypeptide bands, with three major proteins of 32, 35, and 40 kDa (Fig. 2A, lane 3).

Finally purification was achieved by hydrophobic-interaction

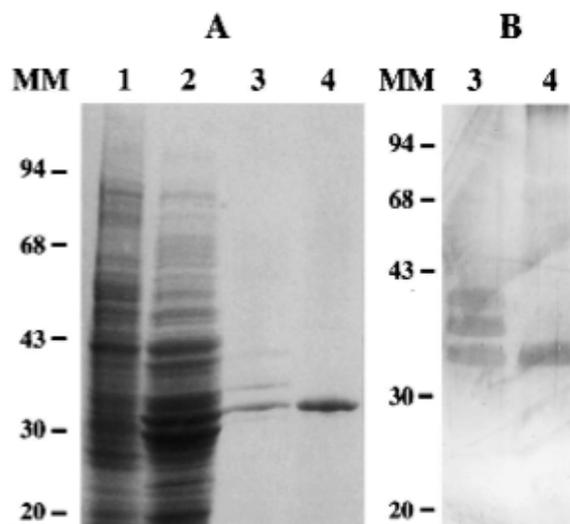


FIG. 2. SDS-PAGE under denaturing conditions of the active fractions from the different steps of the purification procedure. Crude fungal extract (lane 1) and active fractions obtained from gel filtration (lane 2), ion-exchange (lanes 3), and hydrophobic-interaction (lanes 4) chromatographies are shown. The proteins were visualized by Coomassie blue staining (A) or by silver staining (B). The molecular masses (MM) of protein standards (in kilodaltons) are indicated on the left.

TABLE 3. Summary of purification of *A. fumigatus* hemagglutinin

Purification step	Total vol (ml)	Protein concn ($\mu\text{g/ml}$)	Hemagglutinating activity (HAU/ml)	Recovery (%)	Sp act (HAU/ μg)	Purification factor (fold)
Crude extract	6.5	10,000	5,120	100	0.5	1
Gel filtration	38	175	640	73	3.7	7.1
Ion-exchange chromatography	6.8	26	160	3.3	6.2	11.9
Hydrophobic-interaction chromatography	4	7	80	0.96	11.1	21.7

chromatography, by using for elution a stepwise decreasing concentration of ammonium sulfate in phosphate buffer. The lectin activity was recovered in the elution peak corresponding to 0.1 M ammonium sulfate. This fraction examined by SDS-PAGE showed a single band with an apparent molecular mass of 32 kDa both in the presence and in the absence of the reducing agent (Fig. 2A, lane 4). Silver staining of the gel loaded with the reactive fractions from the last two purification steps demonstrated the purity of the final product and the interest of the hydrophobic-interaction chromatography (Fig. 2B, lanes 3 and 4). During these purification steps, the specific activity of the lectin increased 21.7-fold, with an overall recovery of 0.96% (Table 3).

Relationship between the hemagglutination and serine protease activities. The relationship between hemagglutination and serine protease activities was investigated by using PMSF, a potent inhibitor of all serine proteases, and a serine protease-negative mutant (ALP-nonproducing $\Delta 18$). Preincubation of fungal extract I in 1 mM PMSF did not affect the hemagglutination. Moreover, no difference in hemagglutination activity was found between ALP-producing (CBS 113.26) and ALP-nonproducing ($\Delta 18$) strains.

DISCUSSION

Lectins responsible for adherence and cellular colonization have been widely demonstrated among living organisms. Recognition of glycoconjugates is an important event in biological systems and is frequently mediated by carbohydrate-protein interactions. However, very few data are available on hemagglutinins produced by the aspergilli (Ishimaru et al., letter). Here we demonstrated that *A. fumigatus* possesses a 32-kDa lectin that agglutinates rabbit erythrocytes.

First we searched for a hemagglutination activity in different fungal extracts and determined which saccharides or glycoproteins were able to inhibit hemagglutination. Fungal extracts obtained from resting conidia presented the highest specific hemagglutination activities, particularly that obtained by sonication, a treatment known to alter the superficial layers of the fungal cell wall (8). These results led to the conclusion that the lectin was preferentially concentrated in the cell wall of conidia, where it could provide a mechanism for their attachment to epithelial cells or to the extracellular matrix. In contrast, grinding in liquid nitrogen resulted in a greater specific hemagglutination activity for mycelium, suggesting a preferential localization of the protein in the cytoplasm rather than in the cell wall. Nevertheless, production of specific antibodies directed against the lectin is needed to specify its localization in the different morphological stages of the fungus.

Inhibition hemagglutination assays performed with various

carbohydrates or glycoproteins demonstrated the specificity of the lectin for sialic acid residues. Among the compounds tested, only NANA and the sialoglycoproteins inhibited the lectin activity. Sialic acids, which are often found as terminal sugars of glycoconjugates, play an important role in many biological mechanisms (17, 33, 34, 43, 44). In a previous report, it was demonstrated that NANA and sialyl lactose inhibited the binding of laminin and fibrinogen to *A. fumigatus* conidia (3), suggesting an interaction mediated by a sialic acid-specific lectin of the conidial wall. Interestingly, such a mode of recognition of extracellular matrix components has also been reported for various bacteria, for example *Escherichia coli* (45), *Helicobacter pylori* (13, 42), and *Pseudomonas aeruginosa* (32, 33). Among fungi, it has been demonstrated that *Penicillium marneffei* (12) and *H. capsulatum* (28) also possess a lectin specific for sialic acid. In contrast, for *A. fumigatus* a 32-kDa fucose-specific lectin has been identified recently (Ishimaru et al., letter). This lectin could provide a mechanism not only for the attachment of conidia to fucosylated antigens of the epithelial cell membrane but also for the recognition of matrix proteins through the fucose residues of their carbohydrate chains. Curiously, in our study, we did not observe any inhibition with fucose for the two strains that we used. This discrepancy may be related to differences in strains or culture conditions.

The main protein present in the eluted fraction from hydrophobic chromatography was characterized by SDS-PAGE as a 32-kDa polypeptide band. Since an extracellular ALP of 32 to 33 kDa belonging to the subtilisin subset of serine proteases has been isolated from different strains of *A. fumigatus* (23, 29), we examined if the hemagglutination activity is supported by ALP. Indeed, some bacterial or parasitic proteins have been reported to harbor both enzymatic and adhesive or lectin properties (1, 14, 24, 25). In this study, the absence of inhibition of the hemagglutination after pretreatment of the fungal extracts in the presence of PMSF indicated that both hemagglutination and protease activities were independent. In addition, an *A. fumigatus* mutant in which the gene encoding the serine protease was disrupted (ALP-nonproducing strain $\Delta 18$) exhibited a similar sialic acid-specific lectin activity, indicating that the two activities were supported by different proteins.

Together, these results suggest the presence at the conidial surface of a lectin specific for sialic acid residues. Given the potential role of laminin and fibrinogen in the adherence of *A. fumigatus* conidia and their high carbohydrate content with terminal sialic acid residues (19, 38), we are now investigating if the 32-kDa lectin is involved in the binding of these proteins.

REFERENCES

- Baker, N. R., V. Minor, C. Deal, M. S. Shahrabadi, D. A. Simpson, and D. E. Woods. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin. *Infect. Immun.* 59:2859–2863.
- Bouchara, J. P., A. Bouali, G. Tronchin, R. Robert, D. Chabasse, and J. M. Senet. 1987. Evidence for the lectin nature of some dermatophyte haemagglutinins. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138:729–736.
- Bouchara, J. P., M. Sanchez, A. Chevallier, A. Marot-Leblond, J. C. Lisitzky, G. Tronchin, and D. Chabasse. 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 65:2717–2724.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Brassart, D., A. Woltz, M. Golliard, and J. R. Neeser. 1991. In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fucal1→2Galβ-bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.* 59:1605–1613.
- Bromley, I. M. J., and K. Donalson. 1996. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax* 51:1203–1209.
- Chabasse, D., and R. Robert. 1986. Detection of lectin from *Chrysosporium keratinophilum* (Frey) Carmichael and *Anisopis stercoraria* (Hansen) Hansen by inhibition of haemagglutination. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 137B:187–193.
- Claverie-Martin, F., M. R. Diaz-Torres, and M. J. Geoghegan. 1988. Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. *Curr. Microbiol.* 16:281–287.
- Cormack, B. P., N. Ghori, and S. Falkow. 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285:578–582.
- Critchley, I. A., and L. J. Douglas. 1987. Roles of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 133:637–643.
- Gil, M. L., M. C. Peñalver, J. L. Lopez-Ribot, J. E. O'Connor, and J. P. Martinez. 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64:5239–5247.
- Hamilton, A. J., L. Jeavons, S. Youngchim, N. Vanittaakom, and R. J. Hay. 1998. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffii* conidia. *Infect. Immun.* 66:6024–6026.
- Hirno, S., S. Kelm, R. Schauer, B. Nilsson, and T. Wadström. 1996. Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to α-2,3-linked sialic acids. *Glycoconj. J.* 13:1005–1011.
- Hytönen, J., S. Haataja, D. Gerlach, A. Podbieski, and J. Finne. 2001. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol. Microbiol.* 39:512–519.
- Iglesias, M., G. D. Cymes, and C. Wolfenstein-Todet. 1996. A sialic acid-binding lectin from ovine placenta: purification, specificity and interaction with actin. *Glycoconj. J.* 13:967–976.
- Jahn, B., A. Koch, A. Schmidt, G. Wanner, H. Gehringer, S. Bhakdi, and A. Brakhage. 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* 65:5110–5117.
- Jansson, H. B., and B. Nordbring-Hertz. 1984. Involvement of sialic acid in nematodes chemotaxis and infection by an endoparasitic nematophagous fungus. *J. Gen. Microbiol.* 130:39–43.
- Joe, A., D. H. Hamer, M. A. Kelley, M. E. A. Pereira, G. T. Kensch, S. Tzipori, and H. D. Ward. 1994. Role of a Gal/GalNAc-specific sporozoite surface lectin in *Cryptosporidium parvum*-host cell interaction. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:44S.
- Knibbs, R., F. Perini, and I. J. Goldstein. 1989. Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. *Biochemistry* 28:6379–6392.
- Kramer, M. R., S. E. Marshall, V. A. Starnes, P. Gamberg, Z. Amitai, and J. Theodore. 1993. Infectious complications in heart-lung transplantation. Analysis of 200 episodes. *Arch. Intern. Med.* 153:2010–2016.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner, and A. Brakhage. 1998. Identification of a polyketide synthase gene (*pKsP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med. Microbiol. Immunol.* 187:79–89.
- Larcher, G., J. P. Bouchara, V. Annaix, F. Symoens, D. Chabasse, and G. Tronchin. 1992. Purification and characterization of a fibrinolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett.* 308:65–69.
- Li, E., W.-G. Yang, T. Zhang, and S. L. Stanley, Jr. 1995. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect. Immun.* 63:4150–4153.
- Madden, T. E., V. L. Clarck, and H. K. Kuramitsu. 1995. Revised sequence of the *Porphyromonas gingivalis* *prt* cysteine protease/hemagglutinin gene: homology with streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal proteinase. *Infect. Immun.* 63:238–247.
- McGavin, M. H., D. Krajewska-Pietrasik, C. Ryden, and M. Höök. 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.* 61:2479–2485.
- McWhinney, P. H., C. C. Kibbler, M. D. Hamon, O. P. Smith, L. Gandhi, L. A. Berger, R. K. Walesby, A. V. Hoffbrand, and H. G. Prentice. 1993. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years experience. *Clin. Infect. Dis.* 17:397–404.
- Mendes-Gianini, M. J. S., M. L. Taylor, J. B. Bouchara, E. Burger, V. L. G. Calich, E. D. Escalante, S. A. Hanna, H. L. Lenzi, M. P. Machado, M. Miyaji, J. L. Montero Da Silva, E. M. Mota, A. Restrepo, S. Restrepo, G. Tronchin, L. R. Vincenzi, C. F. Xidieh, and E. Zenteno. 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol.* 38(Suppl. 1):113–123.
- Monod, M., S. Paris, J. Sarfati, K. Jaton-Ogay, P. Ave, and J. P. Latgé. 1993. Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:39–46.
- Parta, M., Y. Chang, S. Rulong, P. Pinto-DaSilva, and K. J. Kwong-Chung. 1994. *HYPI*, a hydrophobin gene from *Aspergillus fumigatus*, complements the rodletless phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Infect. Immun.* 62:4389–4395.
- Peñalver, M. C., J. E. O'Connor, J. P. Martinez, and L. Gil. 1996. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64:1146–1153.
- Plotkowski, M. C., J. M. Tournier, and E. Puchelle. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infect. Immun.* 64:600–605.
- Ramphal, R., and M. Pyle. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 41:339–344.
- Ratanapo, S., W. Ngamjunyaporn, and M. Chulavatnatol. 1998. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). *Plant Sci.* 139:141–148.
- Ravindranath, M. H., H. H. Higa, E. L. Cooper, and J. C. Paulson. 1985. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* 260:8850–8856.
- Takahashi, Y., A. L. Sandberg, S. Ruhl, J. Muller, and J. O. Cisar. 1997. A specific cell surface antigen of *Streptococcus gordonii* is associated with bacterial hemagglutination and adhesion to α-2-3 linked sialic acid-containing receptors. *Infect. Immun.* 65:5042–5051.
- Thau, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J. P. Latgé, and S. Paris. 1994. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62:4380–4388.
- Townsend, R., E. Hilliker, Y. T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, and Y. C. Lee. 1982. Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz ¹H-NMR to characterize glucosidase-treated glycopeptides. *J. Biol. Chem.* 257:9704–9710.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, G. Larcher, J. C. Lisitzky, and D. Chabasse. 1993. Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. *Biol. Cell* 77:201–208.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, M. Ferron, G. Larcher, and D. Chabasse. 1995. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. *Can. J. Microbiol.* 41:714–721.
- Tronchin, G., K. Esnault, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse, and J. P. Bouchara. 1997. Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 65:9–15.
- Valkonen, K. H., M. Ringner, A. Ljungh, and T. Wadström. 1993. High-affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7:29–38.
- Vazquez, L., L. Jaramillo, R. Lascrain, E. L. Cooper, P. Rosas, and E. Zenteno. 1996. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B:355–359.
- Vazquez, L., G. Maldonado, C. Agundis, A. Pérez, E. L. Cooper, and E. Zenteno. 1997. Participation of a sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. *J. Exp. Zool.* 279:265–272.
- Virkola, R., J. Parkkinen, J. Hacker, and T. K. Korhonen. 1993. Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 61:4480–4484.

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

Filière : Biotechnologie
Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

L'étude de l'extraction et la purification d'une lectine à partir d'une souche fongique pathogène *Aspergillus fumigatus*

Résumé

Les lectines sont des protéines polyvalentes et ubiquitaires, elles se trouvent dans une variété d'organisme, y compris les animaux, les plantes, les champignons, les bactéries et les virus. Actuellement, les espèces fongiques pathogènes sont reconnues comme une source potentielle de nouvelles lectines ayant des applications biotechnologiques et thérapeutiques. Dans cette étude, nous nous intéressons à l'identification, l'extraction et la purification d'une lectine spécifique du fucose 32 kDa chez la souche *A. fumigatus*. L'extraction a été réalisée selon deux procédures : le broyage dans l'azote liquide et la sonification, à partir de conidies au repos ou gonflées, de tubes germinatifs et mycélium. L'activité la plus élevée a été obtenue par sonification de conidies au repos. Un test d'héماغglutination a été effectué pour les extraits précédents en utilisant des érythrocytes de lapin, les résultats ont montré une activité lectinique plus élevée dans les conidies au repos et gonflées et une activité plus faible dans les tubes germinatifs et le mycélium de 5 jours. D'autre part, le test d'inhibition de l'héماغglutination par l'implication des saccharides et des glycoprotéines a révélé la spécificité des lectines pour l'acide sialique. Ensuite, trois méthodes ont été utilisées pour la purification ; filtration sur gel qui a mis en évidence des fractions actives dans le second pic d'héماغglutination et le premier pic d'absorbance correspondant à [35-45], puis la chromatographie d'échange d'ions qui a démontré la présence d'une lectine dans l'intervalle [25mM- 3M] NaCl, et enfin la chromatographie d'interaction hydrophobe qui a enregistré l'activité de la lectine dans le pic correspondant au sulfate d'ammonium 0.1 M. L'analyse de ces fractions actives par SDS-PAGE a permis d'élucider la présence d'une masse moléculaire de 32 kDa correspondant à la lectine d'intérêt.

Mots clés : lectine (32 kDa), *A. fumigatus*, fucose, l'acide sialique, purification héماغglutination, extraction, chromatographie.

Membre du jury :

Président du jury :	Mme ABDELAZIZ .O	(MCB- UFM Constantine1)
Rapporteur :	Mr BOULAHROUF. K	(MCB- UFM Constantine1)
Examineurs :	Mme MEZIANI .M	(MAA- UFM Constantine1)

Présentée par : HAMMANI Doha & SAIGHI Hiba

Année universitaire : 2020-2021