



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master II  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé :

*L'extraction des lectines à partir des champignons:  
Ganoderma lucidum et Candolleomyces candolleanus  
et leurs caractérisations*

Présenté par : BOUHALI Soumia  
AMAMRA Dalal

Le : 15/09/2021

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme BAHIA

M.C.A UFM Constantine 1

Rapporteur: Mr NECIB Y

Professeur UFM Constantine 1

Examineur : Mme DJEMAI ZOUGHLACHE S

M.A.A UFM Constantine 1

Année universitaire

2020-2021

## **Remerciements**

Nos vifs remerciements, tout d'abord, au bon Dieu de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la persistance et la volonté pour achever ce travail.

En premier lieu, nous remercions notre laboratoire d'accueil : Génie-Microbiologie et Applications (GMA), faculté SNV, de l'université des frères Mentouri Constantine 1. Nous tenons à remercier Monsieur Necib Youcef, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, qui a accepté de nous encadrer. Merci à vous pour votre bienveillante attention qui nous accompagnée tout au long de ce travail et pour vos multiples conseils qui nous ont été précieux. Nous exprimons notre remerciement à Madame Torche Imène de nous avoir guidée jour après jour pendant notre travail et pour sa patience. Nous la remercions aussi pour ses qualités humaines d'écoute et de compréhension.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de Jury d'avoir accepté d'évaluer notre travail : Madame Bahi Ahlem, maitre de conférence A et Madame Djemai Zoughlache Soumia, maitre de conférence A, à l'université des frères Mentouri Constantine 1. Qu'elles trouvent ici le témoignage de notre reconnaissance.

Nous remercions la direction du Parc National Taza –Jijel-qui nous a programmé des sorties au niveau du parc pour la collecte de nos échantillons. Un merci particulier au garde forestier: Monsieur Ghribi Azzedine qui nous a accompagnés et qui a partagé avec nous ses vastes connaissances. Nous adressons nos remerciements aux mycologues français: Schwab Nicolas et Eyssartier Guillaume qui nous ont aidés à identifier nos champignons.

# Sommaire

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

## Etude Bibliographique

<b>1. Généralités sur les lectines</b> .....	<b>3</b>
1.1. Définition des lectines .....	3
1.2. Historique des lectines .....	3
1.3. Structure des lectines .....	6
1.4. Spécificité des lectines .....	7
1.5. Sites de reconnaissances des lectines .....	8
1.6. Distribution des lectines dans le monde vivant .....	9
1.7. Propriétés des lectines .....	12
1.8. Utilisation des lectines en recherche, diagnostic et thérapie .....	15
<b>2. Généralité sur <i>Ganoderma lucidum</i> et <i>Candolleomyces candolleanus</i></b> .....	<b>20</b>
2.1. Champignon <i>Ganoderma lucidum</i> .....	20
2.1.1. Description du <i>Ganoderma lucidum</i> .....	20
2.1.2. Classification systématique du <i>Ganoderma lucidum</i> .....	21
2.1.3. Utilisation du <i>Ganoderma lucidum</i> .....	21
2.2. Champignon <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	21
2.2.1. Description du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	22
2.2.2. Classification systématique du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	22
2.2.3. Utilisation du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	23
<b>3. Système sanguin</b> .....	<b>23</b>
3.1. Historique .....	23
3.2. Système ABO .....	23
3.3. Système rhésus .....	24
3.4. Structure chimique des antigènes des groupes sanguins du système ABO .....	24
3.5. Lectines spécifiques des groupes sanguins .....	25

## Matériels et Méthodes

<b>1. Matériels</b> .....	<b>26</b>
<b>1.1. Matériels fongiques</b> .....	26
<b>1.2. Matériels biologiques</b> .....	27
<b>1.3. Matériels techniques</b> .....	27
<b>2. Méthodes</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Etude phytochimique</b> .....	<b>28</b>
2.1.1. Préparation de différents échantillons .....	28
2.1.2. Préparation d'une suspension d'hématies du lapin à 4% .....	29
2.1.3. Test d'héماغglutination .....	30
2.1.4. Préparation des extraits bruts des échantillons <i>Ganoderma lucidum</i> et <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	30
2.1.5. Test limite d'agglutination de l'extrait brut du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	31
<b>2.2. Etude des caractéristiques des extraits de lectines</b> .....	<b>31</b>
2.2.1. Effet de température sur l'activité agglutinante .....	31
2.2.2. Effet du pH sur l'activité agglutinante .....	31
<b>2.3. Test d'inhibition d'agglutination par les glucides</b> .....	<b>32</b>
2.3.1. Test d'agglutination .....	32
2.3.2. Test limite d'inhibition d'agglutination par les glucides .....	32
<b>2.4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO</b> .....	<b>32</b>
2.4.1. Préparation de la suspension d'hématies à 4% .....	33
2.4.2. Test d'activité agglutinante .....	33
<b>2.5. Purification partielle des lectines du <i>Ganoderma lucidum</i> et du         <i>Candolleomyces candolleanus</i> par chromatographie sur colonne</b> .....	<b>33</b>
2.5.1. Préparation de la colonne .....	33
2.5.2. Séparation des lectines à partir des extraits .....	33
2.5.3. Spectrophotométrie à UV .....	33

## Resultats et Discussions

<b>1. Etude phytochimique</b> .....	<b>35</b>
1.1. Test d'héماغglutination .....	35
1.2. Test de limite d'agglutination de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	36

<b>2. Caractéristiques d'extrait de lectine du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....</b>	<b>38</b>
2.1. Effet de température sur l'activité agglutinante .....	38
2.2. Effet du pH sur l'activité agglutinante .....	41
<b>3. Test d'inhibition de l'activité agglutinante .....</b>	<b>44</b>
3.1. Test d'inhibition par les glucides .....	44
3.2. Test de la limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose .....	46
<b>4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Purification partielle de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....</b>	<b>48</b>

**Conclusion et Perspectives**

**Références Bibliographiques**

**Annexe**

# Liste des abréviations

**11 $\beta$ -HSD1** : Enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

**A549** : Human caucasian lung carcinoma cell line

**ADN**: Acide désoxyribonucléique

**Ca**: Calcium

**cm** : centimètre

**Con A** : Concanavaline A

**CRD** : Carbohydrate Recognition Domain

**Fuc** : Fucose

**g** : gramme

**Gal** : Galactose

**GalNAc**: N-acétylgalactosamine

**GlcNAc**: N-acétylglucosamine

**h** : heure

**HL-60**: Human Leukemia cell line

**KDa** : Kilo Dalton

**M** : molaire

**Man** : Mannose

**MCF-7** : human breast cancer cell line

**min** : minute

**ml** : millilitre

**mM** : milli Molaire

**NeuAc**: Acide N-acétylneuraminique

**nm** : nanomètre

**PAMPs**: Pathogen Associated Molecular Patterns

**PBS** : phosphate-buffered saline

**PDB** : Protein Data Bank

**pH**: Potentiel Hydrogène

**RE**: Réticulum endoplasmique

**Rh** : rhesus

**Rip** : Ribosome inactivating protein

**ROS**: Reactive Oxygen Species

**SMMC-7721** : Human hepatocellular carcinoma cell line

**SW-480** : human colon cancer cell line

**T** : température

**trs** : tours

**VIH**: Virus Immunodéficience Humaine

# Liste des Figures

<b>Figure 01 :</b> Représentation graphique d'un monomère de concanavine A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannosoïde .....	6
<b>Figure 02 :</b> Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza en complexe avec l'acide sialique .....	7
<b>Figure 03 :</b> Représentation schématique de différents fimbriales de la bactérie d' <i>Escherichia coli</i> .....	7
<b>Figure 04 :</b> Site de reconnaissance de la protéine RSL. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés noirs (code PDB 2BT9) .....	8
<b>Figure 05 :</b> Test d'agglutination pour la détection de lectine (A) inhibition d'agglutination prouvée par la présence de lectine et leur spécificité avec les glucides (B) .....	13
<b>Figure 06 :</b> Marquages positif (A) et négatif (B) par HPA biotinylé d'adénocarcinomes du poumon (Gx200) .....	16
<b>Figure 07 :</b> Schémas représentant le principe d'une puce à lectine .....	17
<b>Figure 08 :</b> Exemple d'un résultat de puce à lectine réalisé sur des cellules souches .....	18
<b>Figure 09 :</b> Structure des groupes sanguins du système ABO .....	25
<b>Figure 10 :</b> Schéma d'extraction de lectine à partir de différents échantillons .....	29
<b>Figure 11 :</b> Les hématies fixées du lapin à 4 .....	30
<b>Figure 12 :</b> Test d'hémagglutination des extraits bruts du <i>C.candolleanus</i> (A), <i>P.involutus</i> (B), <i>G.lucidum</i> (C), <i>C.aegerita</i> (D), <i>P.conchatus</i> (E), <i>E.nigricans</i> (F), <i>E.cinnabarinum</i> (G) et <i>L.betulina</i> (H) à température ambiante .....	35
<b>Figure 13 :</b> Limite d'agglutination de l'extrait brut du <i>Ganoderma lucidum</i> (A) et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> (B) .....	37
<b>Figure 14 :</b> Observation microscopique (G 40) d'hémagglutination par l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> (A) et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> (B) .....	37
<b>Figure 15 :</b> Limite d'agglutination des lectines d'extrait brut du <i>Ganoderma lucidum</i> chauffés à différentes températures .....	39
<b>Figure 16 :</b> Limite d'agglutination des lectines d'extrait brut du <i>Candolleomyces candolleanus</i> chauffés à différentes températures .....	39
<b>Figure 17 :</b> Détermination de la température optimale de la lectine du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	40

<b>Figure 18</b> : Effet du pH sur la limite d'agglutination d'extrait brut du <i>Ganoderma lucidum</i> à température ambiante .....	42
<b>Figure 19</b> : Effet du pH sur la limite d'agglutination d'extrait brut du <i>Candolleomyces candolleanus</i> à température ambiante .....	42
<b>Figure 20</b> : Determination du pH optimale de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	43
<b>Figure 21</b> : Test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait du <i>G. lucidum</i> par glucose (A), galactose (B), arabinose (C), mannose (D), lactose (E), maltose (F), cellobiose (G), glucosamine HCl (H) .....	45
<b>Figure 22</b> : Test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait du <i>C.candolleanus</i> par glucose (A), galactose (B), arabinose (C), mannose (D), lactose (E), cellobiose (F), maltose (G), glucosamine HCl (H) .....	45
<b>Figure 23</b> : Test de la limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose sur l'extrait du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	46
<b>Figure 24</b> : Profil de chromatographie sur gel sephadex G50 de l'extrait brut du <i>Ganoderma lucidum</i> .....	48
<b>Figure 25</b> : Profil de chromatographie sur gel sephadex G50 de l'extrait brut du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	48

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 01</b> : Historique et propriétés des lectines les plus connues .....	4
<b>Tableau 02</b> : Famille, origine et spécificité glucidique des lectines fongiques .....	11
<b>Tableau 03</b> : Principaux lectines commerciales .....	16
<b>Tableau 04</b> : Les groupes sanguins du système ABO .....	24
<b>Tableau 05</b> : Les groupes sanguins et leurs lectines spécifiques .....	25
<b>Tableau 06</b> : les champignons testés et leurs localisations .....	26
<b>Tableau 07</b> : Activité agglutinante des échantillons testés .....	35
<b>Tableau 08</b> : L'activité agglutinante de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	36
<b>Tableau 09</b> : Effet de la température sur l'activité agglutinante de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	38
<b>Tableau 10</b> : Effet du pH sur l'activité agglutinante de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> et du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	41
<b>Tableau 11</b> : Inhibition de l'activité hémagglutinante du <i>Ganoderma lucidum</i> par différents sucres .....	44
<b>Tableau 12</b> : Inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait du <i>Candolleomyces candolleanus</i> par différents sucres .....	45
<b>Tableau 13</b> : Limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose sur l'extrait du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	46
<b>Tableau 14</b> : Test d'hémagglutination de l'extrait du <i>Ganoderma lucidum</i> avec les érythrocytes humains ABO .....	47
<b>Tableau 15</b> : Test d'hémagglutination de l'extrait du <i>Candolleomyces candolleanus</i> avec les érythrocytes humains ABO .....	47
<b>Tableau 16</b> : Test d'hémagglutination des fractions 9 et 10 du <i>Ganoderma lucidum</i> .....	49
<b>Tableau 17</b> : Test d'hémagglutination des fractions 7, 8 et 10 du <i>Candolleomyces candolleanus</i> .....	49

# *Résumé*

## Résumé

Le but de cette étude est de fournir des informations concises sur les développements récents dans la compréhension des lectines fongiques. Les lectines sont des glycoprotéines qui peuvent être d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale. Elles sont capables d'interagir spécifiquement avec divers sucres avec un degré élevé de sélectivité et de former avec eux des liaisons non-covalentes et irréversibles.

Un screening a été réalisé sur huit champignons pour mettre en évidence la lectine recherchée: *Ganoderma lucidum*, *Panus conchatus*, *Exidia nigricans*, *Entonaema cinnabarinum*, *Candolleomyces candolleanus*, *Cyclocybe aegerita*, *Paxillus involutus* et *Lenzites betulina*. L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon PBS (0.1M, pH 7,4) pendant 24h à 4°C.

Parmi les huit champignons testés, on a basé dans notre étude sur deux espèces : *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus*. Les lectines extraites des deux espèces choisies ont montré une forte activité hémagglutinante contre les érythrocytes du lapin et humaines (les groupes sanguins du système ABO). Le traitement thermique des extraits bruts des deux espèces, à différentes températures pendant 1h, montre que la lectine du *Ganoderma lucidum* garde son activité agglutinante allant jusqu'à 60°C, cependant celle du *candolleomyces candolleanus* est thermorésistante car elle a conservé son pouvoir agglutinant pour 1h à 80°C. De plus, l'activité agglutinante des deux lectines fongiques étudiées n'est pas affectée par le pH compris entre 2 et 12. Le cellobiose inhibe l'activité agglutinante de la lectine du *Candolleomyces candolleanus* mais celle de la lectine du *Ganoderma lucidum* n'était pas inhibée par les sucres utilisés. La purification partielle des lectines de chaque champignon a été réalisée par chromatographie sur colonne (Séphadex G50), et qui a permis l'obtention d'un pic d'activité et un autre correspond à d'autres protéines pour chacun d'entre eux.

**Mots clés:** Lectine, glycoprotéine, champignons, *Ganoderma lucidum*, *Candolleomyces candolleanus*, activité agglutinante.

## Abstract

The aim of this study is to supply concise information about recent developments in understanding fungal lectins regarding their biological properties. Lectins are glycoproteins which can be of animal, plant, bacterial or viral origin. They are able to interact with diverse sugar structures with a high degree of selectivity.

A screening was carried out on eight fungi to highlight the desired lectin: *Ganoderma lucidum*, *Panus conchatus*, *Exidia nigricans*, *Entonaema cinnabarinum*, *Candolleomyces candolleanus*, *Cyclocybe aegerita*, *Paxillus involutus* and *Lenzites betulina*. The extraction was carried out by grinding and maceration in a PBS buffer solution (0.1M, pH 7.4) for 24 hours at 4°C. Among the eight fungi tested, we have focused on the two species «*Ganoderma lucidum*» and «*Candolleomyces Candolleanus*». Lectins extracted from the two selected species showed strong hemagglutination activity against rabbit and human blood types erythrocytes. Both of our lectin extracts doesn't have any specificity towards blood groups types of ABO system. The heat treatment of the crude extracts of the two species, at different temperatures for 1 hour, showed that *Ganoderma lucidum* lectin conserve its hemagglutination activity at temperature up to 60°C, however that of *Candolleomyces Candolleanus* is highly thermoresistant as it retains its activity for 1 h at 80°C. Further, hemagglutination activity of fongal lectins studied is unaffected by pH in the range 2–12. The hemagglutination inhibition test using eight sugars (D-glucose, D-galactose, D-arabinose, D-maltose, D-mannose, D-cellobiose, D-lactose and D-glucosamine HCl) showed that cellebiose inhibits the agglutination activity of *Candolleomyces Candolleanus* lectin. Whenever, that one of *Ganoderma lucidum* was not inhibited by the sugars used. The partial purification of the lectins from both mushrooms by column chromatography (Sephadex G50) gave two peaks for each one, the first one represents our lectins peak and the second refers to others proteins.

**Key words:** Lectins, glycoproteins, mushurooms, *Ganoderma lucidum*, *Candolleomyces Candolleanus*, hemagglutination activity.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو توفير معلومات موجزة عن التطورات الأخيرة في فهم الليكتينات الفطرية. الليكتينات هي عبارة عن بروتينات سكرية يمكن أن تكون من أصل حيواني، نباتي، بكتيري أو فيروسي. هذه البروتينات لها القدرة على التفاعل بشكل خاص مع السكريات المختلفة بدرجة عالية من الانتقائية وتشكيل روابط غير تساهمية معها.

تم فحص ثمانية فطريات بغرض الكشف على الليكتينات المطلوبة: *Ganoderma lucidum*, *Panus conchatus*, *Exidia nigricans*, *Entonaema cinnabarinum*, *Candolleomyces candolleanus*, *Cyclocybe aegerita*, *Paxillus involutus*, *Lenzites betulina*

من بين الفطريات الثمانية التي تم اختبارها، وقع الاختيار على نوعين: «*Ganoderma lucidum*» و «*Candolleomyces candolleanus*» لمواصلة دراستنا التطبيقية. أظهرت الليكتينات المستخرجة من كلا النوعين المختارين نشاطاً قوياً في التراص الدموي اتجاه الكريات الدموية الحمراء للأرانب وخلايا الدم الحمراء البشرية (فصائل الدم في نظام ABO). أظهرت المعالجة الحرارية للمستخلصات الخام لكلا النوعين (عند درجات حرارة مختلفة لمدة ساعة واحدة) أن لكتينات *Ganoderma lucidum* تحتفظ بنشاطها التراسي حتى 60 درجة مئوية، في حين أبدت لكتينات *Candolleomyces candolleanus* مقاومة للحرارة من خلال احتفاظها بنشاطها عند 80 درجة مئوية لمدة ساعة. بالإضافة إلى ذلك، فإن نشاط التراص لكلا الليكتينين الفطريين المدروسين لم يتأثر بالرقم الهيدروجيني بين 2 و 12. يثبط السيلوبيوز نشاط التراص للكتينات *Candolleomyces candolleanus*، في حين لكتينات *Ganoderma lucidum* لم يتم تثبيط نشاطها بواسطة السكريات المستخدمة. تم إجراء التنقية الجزئية لليكتينات كل من الفطرين المدروسين بواسطة تقنية الفصل الكروماتوغرافي (Sephadex G50)، والتي نتج عنها ذروتين لكل منهما، ذروة تمثل الليكتينات والأخرى تتمثل في بروتينات أخرى.

**الكلمات المفتاحية:** الليكتينات، البروتينات السكرية، الفطريات، *Ganoderma lucidum* ، *Candolleomyces candolleanus* ، النشاط التراسي.

# *Introduction*

## Introduction

Les interactions protéines-glucides jouent un rôle essentiel dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire. Ces interactions intercellulaires sont notamment assurées par des protéines particulières, d'origine non immunitaire, appelées lectines (**Lis H. et Sharon N., 1998**). Ces dernières ont la capacité de reconnaître et de se fixer spécifiquement de manière non covalente et irréversible, des structures oligosaccharidiques sans les transformer. Ces protéines sont présentes dans tout le règne vivant avec une très grande diversité structurale et jouent des rôles variés dans la vie sociale des cellules et les interactions avec l'environnement (**Sharon N. et Lis H., 2004**).

La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (**Rüdiger H., 1993**) et leur caractérisation (**Goldstein I.J. et al., 1980**). Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (**Arangao K.S., 2008**).

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié sans doute à leur capacité unique de lire l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Elles peuvent interagir avec des systèmes biologiques, et développer une diversité d'évènements et fonctions dans des organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus pathologiques (**Lis H. et Sharon N., 1998**).

Aujourd'hui elles sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical :

Par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués (**Hirabayashi J., 2004**). Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd W.C. et Shapleigh E., 1954**), et sont utilisées pour leur identification dans des banques du sang. Certaines lectines purifiées à partir de graines de légumineuses tropicales présentent des activités anti-inflammatoires (**Alencar N.M. et al., 2005**), d'autres encore purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histo-chimiques, puisque certaines maladies, tel le cancer, sont associées à une modification des glycanes sur les cellules (**Guillot J. et al., 2004**). Parmi les rôles joués par les lectines des plantes, l'hypothèse la plus probable est leur implication dans la défense du végétal contre les phytopathogènes (ou contre

les animaux qui peuvent se nourrir de la plante), mais d'autres possibilités ont été considérées (**Rudiger H. et Gabius H.J, 2001**).

Les lectines fongiques ont suscité ces dernières années un intérêt particulier motivé par la découverte de leurs propriétés pharmacologiques intéressantes, comme la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et l'hypercholestérolémie, mais aussi antivirales et anti-cancéreuses (**She Q.B. et al., 1988; Sze S.C.W et al., 2004**).

Dans notre étude, nous avons procédé à un screening de divers champignons pour trouver une espèce à fort rendement en lectine ainsi que son étude biologique.. Pour cela, huit champignons sont testés : *Candolleomyces candolleanus*, *Cyclocybe aegerita*, *Panus conchatus*, *Paxillus involutus*, *Entonaema cinnabarinum*, *Ganoderma lucidum*, *Exidia nigricans* et *Lenzites betulina*.

L'objectif de ce travail se décompose en plusieurs étapes :

- ❖ Etude de la présence des lectines par le test d'hémagglutination avec les érythrocytes des lapins.
- ❖ Etude de l'effet du traitement thermique et du pH sur la stabilité de l'activité de ces lectines.
- ❖ Etude de l'affinité de ces lectines vers les glucides par le test d'inhibition d'une part et vers les globules rouges de l'être humain par le test ABO d'autre part.
- ❖ Purification partielle en utilisant la chromatographie par gel filtration (Sephadex G-50).

# *Revue Bibliographique*

### 1. Généralités sur les lectines :

#### 1.1. Définition des lectines:

Le terme « lectine » a été présenté par Boyd et Shapleigh en 1954, dérivée du mot latin « légère », qui indique « sélectionner » ou bien « choisir » (**Boyd W.C. et Shapleigh E., 1954**).

Les interactions protéines-glucides jouent un rôle essentiel dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire. Ces interactions intercellulaires sont notamment assurées par des protéines particulières, d'origine non immunitaire, appelées lectines (**Lis H. et Sharon N., 1998**). Elles ont la capacité de reconnaître et de fixer spécifiquement de manière non covalente et réversible, des structures oligosaccharidiques sans les transformer (**Sharon N. et Lis H., 2004**).

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins W. et Evrard C. M., 2003**). L'abondance de ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

#### 1.2. Historique des lectines:

Vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, des preuves de la présence dans la nature de protéines qui possèdent la capacité d'agglutiner les érythrocytes, ont commencé à s'accumuler. À l'époque et au regard de leurs provenances essentiellement d'extrait de plantes, ces protéines sont appelées phyto-agglutinines ou hémagglutinines. Les prémices de la découverte des hémagglutinines viennent avec la description et l'isolement vers 1888 par Peter Hermann Stillmark d'une protéine hautement toxique extraite de *Ricinus communis* et baptisée ricine (**Sharon N. et Lis H., 2004**).

Par la suite, H. Hellin a démontré la présence d'une autre hémagglutinine toxique, l'abrine, dans des extraits *Abrus precatorius*. Les recherches menées simultanément avec ses deux lectines ont ainsi montré la spécificité de la réponse et le phénomène de la mémoire immunologique, et le transfert de l'immunité humorale.

L'extraction et la purification en 1919 de la concanavoline A à partir de *Canavalia ensiformis* par James B. Sumner a marqué le début d'une nouvelle pour la recherche des hémagglutinines (**Sharon N. et Lis H., 2004**).

Entre 1954 et 1956, Olavi Mäkelä, alors doctorant à Renkonen, a examiné des extraits de graines représentant 743 espèces végétales de 165 genres, tous de la famille des légumineuses, et a détecté une activité hémagglutinante dans plus d'un tiers d'entre eux, et près d'un dixième des hémagglutinines exposaient une spécificité pour un groupe sanguin (**Ando T. et al., 2001**). La

capacité des agglutinines de plantes à distinguer entre les érythrocytes de différents groupes sanguins conduit à proposer pour eux le nom des lectines, du latin *legere* ce qui signifie « choisir, discriminer ». Ce terme a été généralisé par la suite pour englober toutes les protéines d'origine non immune qui lient des structures saccharidiques de manière réversible et ne possédant pas d'activité enzymatique (Sharon N. et Lis H., 2004).

Dans les années 1960, l'attitude de la communauté scientifique envers les lectines, particulièrement les biochimistes et les immunologistes, a changé. Les scientifiques se sont penchés sur l'aspect structural des lectines. Ces études vont de la caractérisation physico-chimiques des lectines au séquençage des acides aminés et l'élucidation de leur structure 3D (Sharon N. et Lis H., 2004).

En 1970, a été introduite la purification des glycoprotéines basée sur les lectines immobilisées (Donnelly E.H. et Goldstein I.J., 1970). Depuis lors, l'intérêt que portent les scientifiques aux lectines ne cesse d'augmenter. Les lectines représentent des réactifs extrêmement précieux pour l'investigation des sucres aux surfaces cellulaires, l'évaluation du rôle de ceux-ci dans la croissance cellulaire et la différenciation, l'analyse des interactions des cellules avec leur environnement et l'étude de leurs implications dans divers processus pathologiques (Sharon N. et Lis H., 2004).

**Tableau 01:** Historique et propriétés des lectines les plus connues (Bouteldja H. et Ynineb L.E., 2019).

Année	Chercheur	Découverte
1884	Warden&waddel / Bruyllant&Venneman	La toxicité de la graine de <i>l'Arbusprecatorius</i>
1886	Dixon	Toxicité de la graine de <i>Ricinuscommunis</i>
1888	Stillmark	Activité hémagglutinine de la graine de <i>Ricinuscommunis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1891	Hellin	Activité hémagglutinine de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum

1917	James B. Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A (Con A)
1926-1927	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1936	Summer&Howell	La spécificité de la concavoline au sucre
1947-1949	Boyd &Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de <i>Phaseolus Vulgaris</i>
1949	Jaffé	Inactivation thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolusvulgaris</i>
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd&Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolusvulgaris</i>
1965	Agrawal &Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des Lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi&Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d'E.Coli
1988	D'Oliveira et al	Usage des lectines dans le traitement des pathologies Pancréatiques
1995	Hirokazu ka wagishi	Les lectines chez les champignons (mushroom lectins.2015)
2002	Hexiang Wang et al	L'isolement d'une nouvelle heterodimerique lectine avec une activité mitogenique à partir d'un champignon : <i>Agrocybecylindracea</i>
2003	M.W. Turner	Le rôle de la lectine liant le mannose dans le traitement et les maladies
2004	Ilka M. Vasconcelos José &Tadeu A. Oliveira	L'activité anti-nutritionnelle des lectines végétales(Antinutritional properties of plant lectins - Toxicon 44 (2004) 385–403)

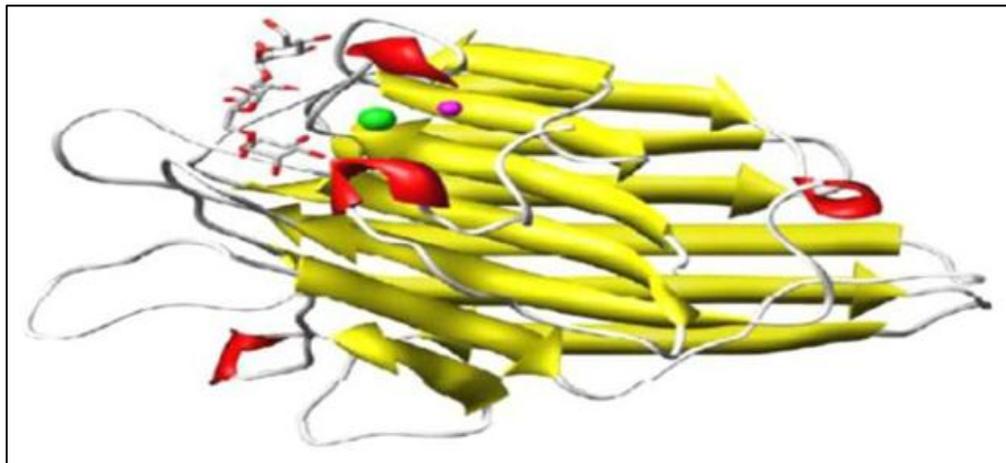
2011	Poiroux Guillaume	Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photo chimiothérapie
2015	Yau Sang Chan &Tzi Bun Ng	Lectine avec un grand potentiel d'inhibition des cellules cancéreuses mammaliennes du champignon comestible de l'espèce : <i>Dioscoreaopposita cv.</i> de larégion Nagaimo au japon

### 1.3. Structure des lectines:

Les lectines sont classées en trois grandes classes :

#### 1.3.1. Lectines simple:

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 40KDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (Šnajdrová L., 2006) (figure 01).

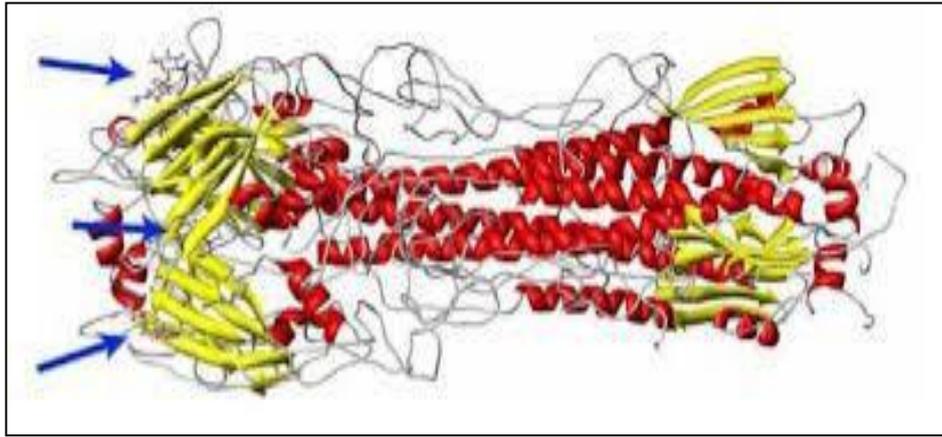


**Figure 01 :** Représentation graphique d'un monomère de *concanavaline A* de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Šnajdrová L., 2006).

La protéine est représentée par un ruban rouge pour les hélices  $\alpha$ , un ruban jaune pour les brins  $\beta$  et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Šnajdrová L., 2006).

#### 1.3.2. Lectines en mosaïques:

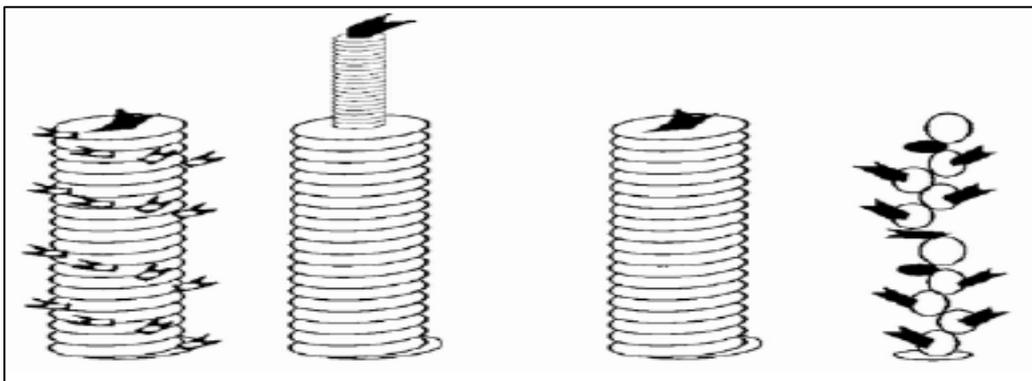
Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs types de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Šnajdrová L., 2006) (Figure 02).



**Figure 02 :** Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Šnajdrová L., 2006).

### 1.3.3. Assemblages macromoléculaires:

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, appelées fimbriale ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbriale est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriale (Šnajdrová L., 2006) (Figure 03).



**Figure 03 :** Représentation schématique de différents fimbriale de la bactérie *d'Escherichia coli* (Lis H. et Sharon N., 1998).

### 1.4. Spécificité des lectines:

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation. Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides (Robert K. et Marry M.D., 2008).

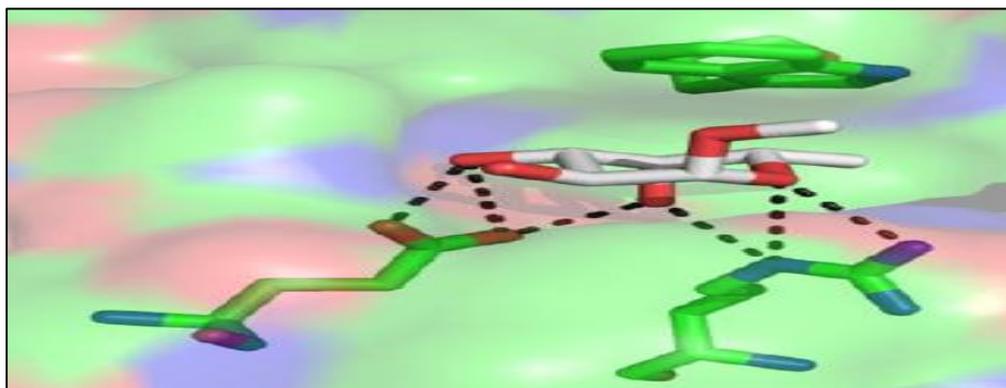
Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq classes en fonction de leur maximum d'affinité pour le mannose (Man), le galactose (Gal) ou N-

acétylgalactosamine (GalNAc), la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) ou l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (Lis H. et Sharon N., 1998). Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (Park S. et al., 2008).

### 1.5. Sites de reconnaissance des lectines:

Les lectines possèdent toutes des «domaines de reconnaissance des glucides» (CRD) qui ont évolués à partir de gènes ancestraux, souvent en conservant les caractéristiques spécifiques de la séquence primaire d'acides aminés et de la structure tridimensionnelle. Malgré ces ressemblances au niveau des séquences ou des structures à l'intérieur d'une famille de lectine, les structures de glycanes reconnus peuvent être très diverses. L'affinité d'un seul site de liaison est faible (avec des valeurs de Kd de l'ordre du millimolaire), bien que certaines lectines reconnaissent certains glycanes avec une affinité beaucoup plus élevée (avec des valeurs de Kd dans la gamme du micromolaire). Pour les lectines avec une faible affinité, les interactions multivalentes entre une protéine et plusieurs glycanes sont souvent nécessaires pour produire des interactions de haute avidité (Imberty A. et Varrot A., 2008).

L'analyse des structures cristallographiques de complexes protéines/glucides, indique que les lectines ont des propriétés et modes de reconnaissance des glucides variés. Les sites de fixations des lectines au niveau structural sont souvent des poches peu profondes. La grande majorité des forces impliquées dans les reconnaissances des glucides est représentée par des liaisons hydrogène et des forces de Van der Waals (Figure 04) (Ashton A.W. et al., 1997).



**Figure 04:** Site de reconnaissance de la protéine RSL. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés noirs (code PDB 2BT9) (Kostlánová N. et al., 2005).

### 1.6. Distribution des lectines dans le monde vivant:

#### 1.6.1. Lectines des plantes:

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

##### ➤ Mérolectines:

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

##### ➤ Hololectines:

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

##### ➤ Chiméroléctines:

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

##### ➤ Superlectines:

Les superlectines sont un type particulier de chiméroléctines, elles sont des protéines de fusion constituées de deux domaines de liaison à base de glucides en mosaïque qui sont structurellement différents et reconnaissent des sucres structurellement non reliés, actuellement, une seule superlectine a été décrite, provenant des graines de tulipes.

#### 1.6.2. Lectines des algues marines:

À ce jour, il y a moins de 100 publications décrivant la présence de lectines dans les macroalgues rouges, vertes et marron. De plus, comparées aux plantes terrestres supérieures, les lectines d'algues marines ont été isolées et caractérisées à un rythme beaucoup plus faible depuis le premier rapport d'activité hémagglutinante dans ces organismes apparu il y a plus de 50 ans (**Boyd W.C. et al., 1966**). Par la suite, d'autres études décrivant la présence et / ou la purification des lectines d'algues ont été signalées par des groupes d'Angleterre, du Japon, de l'Espagne, des États-Unis et du Brésil etc...

Jusqu'à présent, la présence de lectines a été analysée dans environ 800 espèces d'algues. Cependant, ce nombre est encore petit, étant donné qu'il existe des milliers d'espèces d'algues

marines. La recherche montre qu'environ 60% des espèces analysées présentent une activité hémagglutinante. Le nombre d'espèces positives pourrait être plus élevé puisque dans les premières projections, les auteurs utilisaient un nombre limité de globules rouges et sans érythrocytes traités par des enzymes (**Teixeira P.J. et al., 2012**).

Bien que les lectines d'algues marines présentent un contenu protéinique similaire aux lectines provenant de plantes terrestres, elles diffèrent dans certains aspects. Les premières publications sur ce sujet ont révélé qu'en général, les lectines d'algues possèdent des masses moléculaires faibles, pas d'affinité pour les monosaccharides, une forte spécificité pour les oligosaccharides complexes et / ou les glycoprotéines. En outre, ils semblent n'avoir aucune exigence pour les ions métalliques, montrant une teneur élevée en résidus acides et même à de fortes concentrations tendent à rester sous forme monomère. Cependant, il existe quelques rapports montrant que certaines de ces molécules peuvent être inhibées par des sucres simples et sont dépendantes des cations comme cela a été montré pour les lectines du genre algue marin vert, *Codium* (**Rogers D.J. et Hori K., 1993**), et le genre algue marin rouge, *Ptilota* (**Sampaio A.H. et al., 1998**).

Même avec l'augmentation des publications liées aux lectines d'algues marines, les informations biochimiques et structurelles sur les lectines d'algues sont rares et ne sont que de quelques espèces et, par conséquent, la classification fonctionnelle et phylogénétique de ces lectines reste incertaine. L'information structurelle disponible indique l'existence de différentes protéines liant les glucides dans les algues marines étudiées. De plus, les séquences d'acides aminés complètes de seulement 14 lectines d'algues ont été déterminées. Dans les algues marines rouges, la lectine de *Bryothamnion Triquetrum* (BTL) a été la première lectine à déterminer sa structure primaire (**Calvete J.J. et al., 2000**).

### **1.6.3. Lectines des champignons :**

Les champignons, y compris les moisissures et les champignons proprement dits, font partie d'une importante classe d'organismes. De part leurs propriétés nutritionnelles, les champignons ont toujours gardé une place importante dans notre alimentation, dans nos traditions gastronomiques mais également dans la médecine, spécialement dans la médecine traditionnelle orientale. N'étant pas capable d'utiliser la photosynthèse comme les plantes ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils se nourrissent et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, qui à première vue peuvent apparaître très simples, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui confèrent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques. Parmi les protéines

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

L'intérêt montré dans les dernières années pour les lectines de champignons est principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (Sze S.C.W. et al., 2004). L'abondance de lectines dans les champignons est tout a fait remarquable et un test d'agglutination conduit sur plus de 400 spécimens a permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés (Pemberton R.T., 1994).

**Tableau 02 :** Famille, origine et spécificité glucidique des lectines fongiques (Hündling D., 2015).

Famille	Nom/origine	spécificités
Galectines	AAL/ <i>Agrocybe aegerita</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
	AGC/ <i>Agrocybe cylindracea</i>	Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
	CCG <i>Coprimus cinereus</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
Lectines de type R	CNL/ <i>Clitocybe nebularis</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
	PPL/ <i>Pleurocybella porrigens</i>	GalNAc
	PSL/ <i>Polyporus squamosus</i>	Sia $\alpha$ 2-6Gal
	MOA/ <i>Marasmius oreades</i>	Gal $\alpha$ 1-3Gal
	MPL/ <i>Macrolepiota procera</i>	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
Corps de fructification Actinoporin-like	ABA/ <i>Agaricus bisporus</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc, GlcNAc
	BEL/ <i>Boletus edulis</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
	SRL/ <i>Sclerotium rolfsii</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
	XCL/ <i>Xercomus chrysenteron</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
Corps de fructification Béta-propelier	PVL/ <i>Psathyrella velutina</i>	Glc $\beta$ 1-4GalNAc
	AAL/ <i>Aleuria aurantia</i>	Fuc $\alpha$ 1-6 GlcNAc
	AFL/ <i>Aspergillus fumigatus</i>	Fuc $\alpha$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4)GlcNAc
	AOL/ <i>Aspergillus oryzae</i>	Fuc $\alpha$ 6 GlcNAc

### 1.6.3.1. Caractéristiques :

Les lectines fongiques qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en terme de taille (12-190 kDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines. De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc... Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée (**Santos A.F. et al., 2014**).

### 1.6.3.2. Rôles :

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

## 1.7. Propriétés des lectines:

Les lectines présentent des fonctions biologiques très diverses selon les organismes où elles se trouvent. Chez les plantes, elles agissent, par exemple, en tant que molécules de défense dans le contrôle de l'homéostasie et la symbiose des plantes avec des bactéries nitrifiantes. Chez les animaux, elles ont essentiellement un rôle dans les processus de reconnaissance cellulaire. Elles sont impliquées dans des activités biologiques diverses telles que la cytotoxicité, l'adhésion cellulaire, les interactions cellule-matrice, l'induction de l'apoptose ou l'agglutination des cellules et des bactéries (**Danguy A. et al., 2002**).

### 1.7.1. Interaction lectine-glucide:

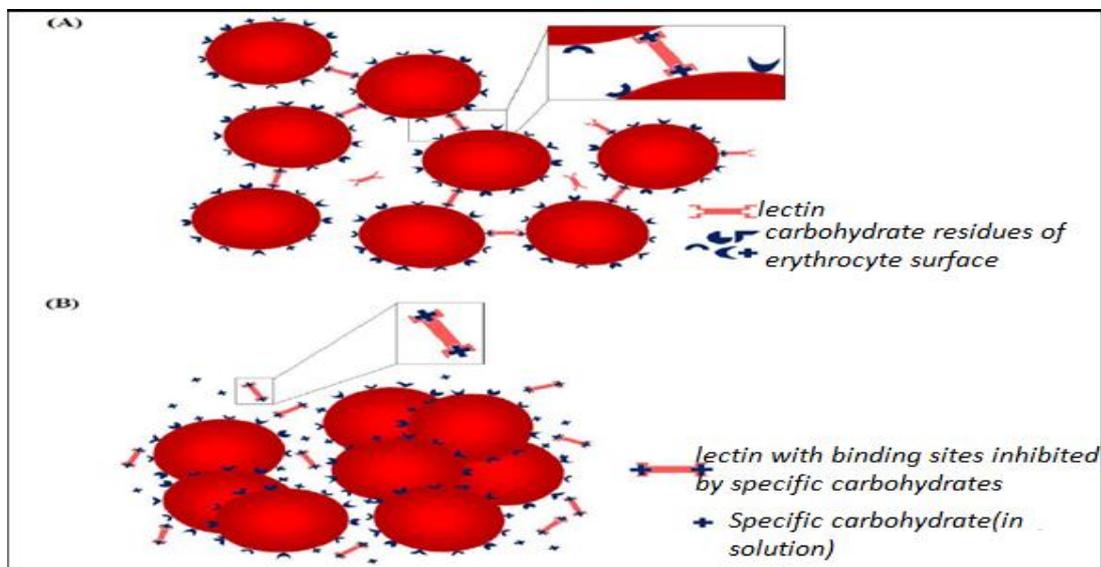
Cette interaction est spécifique et propre à chaque lectine, la mise en évidence de l'activité de la lectine est conditionnée par la connaissance du sucre spécifique (**Miyoshi M. et al., 1982**). Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation. Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leurs spectre de spécificité (**Aragão K. S., 2008**).

La cavité de reconnaissance glycanique qui constitue les lectines possède une plasticité leur permettant d'interagir de manière plus spécifique avec certains glycoconjugués que d'autres (**Jain D. et al., 2001**), les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine interagissent avec ces glycanes par des liaisons non-covalentes (**Jeyaprakash A.A. et al., 2003**).

Plusieurs lectines possèdent des sites de liaison pour les glucides. L'interaction qui se produit entre les lectines et les glucides présents sur la surface des hématies résulte en une aggrégation d'un grand nombre de ces cellules, cette caractéristique est typique des lectines (**Aragão K. S., 2008**).

### 1.7.2. Agglutination des cellules :

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, champignon, mycoplasme). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans W. J. et Van Damme E. J., 1995**). Le processus est illustré à la figure ci-dessous (**Figure 05**).



**Figure 05:** Test d'agglutination pour la détection de lectine (A) inhibition d'agglutination prouvée par la présence de lectine et leur spécificité avec les glucides (B) (**Santos A.F. et al., 2014**).

### 1.7.3. Propriété antibactérienne:

Les lectines sont des outils de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**Tanne A. et Neyrolles O., 2010**). Les lectines animales comme les lectines

récepteurs des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries. Aussi bien pour les lectines de type C qui résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (Singh N. et Cohen P.L., 2012). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (Xu S. et al., 2014).

### 1.7.4. Activité mitogène:

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (Nachbar M.S. et Oppenheim J.D., 1980).

### 1.7.5. Propriété antivirale:

Les lectines interviennent dans la fixation et l'inhibition de la réplication des virus au cours des infections virales (Xu S. et al., 2014), ils sont également impliqués dans la détection des molécules pathogènes tel que les (PAMPs) associées au virus (Kawamura T. et al., 2014). Ces protéines sont aussi capables d'inhiber l'enzyme rétro transcriptase du VIH-1 et par conséquent bloquer l'infection induite par ce dernier (Tanaka H. et al., 2009).

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice antiVIH. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus Tortifolious* (Zitouni A., 2015).

### 1.7.6. Propriété antifongique:

Parmi le grand nombre des lectines purifiées seulement une petite portion d'elles a une activité antifongique et qui reste indirect, seuls les lectines qui ont un domaine catalytique ayant cette activité, principalement elles appartiennent à la classe I des chitinases (Ang A.S.W. et al., 2014). Les lectine de *Phaselous vulgaris cv* ont une activité fongicide contre *Valsa mali* (Lam S.K. et Ng T.B., 2010). La même propriété est présentée par les lectines de *Tinospora tomentosa* qui ont une action inhibitrice sur la croissance du champignon *Aspergillus niger* (Saha R.K. et al., 2014).

### 1.7.7. Activité anti-oxydante et immunitaire:

Le stress oxydant est reconnu comme une altération de l'homéostasie redox cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables du dysfonction et de

la mort cellulaire, il est actuellement prouvé que les ROS sont de véritables seconds messagers impliqués dans l'expression de gènes et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire (**Dhalla N.S. et al., 2000**). Les antioxydants naturels peuvent avoir des pièges à radicaux libres, des agents réducteurs, les extincteurs de l'oxygène singulet, etc... Des études antioxydantes in vitro ont montré clairement que la lectine des champignons, endophytes, *Aspergillus flavus*, *Fusariumoxysporum*, *Fusariummoniliforme*, *Trichotheciump sp.* Possèdent des activités antioxydantes plus importantes in vitro que la lectine de l'extrait du champignon *Album viscum* (**Sadananda T.S. et al., 2014**).

Les lectines ont des effets pro et anti inflammatoires et provoquent l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbar M.S. et Oppenheim J.D., 1980**).

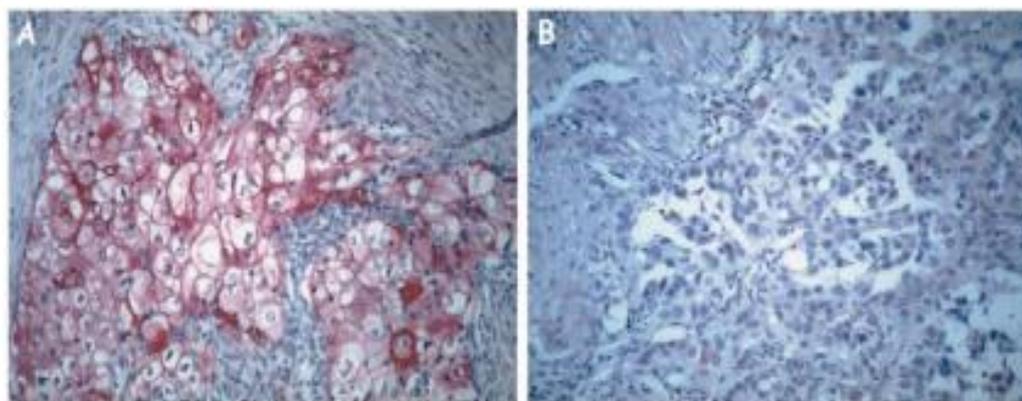
Les lectines forment des signaux de production des cytokines comme est le cas des lectines de *Viscum album L.* qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages et elles modulent la repense immunitaire par réduction des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- $\alpha$ ) (**Lee J.Y. et al., 2007**).

### **1.8. Utilisation des lectines en recherche, diagnostic et thérapie:**

#### **1.8.1. Histopathologie:**

Les lectines peuvent être utilisées en histopathologie afin de marquer spécifiquement des cellules présentant des glycosylations particulières. Les principales lectines isolées de plantes ou d'invertébrés sont présentées dans le (**Tableau 03**). Elles sont employées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie ou, plus généralement, en histopathologie (**Figure 06**). (**Guillot J. et al., 2004**). De par leur spécificité, les lectines se lient préférentiellement à un monosaccharide soit situé au bout de la chaîne soit placé dans une position non terminale des oligosaccharides complexes.

Depuis maintenant plus de vingt ans, la lectine HPA, extraite de l'escargot de bourgogne est utilisée en histopathologie comme marqueur de plusieurs cancers, dont les adénocarcinomes du sein, de l'estomac, du côlon, du poumon mais aussi pour les mélanomes (**Cioci G. et al., 2006**). Cette lectine a la particularité de reconnaître spécifiquement des glycoépitopes présents à la surface des cancers primaires, associés au développement de métastases notamment dans les ganglions lymphatiques impliquant à court terme un mauvais pronostic vital et un raccourcissement de la vie des patients. Elle est également capable de se fixer sur des épitopes présents sur les cellules ayant déjà métastasées (**Arnaud J., 2014**).



**Figure 06:** Marquages positif (A) et négatif (B) par HPA biotinylé d'adénocarcinomes du poumon. Grossissement x200(Kolatkar A.R. et al., 1998).

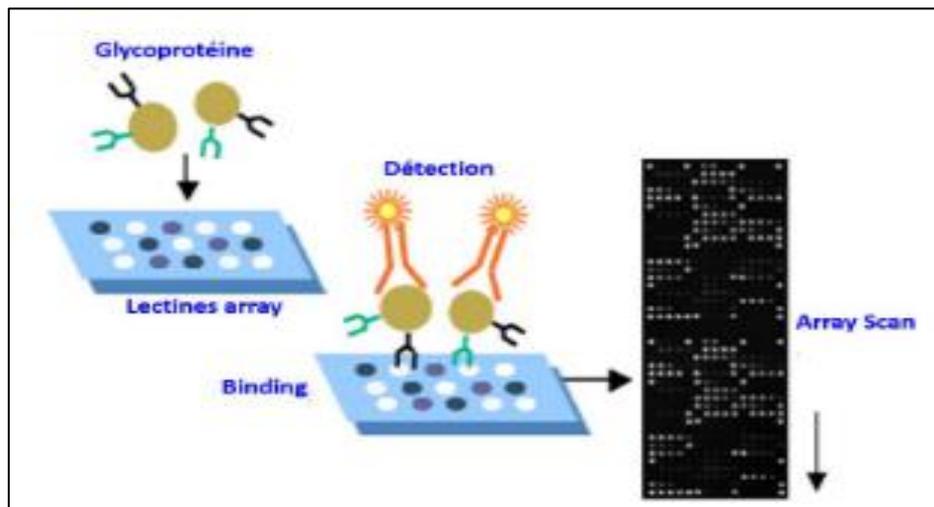
**Tableau 03:** principaux lectines commerciales (Arnaud J., 2014).

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	Lycopersicum esculentum	D-GlcNAc
PWL	Phytolacca americana	D-GlcNAc
WGA	Triticum vulgare(Wheat germ)	D-GlcNAc
STA	Solanum tuberosum	D-GlcNAc
L-PHA	Phaseolus vulgaris	-GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ -
GSI-B4	Griffonia (Bandeira) simplicifolia	D-Gal
MPA	Maclura pomifera	D-Gal
DBA	Dolichos bifloris	D-GlcNAc
LBL	Phaseolus lunatus (Lima bean)	D-GlcNAc
RCA-1	Ricinus communis	D-GlcNAc
SBA	Glycine max	D-GlcNAc
HAA	Helix aspersa	D-GlcNAc
HPA	Helix pomatia	D-GlcNAc
VVA-B4	Vicia villosa	D-GlcNAc
WFA	Wistaria floribunda	D-GlcNAc
ECA	Erythrina crista-galli	D-Gal $\beta$ 1-4D-GlcNAc
PSL	Laetiporus sulfureus	D-Gal $\beta$ 1-4D-GlcNAc
GSI-A4	Griffonia (Bandeira) simplicifolia	D-Gal $\beta$ 1-4D-GlcNAc
ABL	Agaricus bisporus	D-Gal $\beta$ 1-3-GalNAc

PNA	Arachis hypogaea	D-Galβ1-3D-GalNAc
JAC	Artocarpus integrifolia	D-Galβ1-3D-GalNAc
LDL	Lactarius deliciosus	D-Galβ1-3D-GalNAc
VGA	Vicia graminea	D-Galβ1-3D-GalNAc
EEA	Euoymus europacus	D-Galα1-3(L-fuca1-2)D-Galβ1-3/4D-GlcNAc

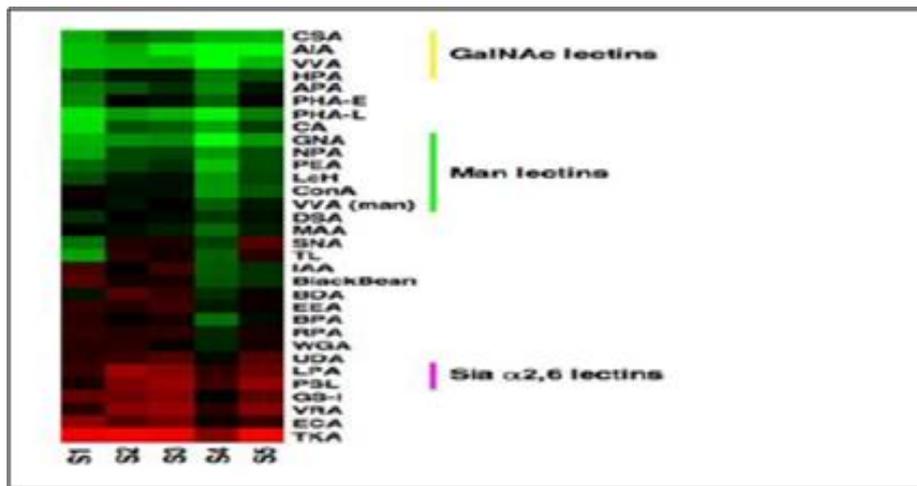
**1.8.2. Puces à lectines :**

Une des principales techniques qui permet l'étude des glycanes est la spectrométrie de masse. Elle a l'avantage de donner des informations détaillées sur la structure des glycanes. Mais son plus gros inconvénient est le faible débit de cette technique pour étudier le glycome. Ainsi la technique de puce à lectines et à anticorps dirigés contre les sucres a été mise au point. Il s'agit d'une méthode à haut débit mais qui donne beaucoup moins de détails structurels. Les lectines possèdent une gamme de spécificité: certaines reconnaissent un monosaccharide particulier dans pratiquement tous les contextes, alors que d'autres sont très spécifiques pour une séquence oligosaccharidique particulière. Certains épitopes ne sont reconnus par aucune lectine naturelle, et nécessitent la génération d'anticorps monoclonaux (Arnaud J., 2014).



**Figure 07:** Schémas représentant le principe d'une puce à lectine (Arnaud J., 2014).

Les puces à lectines utilisent la même architecture que les puces à glycanes. Les lectines ou les anticorps sont spatialement répartis sur une puce en verre par fixation covalente (Tableau 04). Les glycoprotéines du lysat de cellules d'intérêt sont marquées avec un colorant fluorescent de manière non spécifique. L'échantillon est ensuite incubé avec la matrice, une analyse de la fluorescence est ensuite réalisée et de la fluorescence associée à chaque pixel est quantifiée. Le motif de points lumineux reflète la glycome de l'échantillon particulier (Figure 07). Afin de comparaison, deux échantillons peuvent être analysés en parallèle, l'un marqué avec un colorant vert et l'autre avec un colorant rouge exemple (Figure 08) (Arnaud J., 2014).



**Figure 08:** Exemple d'un résultat de puce à lectine réalisé sur des cellules souches (Pilobello K.T. et al., 2007).

### 1.8.3. Vectorisation:

En s'appuyant sur la spécificité de reconnaissance glycanique de certaines lectines, il est possible de les utiliser pour le ciblage de cellules tumorales. De plus, leur capacité à être endocytées en font des vecteurs intéressants qui permettraient de faciliter la délivrance intracellulaire de médicaments. Les glycotopes des cellules cancéreuses discutés dans le chapitre précédent représentent des cibles potentielles pour les lectines endogènes comme les galectines, ou exogènes comme les lectines végétales (Rhodes J.M. et al., 2008). Par exemple, la lectine d'arachide PNA (spécifique de l'antigène T) pourrait être utilisée comme vecteur d'agents de détection des cancers du côlon. Sur un modèle de cancer colorectal murin, la délivrance de PNA couplée à un agent d'imagerie permet de distinguer les cellules cancéreuses des cellules saines environnantes (Sakuma S. et al., 2009).

De même, il a été montré in vivo l'intérêt de la PHA de *Phaseolus vulgaris* pour la délivrance d'ADN au niveau de tumeurs sur exprimant des glycanes branchés en 1-6-GlcNAc à leur surface (Kasuya T. et al., 2008). L'intérêt de la lectine de blé WGA a été mis en évidence pour la délivrance d'agents anticancéreux dans des tumeurs du cerveau. L'inconvénient majeur du traitement chimiothérapeutique des tumeurs cérébrales est la difficulté des agents anticancéreux à traverser la barrière hémato-encéphalique. L'association de la WGA à des liposomes contenant du topotecan et du tamoxifène permet d'améliorer la délivrance de ces drogues dans des tumeurs du cerveau chez le rat. L'injection i.v. de ces liposomes double le temps de survie de rats porteurs de gliomes (Du J. et al., 2009).

### 1.8.4. Agents thérapeutiques:

Les lectines sont généralement considérées comme des substances toxiques uniquement destinées à être utilisées comme outils d'analyse des glycoconjugués. Cependant, des études

récentes ont montré leur intérêt dans le traitement des cancers. Les mécanismes d'action anti-tumoraux des lectines se résument plusieurs phénomènes : interaction membranaire et endocytose; cytotoxicité par induction de l'apoptose ou de l'autophagie; inhibition de la prolifération cellulaire ; stimulation du système immunitaire; inhibition de l'angiogenèse (**Elluru S.R. et al., 2009**).

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie, ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Khil L.Y. et al., 2007**). L'apoptose semble être le mécanisme clé de l'effet toxique in vitro des lectines, et peut être engagée par différents mécanismes selon les lectines. De plus, leurs spécificités de reconnaissance glycanique en font des vecteurs intéressants pour le ciblage de médicaments anticancéreux. Les études cliniques, les plus nombreuses ont été réalisées avec des extraits de gui (*Viscum album*) contenant la lectine VAA1 qui est spécifique du galactose et appartient à la famille de la ricine B. Les homologues recombinantes, aViscumine ou rViscumine, sont en cours de tests chez des patients atteints de cancer (**Schöffski P. et al., 2004**).

### 1.8.5. Compréhension du trafic Cellulaire:

La capacité des lectines à interagir avec les glycoconjugués de la membrane cellulaire et en particulier avec les glycolipides, en font des outils intéressants pour l'étude du trafic cellulaire, plus particulièrement dans le cas où des anticorps contre les marqueurs organistiques n'ont pas été développés (**Arnaud J., 2014**).

Dans une étude récente, portant sur la stabilité et la localisation d'une glycosyltransférase du Golgi, la lectine GNAd perce-neigea été utilisée pour marquer les glycoconjugués des membranes plasmiques du Golgi et a ainsi permis de déterminer le défaut d'activité de l'enzyme lorsqu'elle est localisée en trans-Golgi (**Pokrovskaya I.D. et al., 2011**). Des lectines présentant d'autres spécificités peuvent être utilisées pour étudier différents trafics cellulaires. Par exemple, l'agglutinine de *Dolichos biflorus* DBA a été utilisée pour étudier les sucres de *Giardi lamblia* (**Midlej V. et al., 2013**), tandis que ConA a permis de suivre l'endocytose des trypanosomes africains (**Morgan G.W. et al., 2004**).

Une autre étude a démontré que les lectines végétales peuvent être utilisées pour déterminer l'état de glycosylation des glycoprotéines, mais aussi permettre l'étude du trafic vésiculaire intracellulaire en utilisant la biochimie en conjonction avec l'analyse cytochimique. En effet, Vaux et son équipe ont utilisé des lectines telles que l'agglutinine de *Galanthus nivalis* (GNA), l'agglutinine de *Pisum sativum* (PSA), l'agglutinine de *Lens culinaris* et la concanavoline A pour étudier la voie de sécrétion précoce des cellules HeLa (**Morgan G.W. et al., 2013**).

D'autres chercheurs se sont intéressés à la toxine de Shiga. Cette toxine est devenue un outil puissant pour l'étude des processus cellulaires, notamment dans le cadre du trafic intracellulaire (Ewers H. et al., 2010).

## 2. Généralités sur *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus* :

### 2.1. Champignon *Ganoderma lucidum*:

Le *Ganoderma lucidum*, aussi connu sous le nom de « língzhī » ou « Reishi », est un champignon couramment utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise depuis plus de 2 000 ans. Le reishi pousse parfois au sol mais surtout sur les troncs d'arbres pouvant être en décomposition ou les racines semi-enterrées des feuillus et arbres fruitiers, assez rarement sur les conifères (Nahata A., 2013).

#### 2.1.1. Description du *Ganoderma lucidum*:

##### ➤ Corps de fructification:

- **Couleur** : Rouge à brune rougeâtre.
- **Description** : Circulaire à semi-circulaire, en éventail ou réniforme, 2-20 cm de large et 4-8 cm d'épaisseur; surface supérieure lisse ou à ondulations concentriques, liégeuse, dure, avec ou sans aspect verni (une croûte laquée brillante de nature non résineuse), rouge foncé à brun rougeâtre, noir rougeâtre au centre, ocre ou jaunâtre vers la marge, bord lui-même blanc en croissance active; chair brune jaunâtre à brune foncée (Herbalist R.U., 2006).

##### ➤ Pores:

- **Couleur**: Blanc, Brun.
- **Description**: 1 (2) couche(s) de tubes producteurs de spores, chaque tube de 2 à 20 mm de long; pores minuscules, arrondis, denses (4-7 par  $\mu\text{m}$ ), blanchâtres à l'état frais, bruns en vieillissant (Herbalist R.U., 2006).

##### ➤ Spores:

- Plus ou moins ovoïdes, tronquées à l'apex, de couleur marron clair, formées d'une exosporie hyaline, d'une endospore marron clair et verruqueuse, mesurent 8,3 à 10  $\times$  6,6  $\mu\text{m}$  (Bernicchia A., 2005).

##### ➤ Stipe:

- **Couleur**: même couleur et aspect que la surface.
- **Description**: Lorsqu'il est présent, 3-14 cm de long, 0,5-4 cm d'épaisseur, souvent tordu, peut être agrandi à la base (Bijalwan A. et al., 2020).

##### ➤ Odeur et saveur:

- Moisi, semblable à un champignon.

### ➤ Poudre:

- Brun clair à brun foncé; doux, spongieux et fibreux (**Herbalist R.U., 2006**).

### 2.1.2. Classification systématique du *Ganoderma lucidum*:

*G.lucidum* se classe comme suit (**Nahata A., 2013**):

- Règne : Fungi
- Division : Basidiomycota
- Classe : Agaricomycetes
- Ordre : Polyporales
- Famille : Ganodermataceae
- Genre : Ganoderma
- Espèce : *Ganoderma lucidum*

### 2.1.3. Utilisation du champignon *Ganoderma Lucidum*:

Le *Ganoderma lucidum* a été largement utilisé pour les propriétés pharmacologiques ci-dessous:

- Ce champignon contient des substances (polysaccharides et triterpènes) capables d'inhiber la croissance des tumeurs, ainsi que leur dissémination dans l'organisme (métastase). Ces effets ont été observés sur divers types de cancers, notamment le cancer du sein et le cancer de la prostate (**Sliva D., 2003 ; Yue G.G.L. et al., 2006 ; Mahajna J. et al., 2013**).
- Les résultats d'un essai auprès de 132 sujets neurasthéniques (fatigue chronique) indique l'efficacité de l'extrait du reishi pour soulager les symptômes de cette affection (**Tang W. et al., 2005**).
- Parmi les nombreux constituants biologiquement actifs du *G.lucidum*, il a été démontré que les polysaccharides, les protéoglycane, les protéines et les triterpénoïdes ont des effets hypoglycémisants (**Li F. et al., 2011; Ma H.T. et al., 2015**).
- L'examen du rôle d'huile de spores du *G.lucidum* par voie orale dans les maladies cardiovasculaires démontre un rôle cardioprotecteur potentiel (**Xie Y.Z. et al., 2016**).

### 2.2. Champignon *Candolleomyces candolleanus*:

*Candolleomyces candolleanus* est un champignon agaricomycète, aussi connu par son nom vernaculaire «la psathyrelle de De Candolle». L'épithète spécifique "candolleana" honore le botaniste suisse Augustin Pyramus de Candolle. Ce champignon pousse seul ou en groupe dans les pelouses, les pâturages et les zones cultivées, généralement à proximité d'arbres feuillus récemment morts, de leurs racines et de leurs souches. Il apparaît habituellement au printemps et au début de l'été (**Bernoux J.Y., 2004 ; Weiskircher G., 2017**).

### 2.2.1. Description du *Candolleomyces candolleanus*:

#### ➤ Chapeau:

- **Couleur** : Blanc, crème.
- **Description** : 1-6 cm hygrophane, brun ochracé puis beige, crème à blanchâtre en séchant. Voile blanc plus ou moins abondant, persistant souvent chez les adultes en petit flocons brunâtres au centre, et parfois en lambeaux au bord (**Pean R. et Schwab N., 2021**).

#### ➤ Lames:

- **Couleur** : Blanche, gris violet, crème et enfin brune.
- **Description** : Adnées, échancrées, sporée brun (**Pean R. et Schwab N., 2021**).

#### ➤ Chair:

- Très mince, fragile, humide, blanchâtre, jaune pâle à brunâtre au frais, pâle au sec (**Pean R. et Schwab N., 2021**).

#### ➤ Stipe:

- **Couleur** : Blanc, crème.
- **Anneau** : Non.
- **Description** : 3-10 x 0,2-0,8 cm, subégal à atténué vers la base, très fragile, creux, fibrilleux-soyeux et légèrement furfuracé vers l'apex, parfois strié, plus ou moins fibrilleux-écailleux à fibrilleux-apprimé vers la base (**Labbé R., 2021**).

#### ➤ Odeur et saveur:

- Odeur et saveur indistinctes à douces.

#### ➤ Spores:

- 6,5-9 x 4-5,5 µm, subovoïdes à ellipsoïdes vues de face, subellipsoïdes à très légèrement phaséoliformes vues de profil, lisses, à paroi 0,3 µm d'épaisseur, à pore germinatif tronqué, brun foncé dans le KOH (**Roux P., 2006**).

#### ➤ Comestibilité:

- Comestible - sans intérêt.

### 2.2.2. Classification systématique du *Candolleomyces Candolleanus* :

Selon **Watch D. et Melzer A., 2020**, *C.candolleanus* a été classé comme suit:

- Règne: Fungi
- Division: Basidiomycota
- Classe: Agaricomycetes
- Ordre: Agaricales
- Famille: Psathyrellaceae
- Genre: Candolleomyces

- Espèce: *Candolleomyces candolleanus*

### 2.2.3. Utilisation du champignon *Candolleomyces candolleanus*:

- Plusieurs études ont montré l'activité antibactérienne des diterpénoïdes caractérisés à partir de la culture du basidiomycète *C.candolleanus* contre plusieurs souches bactériennes dont: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* (**Liu Y.P. et al., 2019; Liu Y.P. et al., 2020**), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Dundar A. et al., 2015**).
- Les diterpènes, du type guanacastepene R, isolés du *C.candolleanus* possédaient une activité inhibitrice contre la 11 $\beta$ -HSD1 humaine et murine (**Yin X. et al., 2014**).
- Les ergostérols, psathergosterol B et ergosta-5,7, 22-trien-3 $\beta$ -ol, isolés du *C.candolleanus* possède une certaine cytotoxicité sur cinq lignées cellulaires cancéreuses d'origine humaines HL-60, SMMC-7721, A549, MCF-7 et SW-480 (**Liu Y.P. et al., 2019**).
- Des essais cliniques ont donné des résultats suggérant que l'extrait du *C.candolleanus* empêche les dommages oxydatifs d'ADN induit par la doxorubicine par son effet anticlastogénique (**Al-Habib M.N., 2018**).

## 3. Système sanguin:

### 3.1. Historique:

En 1900-1901, le médecin viennois **Karl Landsteiner** (1868-1943) a publié sa découverte fondamentale sur les groupes sanguins dans un article dans lequel il décrivait l'agglutination qui peut se produire lorsque le sang d'un sujet est mis en contact avec celui d'un autre. Il a identifié 3 groupes : A, B et O (H) (**Kyle R.A. et al., 2001**). En 1908, **Adriano Sturli** (1873-1966) et **Alfred Von Decastello** (1872-1960), deux jeunes collaborateurs de Landsteiner, identifient le quatrième groupe sanguin: AB.

En 1924, **Bernstein** démontre que les groupes sanguins constituent des caractères héréditaires transmis selon les lois de Mendel. En 1940, **Landsteiner**, **Phillip Levine** (1907-1976) et **Alexander Wiener** (1907-1987) décrivent les facteurs du rhésus (**Aymard J.P., 2012**).

Cette étape a inauguré une discipline nouvelle en biologie humaine et a permis l'essor d'une thérapeutique appelée à sauver des millions de vie: la transfusion sanguine.

### 3.2. Système ABO:

Le système ABO se caractérise à la fois par:

- La présence ou l'absence des antigènes A et/ou B à la surface des globules rouges qui est sous la dépendance de trois allèles (A, B et O) situés sur un même locus chromosomique. Les gènes A et B sont « codominants », ils s'expriment au niveau du phénotype. L'allèle O est « récessif » par rapport aux allèles A et B.
- La présence ou l'absence d'agglutinines naturelles anti-A et/ou anti-B dans le plasma.

Ce double caractéristique est à la base des techniques de détermination des groupes sanguins ABO qui reposent sur l'étude de ces deux propriétés. Un groupage sanguin comporte donc deux étapes: la recherche des antigènes érythrocytaires à l'aide de sérums-tests monoclonaux anti-A, anti-B, anti-A,B et à la recherche des anticorps plasmatiques à l'aide d'hématies-tests A et B. La concordance entre ces deux épreuves est impérative (Janot C. et al., 2002).

**Tableau 04** : Les groupes sanguins du système ABO (Janot C. et al., 2002).

Groupe sanguin	Antigène sur la globule rouge	Anticorps du plasma
A	A	anti-B
B	B	anti-A
O	ni A, ni B	anti-A et anti-B
AB	A et B	ni anti-A ni anti-B

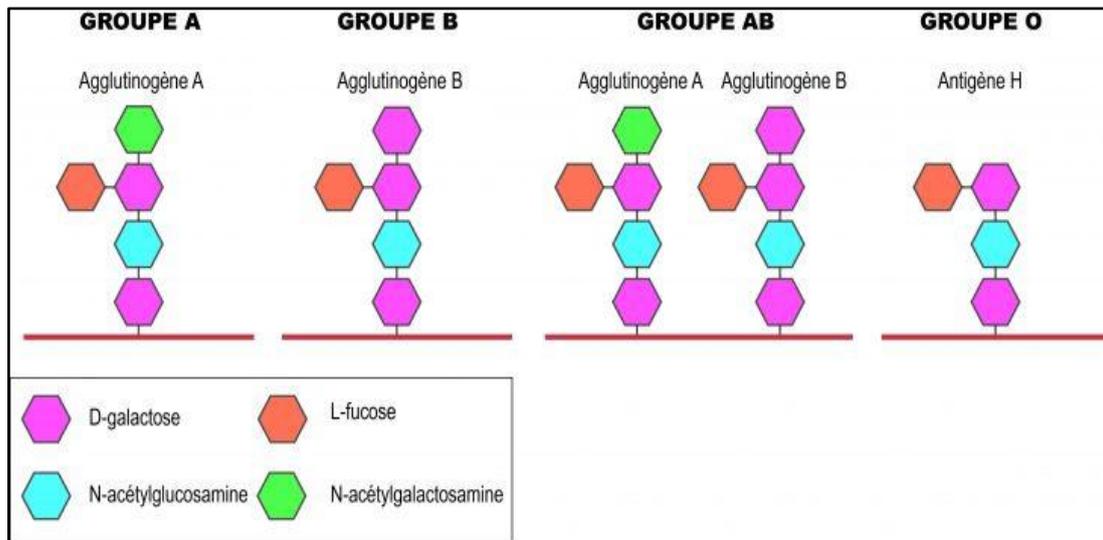
### 3.3. Système rhésus :

Le rhésus est un antigène des globules rouges situé au niveau de leur paroi. Il entre dans la détermination du groupe sanguin d'un individu. Celui-ci permet de déterminer deux systèmes de groupes sanguins différents: le rhésus positif ( $Rh^+$ ) chez les personnes possédant cet antigène ce qui concerne la majeure partie de la population est le rhésus négatif ( $Rh^-$ ) chez les personnes qui en sont dépourvues (Hordé P., 2015). Ce facteur Rh est notamment utile pour savoir si une transfusion sanguine est possible entre deux personnes.

### 3.4. Structure chimique des antigènes des groupes sanguins du système ABO:

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

Dans les glycoprotéines la liaison est de type O-glycosidique. Sur le disaccharide central: galactosyl  $\beta$  1-3 N-acétyl-galactosamine sont liés des N-acétyl-glucosamines et des galactoses plus quelques fucoses. L'une des antennes est terminée par une N-acétyl-glucosamine chez les sujets du groupe A et par un galactose chez les sujets du groupe B. Il n'y a pas d'ose à cette place chez les sujets du groupe O (Ramata N., 2010).



**Figure 09:** Structure des groupes sanguins du système ABO.  
(<https://knowow.net/fr/sciences-terre-vie/biologie/agglutinogene/>)

### 3.5. Lectines spécifiques des groupes sanguins ABO:

Plusieurs lectines agglutinent les hématies parfois avec une spécificité aux groupes sanguins (Bird G.W.G., 1974). La spécificité des lectines aux groupes sanguins est représentée dans le tableau suivant.

**Tableau 05 :** Les groupes sanguins et leur lectine spécifique.

Spécificités	Source de lectines	Références
A	<i>Dolichos biflorus</i> <i>Clitocybe nebularis</i> <i>Vicia cracca</i>	Etzler.M.E. et Kabat E.A., 1970 Sabotič J., 2019 Rudiger H., 1977
B	<i>Marasmius oreades</i> <i>Griffonia simplicifolia</i> <i>Polyporus fomentarius</i>	Grahn E.M. et al., 2009 Khan F. et al., 2002 Boyd W.C., 1970
O (H)	<i>Anguilla anguilla</i> <i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Cytisus sessilifolius L</i>	Ito N. et al., 1990
AB	<i>Sophora japonica</i>	Boyd W.C., 1970

*Matériels*

*et*

*Méthodes*

## 1. Matériels:

### 1.1. Matériels fongiques:

La collecte de nos champignons a été effectuée au niveau du parc national Taza wilaya de Jijel du 27 Avril jusqu'au 10 Mai 2021, alors que *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus* ont été récoltés successivement de Taher et Chekfa wilaya de Jijel pendant la première quinzaine d'Avril.

**Tableau 06:** Les champignons testés et leurs localisations.

	
<p><i>Entonaema cinnabarinum</i> Dar el-Oued –Jijel-</p>	<p><i>Panus conchatus</i> Les aftis –Jijel-</p>
	
<p><i>Candolleomyces candolleanus</i> Chekfa –Jijel-</p>	<p><i>Exidia nigricans</i> Guerrouche –Jijel-</p>

	
<p><i>Ganoderma lucidum</i> Ada mall-Taher- Jijel-</p>	<p><i>Cyclocyba aegerita</i> Dar el-Oued –Jijel-</p>
	
<p><i>Lenzites betulina</i> T'bola –Jijel-</p>	<p><i>Paxillus involutus</i> Dar el-Oued –Jijel-</p>

### 1.2. Matériels biologiques:

Notre étude a porté sur les hématies du lapin prélevées du lapin de l'animalerie de Chaabat Ersas de l'université frères Mentouri Constantine-1 et les hématies humaines prélevées chez des donneurs du sang au laboratoire.

### 1.3. Matériels techniques:

➤ Solvants et réactifs de laboratoire :

Les réactifs utilisés sont : eau de javel, eau distillée, glutaraldéhyde, sephadex G50, NaOH, HCl.

### ➤ Les équipements du laboratoire:

Les matériaux utilisés au laboratoire sont : agitateur magnétique, agitateur Vortex, centrifugeuse, spectrophotomètre, bain-marie, réfrigérateur, distillateur, PH mètre, broyeur, microscope, barreaux magnétiques, pissettes, bécher, erlenmeyer, éprouvettes graduées, entonnoir, flacons en verre, fioles jaugées, mortier et pilon, tubes à fond conique, tubes à essais, tubes secs en verre, tubes héparinés, boites en verre, papier Whatman, seringues, portoirs, spatules, micropipettes (25µl, 100-1000µl, 50-200µl), couteau, embouts, microplaques, lames porte objets, pipettes, filtre à seringue 0.25mm, colonne, cuve.

## 2. Méthodes:

### 2.1. Etude phytochimique:

#### 2.1.1. Préparation de différents échantillons:

##### ➤ Séchage:

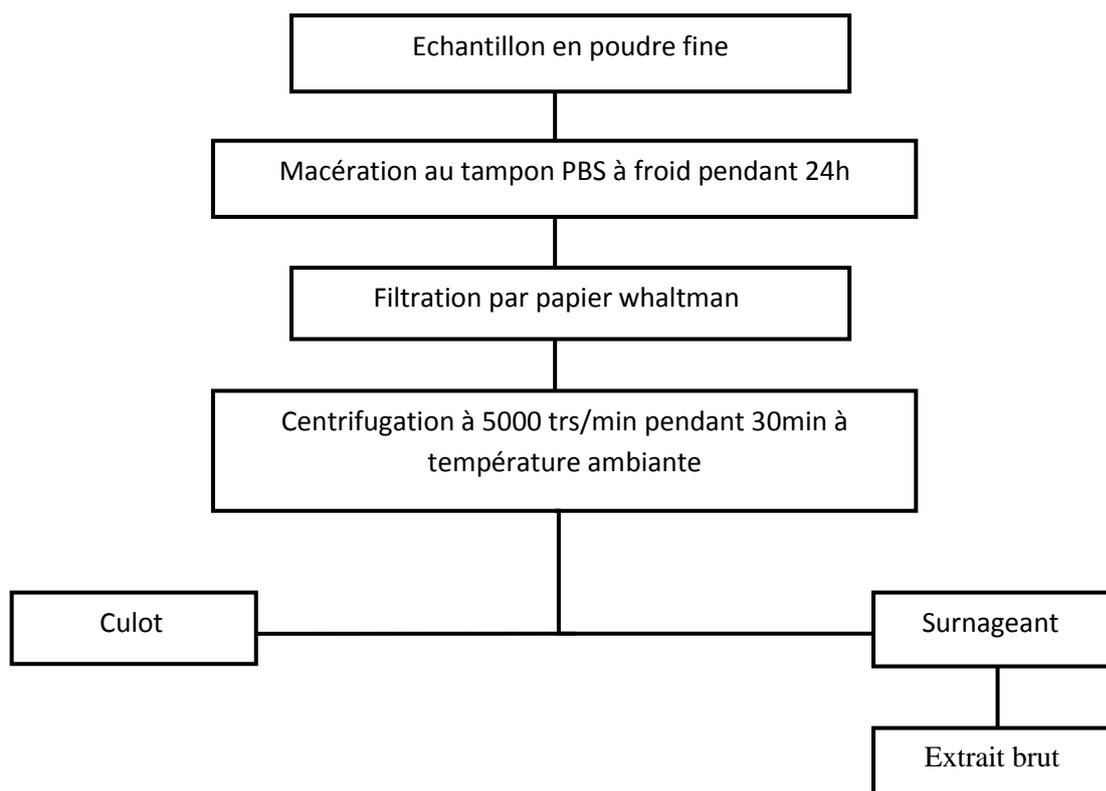
Les espèces *Entonaema cinnabarinum*, *Exidia nigricans*, *Cyclocybe aegerita* et *Ganoderma lucidum* ont été conservés au frais, tandis que *Paxillus involutus*, *Lenzites betulina*, *Panus conchatus* et *candolleomyces candolleanus* ont été séchées à température ambiante pendant 10 jours.

##### ➤ Broyage:

Les espèces séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, alors que les espèces congelées ont été broyées en utilisant une quantité suffisante d'azote liquide à l'aide d'un mortier-pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (**annexe 01**). Cette dernière a été conservée dans un emballage en verre bien clos.

##### ➤ Extraction:

Cette opération a été réalisée afin de récupérer des substances hydrosolubles à partir de la poudre de chaque champignon à l'aide d'une solution tampon PBS (0.1 M, pH 7.4) (**Annexe02**). L'extrait brut obtenu a servi pour réaliser le test d'hémagglutination. Le protocole suivi est représenté dans le schéma ci-dessous (**figure 10**).



**Figure 10 :** Schéma d'extraction de lectine à partir de différents échantillons.

### 2.1.2. Préparation d'une suspension d'hématies du lapin à 4% :

Les hématies du lapin ont été collectées pour mettre en évidence la présence des lectines dans les extraits bruts des échantillons collectés.

Les hématies collectées ont été débarrassées de toute trace de sérum ou plasma. Pour cela elles ont été soumises à un lavage, à une fixation puis à une dilution (Zachée P. et al., 1996). Les hématies fixées ont été mises en suspension à 4% pour l'emploi.

#### ➤ Lavage et fixation des hématies:

Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés de 4 ml, puis il a été centrifugé à 3000 trs/min pendant 6min. Le culot obtenu a été lavé avec une solution du NaCl 0,9% (annexe 03) trois fois suivi d'une centrifugation après chaque lavage. Ensuite, il a été dissous dans une solution d'un fixateur, le glutaraldéhyde 1%, sous agitation d'une heure et à nouveau centrifuger et laver deux fois avec NaCl 0.9%.

#### ➤ Dilution des hématies:

Le culot contenant les hématies a été dilué par une solution du NaCl 0.9%, à 2ml d'hématies 48 ml du NaCl 0.9% ont été ajoutés afin d'obtenir des hématies à 4%.

La fixation a permis de conserver les hématies pendant 21 jours à 4°C pour les utiliser aux tests souhaités (Tanya V.N. et Scott G.R., 1994).



**Figure 11:** Les hématies fixées du lapin à 4%.

### 2.1.3. Test d'hémagglutination:

La mesure de l'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation. Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. Ce test repose sur l'observation de l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse (Goldstein I.J. et al., 1980; Nachbar M.S. et Oppenheim J.D., 1980).

L'activité hémagglutinante des extraits bruts des échantillons a été réalisée dans des microplaques de titration. A l'aide d'une micropipette, nous avons placé 50µl d'extrait brut de chaque échantillon dans des puits différents tout en ajoutant 50µl d'hématies fixées du lapin à 4%. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la lecture de l'activité agglutinante est observée à l'œil nu et par la suite confirmée à l'aide d'un microscope optique (G×40) (Concon J.M. et al., 1983). Les résultats ont été comparés par rapport à un témoin négatif (50µl d'hématies fixées du lapin à 4% ajouté à 50µl du tampon PBS).

### 2.1.4. Préparation des extraits bruts des échantillons *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus*:

Après avoir testé plusieurs espèces fongiques, *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus* ont été retenues pour la suite de notre étude.

Une nouvelle extraction a été réalisée. Nous avons mis 5g de poudre de chaque champignon dans des flacons en verre contenant chacun 17ml du tampon PBS (0.1M, pH 7.4). Ensuite, le

mélange a été agité par un agitateur magnétique et incubé à 4°C pendant 24h. Après la filtration et la centrifugation à 5000 trs/min pendant 30min, le surnageant a été récupéré et conservé au frais pour la réalisation des tests souhaités.

### **2.1.5. Test limite d'agglutination de l'extrait brut du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*:**

Ce test repose sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimale de lectine montrant une activité évidente.

Prenant une ligne de la microplaque pour chaque espèce et en suivant le même protocole, nous avons déposé en premier 50µl du tampon PBS (0,1M, pH 7.4) dans chaque puits. Ensuite nous avons ajouté 50µl d'extrait brut uniquement au premier puits, puis des dilutions successives, qu'on appelle une gamme de concentration par double dilution, ont été réalisées dans les puits suivants sachant que 50µl ont été jetés du dernier puits pour respecter les taux de dilutions et garder les mêmes volumes dans chaque puits. Enfin, nous avons ajouté 50µl de la suspension d'érythrocytes du lapin à 4% à chaque puits.

L'observation de la limite d'agglutination a été effectuée à l'œil nu et à l'aide d'un microscope optique (**G×40**) après 30 min d'incubation à une température ambiante.

## **2.2. Etude des caractéristiques des extraits de lectines:**

### **2.2.1. Effet de température sur l'activité agglutinante:**

Les aliquotes de l'extrait brut de chaque champignon ont été versées dans 10 tubes secs en verre que nous les avons étiquetés, puis nous avons incubé ces derniers à des degrés différents de température (20, 40, 60, 80 et 100°C) dans un bain marie durant 1h du temps (**Singh A.P. et al., 2013**). Après le temps requis, les extraits bruts chauffés ont été refroidis à température ambiante. Enfin, nous avons testé l'activité agglutinante pour chaque température en suivant les mêmes étapes (chaque température dans une ligne).

A chaque ligne, nous avons déposé 50µl du tampon PBS (0.1M, pH 7.4) dans tous les puits, après nous avons ajouté seulement au premier puits 50µl d'extrait brut. Ensuite, nous avons réalisé des dilutions successives (méthode de double dilution) en jetant 50µl du dernier puits. Enfin, nous avons ajouté 50µl des hématies fixées du lapin à 4% à chaque puits.

L'observation de l'activité agglutinante a été effectuée après 30min d'incubation à une température ambiante.

### **2.2.2. Effet du PH sur l'activité agglutinante:**

Nous avons testé l'effet du pH sur l'activité agglutinante sur une gamme pH 2- 12 (**Sitouhy M. et al., 2007**). 1g de poudre de chaque champignon a été versé dans des tubes à essais contenant chacun 4ml du tampon PBS à différentes valeurs du pH allant de 2 jusqu'à 12.

Après 24h d'incubation à 4°C, le test de l'activité agglutinante a été effectué sur le surnageant de chacun d'entre eux en suivant le même processus précédent (celui de la température).

Les résultats ont été toujours comparés par rapport à un témoin négatif qui contient les mêmes composants sauf les échantillons dans les mêmes conditions de travail.

### **2.3. Test d'inhibition d'agglutination par les glucides:**

#### **2.3.1. Test d'agglutination:**

Ce test sert à démontrer la capacité de la lectine de l'extrait brut de chaque champignon à se lier à différents sucres, et donc la capacité de ces derniers à inhiber l'agglutination des hématies du lapin. Il a été effectué en double dilution pour montrer la concentration minimale inhibitrice des sucres spécifiques sur la lectine de chaque échantillon.

Huit glucides ont été testés : D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-arabinose, D-maltose, D-cellobiose, D-lactose et D-glucosamine HCl. Tous ces glucides ont été testés à une concentration de 400mM dissous dans 1ml du tampon PBS (0.1M, pH 7.4) (**annexe 04**). La durée d'exposition a été de 60min.

Après l'exposition, nous avons testé l'activité agglutinante des deux extraits en suivant les étapes suivantes:

En prenant une ligne pour chaque extrait, nous avons déposé 25µl d'extrait brut dans chaque puits, puis nous y avons ajouté 25µl de chaque sucre. Ce mélange a été laissé pendant 30 min à température ambiante afin de permettre aux lectines de reconnaître leurs sucres spécifiques. Enfin, nous avons ajoutés 50µl d'hématies fixées du lapin à chaque puits.

Après 1h d'exposition, les résultats des deux extraits sont observés à l'œil nu.

#### **2.3.2. Test limite d'inhibition d'agglutination par les glucides:**

Le test a été effectué en double dilution pour montrer la concentration minimale inhibitrice des sucres spécifiques sur la lectine de chaque échantillon.

Dans chaque puits, 25µl du tampon PBS (0.1M, pH 7.4) ont été déposés. Ensuite, 25µl d'inhibiteur ont été déposés dans le premier puits seulement puis une double dilution en série a été réalisée jusqu'au douzième puits (25µl ont été jetés du dernier puits). Après, 25µl d'extrait brut ont été ajoutés à chaque puits. L'incubation du mélange a été effectuée à température ambiante pendant 30 min. Finalement, 50µl des hématies fixées du lapin à 4% ont été ajoutés à chaque puits. L'observation du résultat a été faite à l'œil nu après une heure du temps.

### **2.4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO:**

Ce test a été effectué pour déduire la spécificité des extraits aux groupes sanguins ABO. Il a été réalisé sur les antigènes des hématies humaines appartenant au système du groupe sanguin ABO en utilisant les érythrocytes des différents groupes sanguins.

### 2.4.1. Préparation de la suspension d'hématies à 4% :

Dans chaque tube hépariné, 4ml du sang des groupements du système ABO ont été collectés puis préparés selon le même protocole suivi pour la préparation de la suspension d'hématies fixées du lapin à 4%.

### 2.4.2. Test d'activité agglutinante:

A chaque puits, 50 $\mu$ l d'extrait brut de chaque champignon ont été déposés suivis d'un dépôt de 50 $\mu$ l des hématies fixées à 4% de chaque groupe sanguin humain préparé auparavant. Après 60 min d'exposition à température ambiante l'observation a été faite à l'œil nu.

### 2.5. Purification partielle des lectines du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus* par chromatographie sur colonne:

Cette étape a été réalisée pour éliminer les impuretés contenues dans les extraits bruts, et améliorer la pureté de nos extraits.

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille en utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine consistant en billes creuses et poreuses. Les plus grosses protéines, celles qui passent carrément entre les billes, sortent en premier de la colonne. Les autres sont retardées par leurs interactions avec les billes; les plus petites protéines, qui peuvent entrer et sortir à leur guise, sont les dernières à quitter la colonne.

#### 2.5.1. Préparation de la colonne:

6g de poudre du gel Sephadex G50 ont été mises en suspension dans 150ml du tampon PBS (0,1M, pH 7.4). Ce mélange a été d'abord dégazé sous vide pour éviter les bulles d'air. Ensuite, on a passé à l'hydratation du gel qui a été réalisée pendant 72h à froid (4°C). Puis nous l'avons coulé dans une colonne (2.5cm de diamètre et une hauteur de 40cm) (**annexe 05**), le lavage du gel a été fait avec 240ml, soit 6 fois le volume de la colonne par un tampon PBS (0.1M, pH 7.4). La stabilisation et l'équilibrage de la colonne ont été réalisés à température ambiante pendant 48h.

#### 2.5.2. Séparations des lectines à partir des extraits:

D'abord nous avons filtré l'extrait brut de chaque champignon, soit 2ml pour chacun, en utilisant un filtre à seringue 0.25mm, puis nous les avons versés lentement dans la colonne, puis des fractions de 4ml ont été recueillies après l'élution avec le tampon PBS (0,1M, pH 7,4) dans des tubes secs en verre de 5ml, qui ont été placés respectivement dans un portoir.

#### 2.5.3. Spectrophotométrie à UV:

Cette étape nous a permis de quantifier les lectines séparées par chromatographie sur colonne en mesurant l'absorption de toutes les fractions de chaque espèce, à une longueur d'onde 280 nm. Une courbe reliant l'absorbance en fonction du volume d'élution est ainsi obtenue.

Seules les fractions ayant révélées une absorbance relative aux pics (présentant une concentration protéique appréciable) ont fait l'objet d'un test d'hémagglutination. Ce test nous a permis de sélectionner les fractions les plus riches en lectines afin de les soumettre à une électrophorèse sur gel.

***Résultats***  
***et***  
***Discussions***

## 1. Etude phytochimique:

### 1.1. Test d'hémagglutination:

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec les érythrocytes via des interactions avec les glucides membranaires. La sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'ajout d'une lectine permet la formation d'un réseau entre elle et entre les érythrocytes, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène visible à l'œil nu; ceci correspond au phénomène d'agglutination.

Nous avons testé au total huit extraits bruts de différents champignons (**Tableau 7**).

**Tableau 07:** Activité agglutinante des échantillons testés.

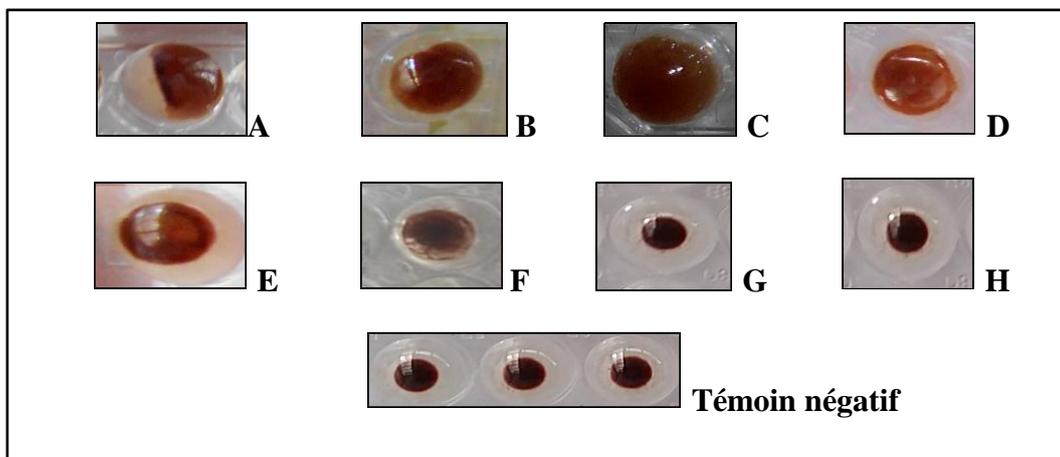
Echantillon	Activité hémagglutinante
<i>Candolleomyces candolleanus</i>	+++
<i>Paxillus involutus</i>	+++
<i>Ganoderma lucidum</i>	+++
<i>Cyclocybe aegerita</i>	++
<i>Panus conchatus</i>	++
<i>Exidia nigricans</i>	+
<i>Entonaema cinnabarinum</i>	-
<i>Lenzites betulina</i>	-

+++ : Très forte agglutination

++ : Forte agglutination

+ : Faible agglutination

- : Absence d'agglutination



**Figure 12:** Test d'hémagglutination des extraits bruts du *C.candolleanus* (A), *P.involutus* (B), *G.lucidum* (C), *C.aegerita* (D), *P.conchatus* (E), *E.nigricans* (F), *E.cinnabarinum* (G) et *L.betulina* (H) à température ambiante.

Le résultat positif des extraits testés prouve la présence des lectines ayant reconnues la partie glycosylée des membranes des érythrocytes du lapin marquant que les extraits ont réagi différemment avec ces dernières. Une très forte agglutination est observée dans le cas des extraits bruts du *Candolleomyces candolleanus*, *Paxillus involutus* et *Ganoderma lucidum*. Ce résultat est similaire à beaucoup d'autres comme celui de la lectine purifiée du champignon toxique *Inocybe umbrinella* qui montre également une très forte agglutination lors de l'addition de la suspension d'érythrocytes du lapin (Zhao J.K. et al., 2009), la lectine extraite du polypore du labyrinthe moussu *Cerrena unicolor* montre aussi une forte activité agglutinante (Mikiashvili N.A. et al., 2006). Cependant l'activité agglutinante des lectines du *Cyclocybe aegerita* et *Panus conchatus* n'était pas assez forte comme celle des trois premières espèces mentionnées ci-dessus. L'extrait brut d'*Exidia nigricans* montre une faible agglutination mais elle est visible comme même à l'œil nu.

Par contre les extraits du *Lenzites betulina* et d'*Entonaema cinnabarinum* montrent une absence d'agglutination, ce qui prouve que ces espèces ne contiennent pas de lectines.

Pour la suite de notre travail, nous avons retenu deux espèces *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus* car ils ont montré une forte agglutination.

### 1.2. Test de limite d'agglutination de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus* :

La limite d'agglutination est exprimée en fonction du rapport de dilution pour lequel on observe une hémagglutination. Le tableau et les figures suivants ont montré les résultats obtenus lors du test de limite d'hémagglutination.

**Tableau 08** : L'activité agglutinante de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*.

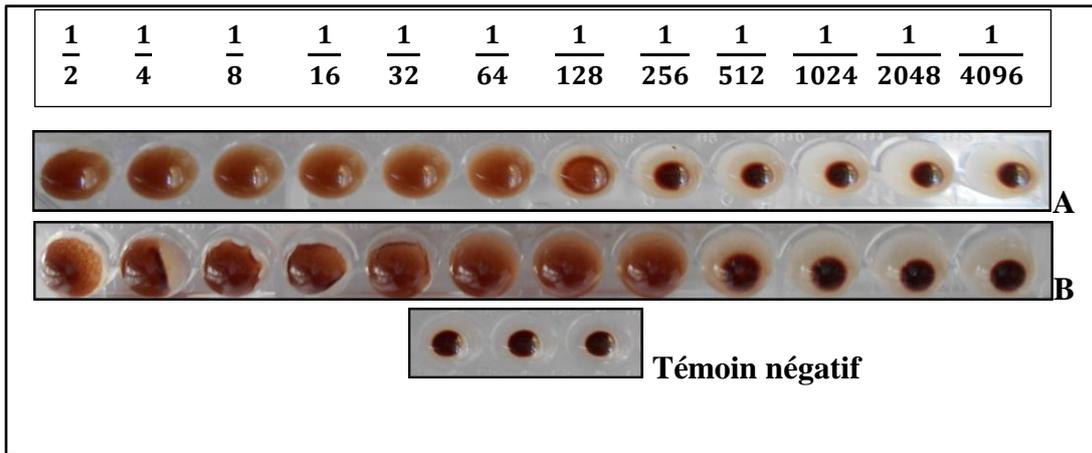
Dilution	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
<b>Ganoderma lucidum</b>	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
<i>Candolleomyce candolleanus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-

+++ : Très forte agglutination

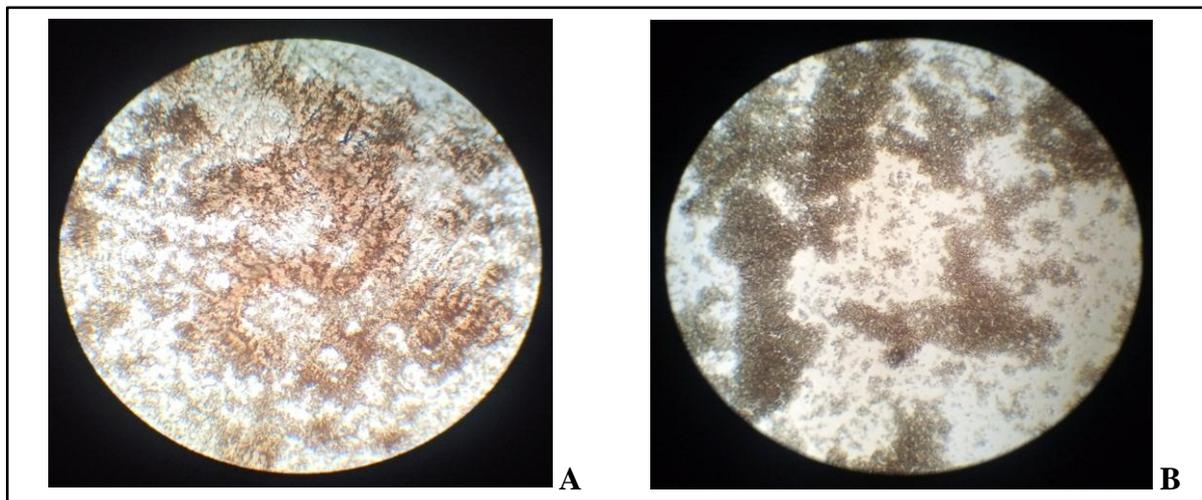
+ : Faible agglutination

++ : Forte agglutination

- : Absence d'agglutination



**Figure 13:** Limite d'agglutination de l'extrait brut du *Ganoderma lucidum* (A) et du *Candolleomyces candolleanus* (B).



**Figure 14:** Observation microscopique (G 40) d'hémagglutination par l'extrait du *Ganoderma lucidum* (A) et du *Candolleomyces candolleanus* (B).

D'après les résultats obtenus, on observe une très forte activité hémagglutinante de l'extrait du *Ganoderma lucidum* (**Figure 13 A**) au niveau des trois premiers puits. Le pouvoir hémagglutinant de notre lectine commence à diminuer progressivement dans les quatre puits suivants allant jusqu'à la dilution (1/128), alors que dans le reste des dilutions et jusqu'au douzième puits (1/4096) l'activité agglutinante a disparu complètement.

Pour l'extrait du *Candolleomyces candolleanus* (**Figure 13 B**) on observe une très forte agglutination au niveau des cinq premiers puits, l'activité agglutinante a diminué au quatre puits qui suivent, on observe une faible activité à la dilution (1/512) (neuvième puits) mais elle reste comme même visible, jusqu'à ce qu'elle disparaît complètement dans le reste des dilutions. L'absence d'agglutination au niveau des puits est due à la dilution effectuée donc les fractions contenues sont des diluâtes de l'extrait brut.

On conclue que l'extrait du *Ganoderma lucidum* a une limite d'agglutination à la dilution 1/7 (128 UH. ml<sup>-1</sup>) alors que celle de l'extrait du *Candolleomyces candolleanus* est à la dilution 1/9 (512 UH. ml<sup>-1</sup>).

## 2. Caractéristiques d'extrait de lectine du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus* :

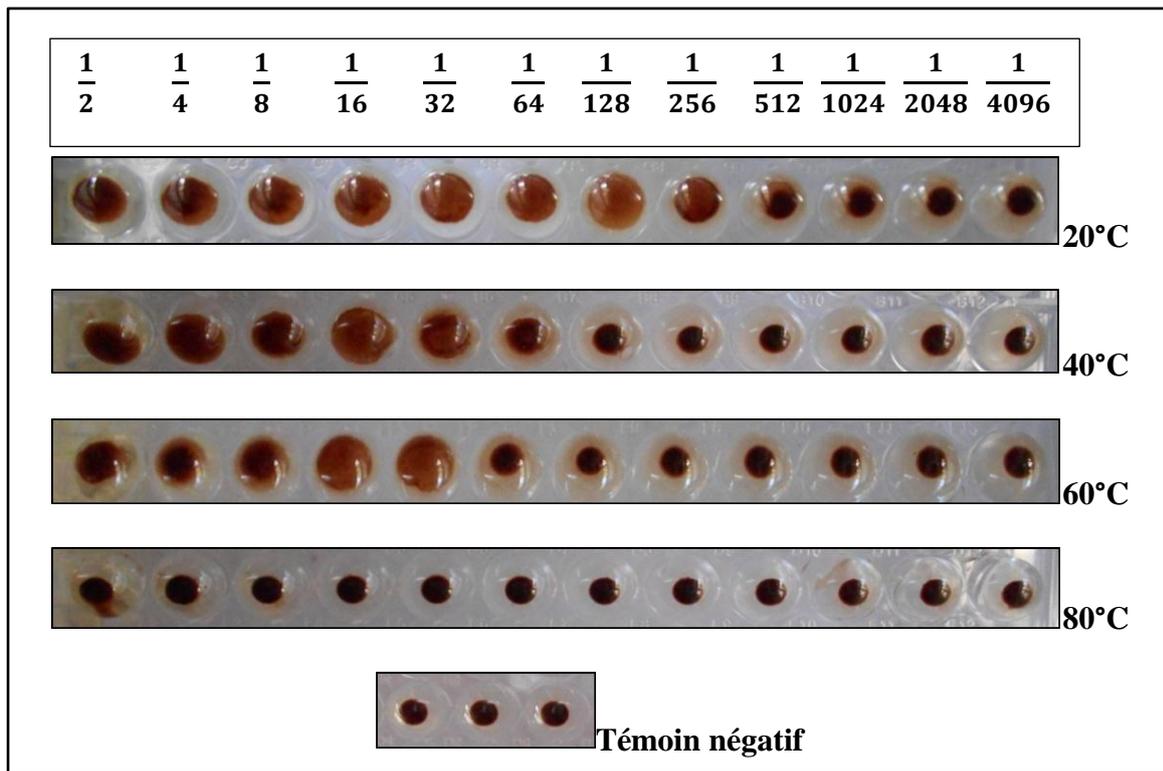
### 2.1. Effet de température sur l'activité agglutinante :

Les extraits de nos lectines ont subi un traitement thermique pendant 1h à différentes températures 20, 40, 60, 80, et 100°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et les figures suivants.

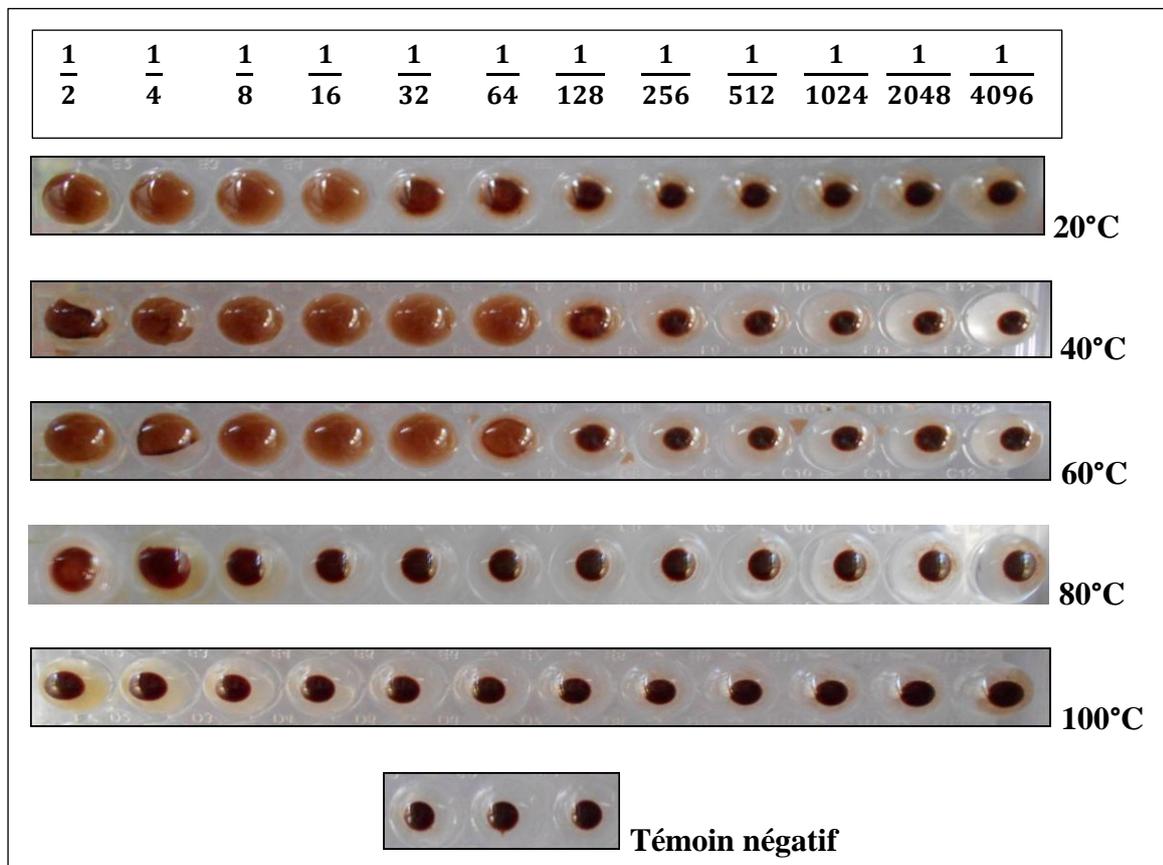
**Tableau 09** : Effet de la température sur l'activité agglutinante de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*.

Extrait \ T (°C)	T (°C)				
	20	40	60	80	100
<i>Ganoderma lucidum</i>	+++	++	++	-	-
<i>Candolleomyces candolleanus</i>	++	+++	+++	+	-

+++ : Très forte agglutination  
++ : Moyenne agglutination  
+ : Faible agglutination  
- : Absence d'agglutination



**Figure 15:** Limite d'agglutination des lectines d'extrait brut du *Ganoderma lucidum* chauffés à différentes températures.

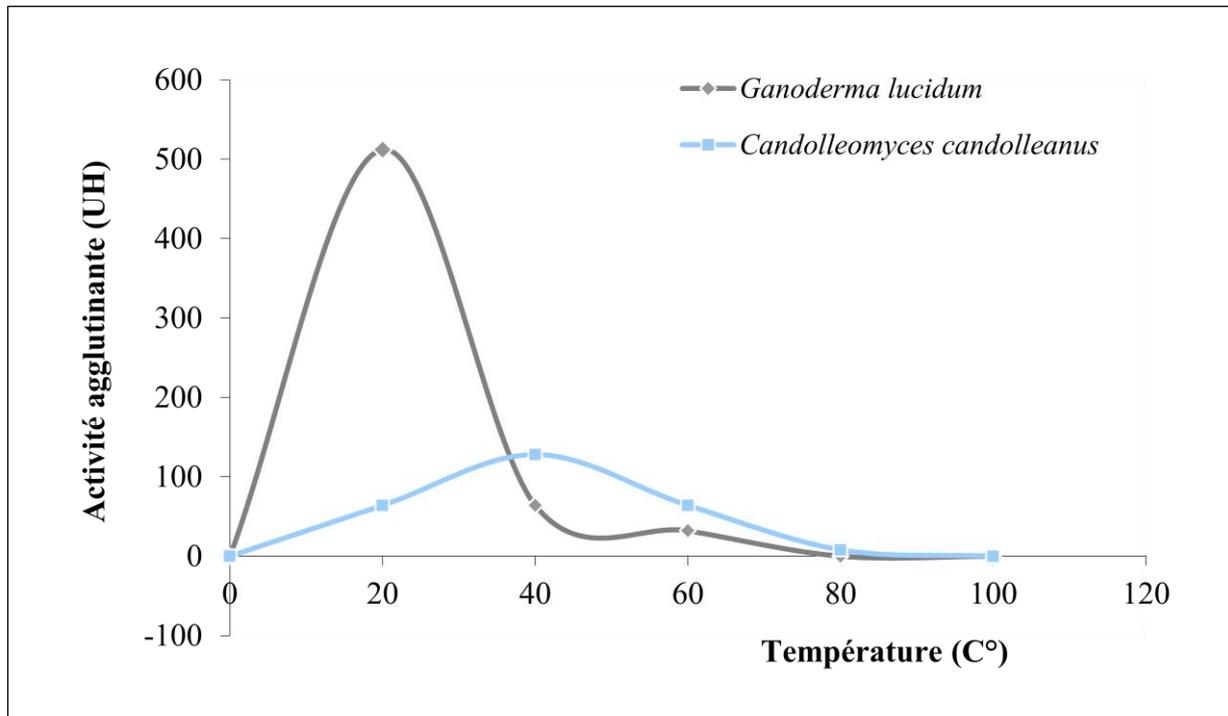


**Figure 16:** Limite d'agglutination des lectines d'extrait brut du *Candolleomyces candolleanus* chauffés à différentes température.

Après le traitement thermique de l'extrait brut du *Ganoderma lucidum* pendant 1h, notre lectine garde son pouvoir agglutinant aux degrés 20, 40 et 60°C où son activité à cette dernière se maintient jusqu'au cinquième puits soit à une dilution de (1/32), avec une perte totale d'activité à 80°C. Ce résultat est identique à celui de la lectine extraite à partir du même champignon qui garde son activité jusqu'à 60°C (Vinary U.G. et al., 2011). De plus, l'activité agglutinante de la lectine extraite du champignon *Pleurotus citrinopileatus* est stable jusqu'à la même température 60°C (Li Y.R. et al., 2008).

Le traitement thermique de l'extrait du *Candolleomyces candolleanus* montre qu'il garde son pouvoir agglutinant aux degrés 20, 40, 60 et 80°C. La température 80°C n'était pas suffisante pour inactiver totalement l'activité agglutinante de cet extrait, donc la lectine de cette espèce est thermorésistante dont son activité peut arriver jusqu'au troisième puits (1/8). Au-delà de cette température, 100°C, notre lectine perd son pouvoir agglutinant.

Ce résultat est similaire à celui de la lectine extraite du concombre de mer *Holothuria scabra* qui conserve son activité agglutinante après son incubation pendant 1h à 80°C (Gowda N.M. et al., 2008).



**Figure 17:** Détermination de la température optimale de la lectine du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*.

La lectine du *Ganoderma lucidum* a une température optimale de 20°C. Au-delà de cette température elle perd son activité (à 60°C la limite de dilution est de 1/32). Ce résultat est

identique à celui de la lectine des mullusques bivalves marins *Ruditapes philippinarum* qui montre une activité maximale à la température 20°C pendant 1h (Bulgakov A.A. et al., 2004). Cette température est très proche de celle de la lectine extraite du champignon *Ganoderma applanatum* qui est de 26°C (Kumaran S. et al., 2017).

La lectine du *Candolleomyces candolleanus* a une température optimale à 40°C. A 80°C, la limite de dilution est de 1/8. Elle est donc relativement résistante à un traitement thermique de 80°C pendant 1h.

L'optimum de température de notre lectine est similaire à celui de la lectine du champignon *Penicillium thomii*, qui présente une température optimale comprise entre 35-40°C durant un traitement thermique de 2h (Singh R.S. et al., 2009). Ce résultat aussi identique à la température optimale de la lectine des graines de la courge serpent *Trichosanthes anguina*, 40°C, dont son activité est maximale (Komath S.S., 2001).

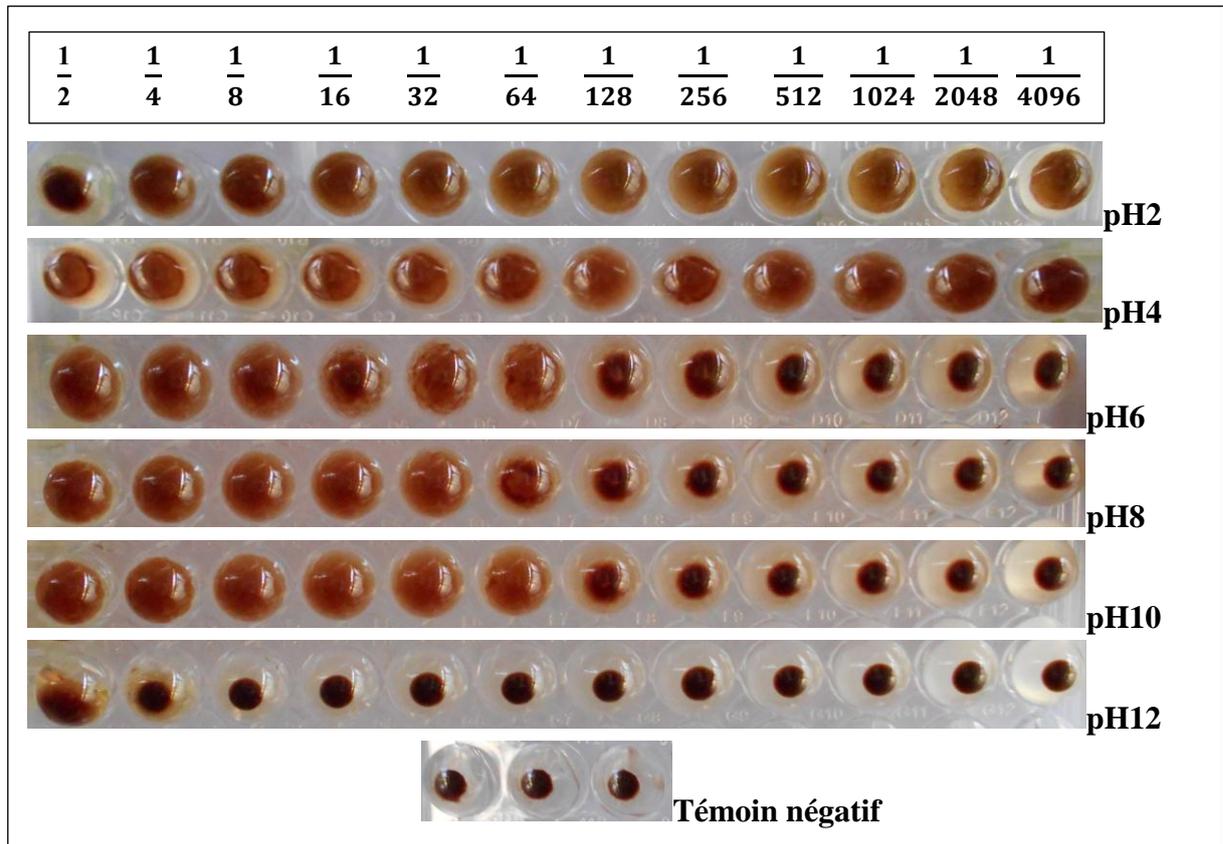
Par contre, l'activité maximale de la lectine purifiée des rhizomes du *Kaempferia parviflora* est comprise entre les températures 70 et 80°C pendant 1h (Konkummerd W. et al., 2010). Ces dernières sont plus élevées des températures optimales de nos lectines, la lectines du *G.lucidum* perd complètement son activité à 80°C tandis que celle du *C.candolleanus* montre son activité finale inférieure.

### 2.2. Effet du pH sur l'activité agglutinante:

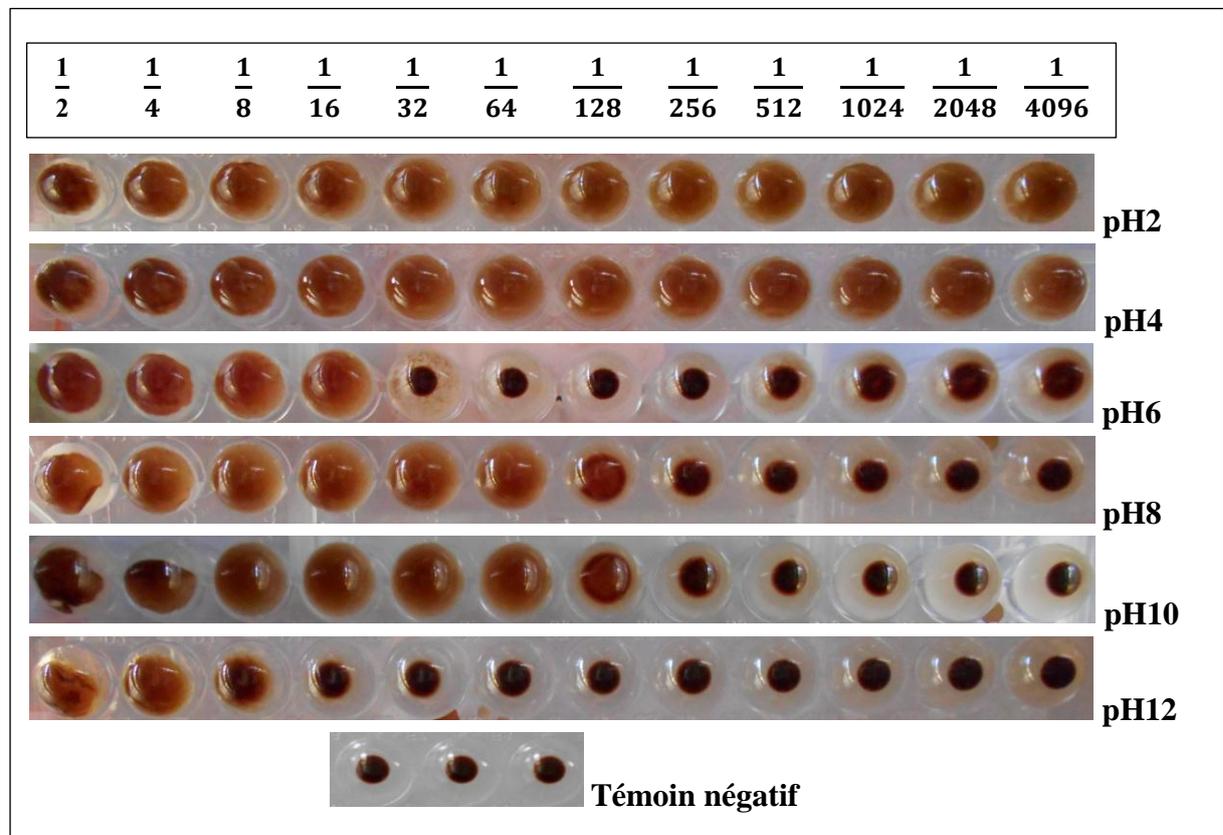
**Tableau 10:** Effet du pH sur l'activité agglutinante de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*.

Extrait \ pH	2	4	6	8	10	12
<i>Ganoderma lucidum</i>	+++	+++	++	++	++	+
<i>Candolleomyces candolleanus</i>	+++	+++	+	++	++	+

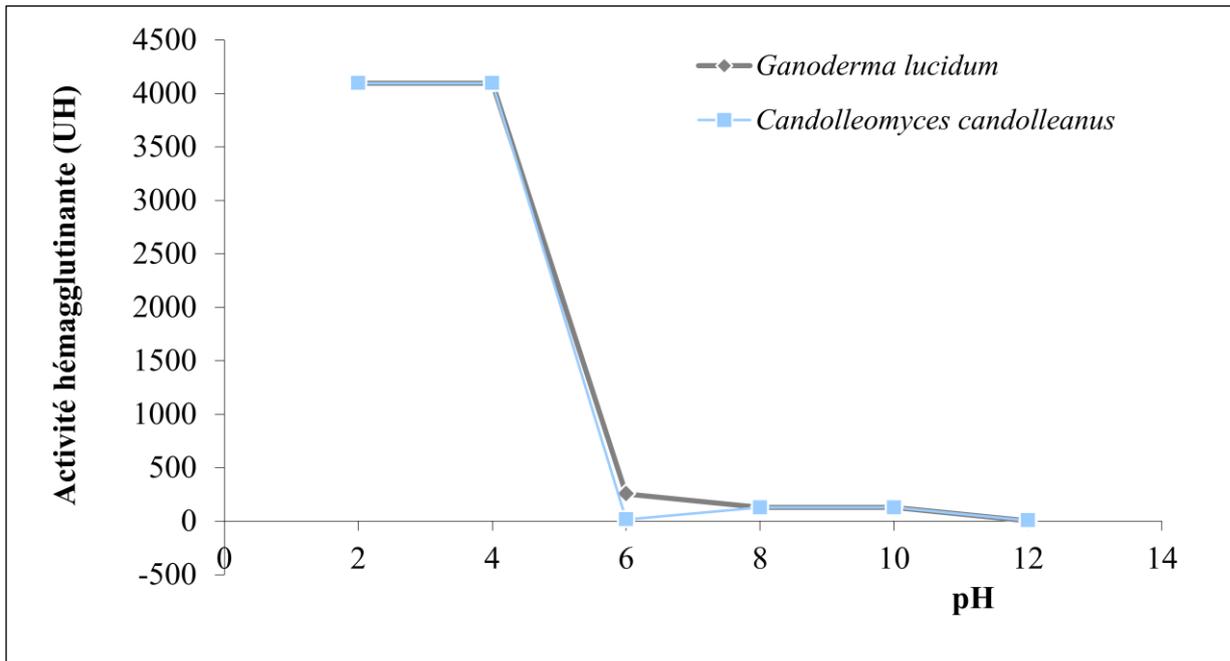
+++ : Très forte agglutination    ++ : Forte agglutination    + : Faible agglutination



**Figure 18:** Effet du pH sur la limite d'agglutination d'extrait brut du *Ganoderma lucidum*.



**Figure 19:** Effet du pH sur la limite d'agglutination d'extrait brut du *Candolleomyces candolleanus*.



**Figure 20:** Determination du pH optimale de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*.

Ces résultats montrent que les lectines du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus* ne perdent pas leur activité hémagglutinante dans la gamme pH 2 à pH 12. On observe clairement que nos deux lectines se sont comportées de manière similaire dans des conditions acides ou alcalines, dont leur activité maximale est évidemment associée aux degrés pH2 et pH4 même avec des dilutions faibles de l'ordre de (1/4096). Au-delà des degrés optimaux du pH, le pouvoir agglutinant de nos lectines diminue ou il est plus faible au pH 12 mais l'hémagglutination reste quand même visible, soit à la dilution (1/4) pour *G.lucidum* et (1/8) pour *C.candolleanus*.

Ces résultats sont plus ou moins similaires aux comportements d'autres lectines avec une tolérance meilleure pour les pH acides. La lectine purifiée à partir du champignon *Tricholoma giganteum* présente une activité maximale au pH 4 (Wang H.X. et Ng T.B., 2004).

La lectine purifiée des graines de la plante *Chenopodium quinoa* contient 5 isolectines dont les pH optimum sont de 2, 4, 6, 8 et 10. Les lectines dont les pH optimum 2, 6 et 10 possèdent des activités équivalentes entre elles mais supérieures à celles des lectines à pH 4 et 8 dont les activités sont également équivalentes (Pompeue D.G. et al., 2015).

Nos lectines ont des pH optimaux différents que celui de la lectine des graines du *Archidendron jiringa* dont son activité maximale est au pH basique 8 (Charungchitrak S., 2011).

Les caractéristiques physico-chimiques des lectines des champignons étudiés se résument ainsi:

- **La lectine du *Ganoderma lucidum*:**
  - Température optimale : 20°C.
  - pH optimum acide: pH 2 et pH 4.
- **La lectine du *Candolleomyces candolleanus*:**
  - Température optimale : 40°C.
  - pH optimale acide: pH 2 et pH4.

### 3. Test d'inhibition de l'activité agglutinante:

#### 3.1. Test d'inhibition par les glucides:

Pour déterminer la spécificité des lectines vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de l'hémagglutination par une série des sucres. Ce test est aussi utilisé pour identifier le sucre qu'on peut utiliser éventuellement lors d'une chromatographie d'affinité pour la purification de ces lectines.

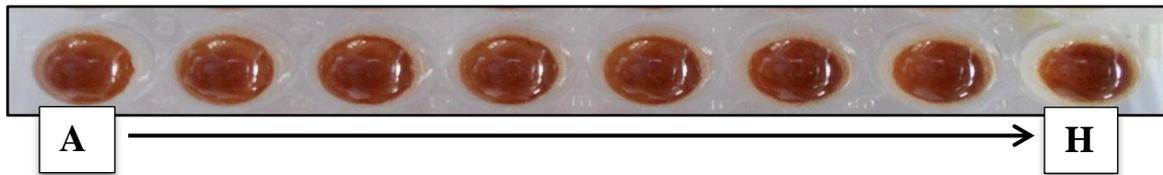
Les résultats obtenus sont décrits dans les tableaux et les figures ci-dessous.

**Tableau 11:** Inhibition de l'activité hémagglutinante du *Ganoderma lucidum* par différents sucres.

Sucres	Activité inhibitrice d'agglutination
D-glucose	-
D-galactose	-
D-arabinose	-
D-mannose	-
D-lactose	-
D-maltose	-
D-cellobiose	-
D-glucosamine HCl	-

+ : Inhibition d'agglutination

- : Absence d'inhibition d'agglutination



**Figure 21:** Test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait du *G. lucidum* par glucose (A), galactose (B), arabinose (C), mannose (D), lactose (E), maltose (F), cellobiose (G), glucosamine HCl (H).

Ce test nous a permis de constater clairement que notre extrait du *G. lucidum* ne présente aucune spécificité pour les huit sucres testés, ce qui résulte par la suite son agglutination aux hématies.

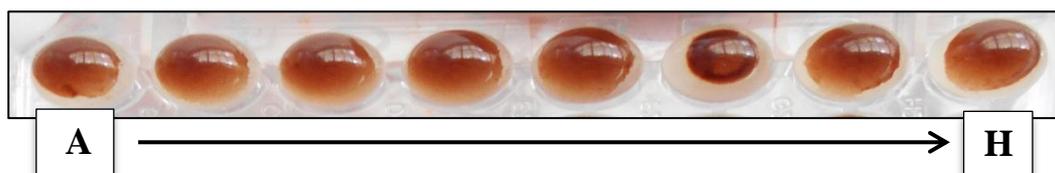
Ces résultats sont similaires à ceux de la lectine extraite à partir du même champignon, son activité est inhibée par les glycoprotéines et non pas par les sucres simples (Vinary U.G. et al., 2011), c'est aussi le cas des lectines extraites des algues marines : *Boodlea coacta*, *Hypnea japonica*, *Carpopeltis flabellata* et *Solieria robusta* qui présentent une spécificité à divers glycoprotéines, mais elles n'ont aucune affinité avec les sucres simples (Hori K. et al., 1990).

**Tableau 12:** Inhibition de l'activité hémagglutinante de l'extrait du *Candolleomyces candolleanus* par différents sucres.

Sucre	Activité inhibitrice d'agglutination
D-glucose	-
D-galactose	-
D-arabinose	-
D-mannose	-
D-lactose	-
D-maltose	-
Cellobiose	+
D-glucosamine HCl	-

+ : Inhibition d'agglutination

- : Absence d'inhibition d'agglutination



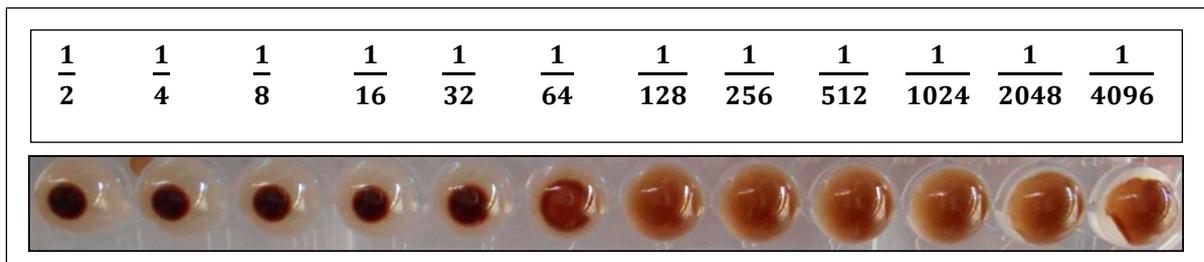
**Figure 22:** Test d'inhibition d'hémagglutination de l'extrait du *G. lucidum* par glucose (A), galactose (B), arabinose (C), mannose (D), lactose (E), cellobiose (F), maltose (G), glucosamine HCl (H).

L'activité agglutinante de l'extrait du *C.candolleanus* n'était pas inhibée par le glucose, galactose, arabinose, mannose, lactose, maltose et la glucosamine HCl. Cependant, elle est inhibée par le cellobiose.

Ce résultat est identique à plusieurs autres travaux de recherche. La lectine du *C.candolleanus* est de même nature que celle purifiée des graines d'*Ulex europaeus*, car son activité hémagglutinante est inhibée par le cellobiose à forte concentration (Horejsi V., 1979). De plus, la lectine purifiée de la tige de la plante d'arachide *Arachis hypogaea* montre une spécificité pour le cellobiose (Singh R. et Das H.R., 1994).

L'inhibition de l'activité agglutinante est due à la reconnaissance entre les lectines et les sucres et l'interaction par des liaisons covalentes (les sucres ont une affinité avec le site où les sites actifs de la lectine appelé "**domaine de reconnaissance des glucides**").

### 3.2. Test de la limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose:



**Figure 23:** Test de la limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose sur l'extrait du *Candolleomyces candolleanus*.

**Tableau 13:** Limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose sur l'extrait du *Candolleomyces candolleanus*.

Dilution	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
Limite inhibitrice d'agglutination	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-

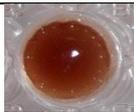
+++ : Très forte inhibition    ++ : Forte inhibition    + : Faible inhibition    - : Absence d'inhibition

Les résultats de la limite inhibitrice d'agglutination par le cellobiose montrent que son effet inhibiteur a un seuil soit à la dilution 1/64, et au-delà de ce dernier les lectines reprennent

leur activité hémagglutinante. A ce point-là, le sucre inhibiteur n'est plus fixé donc les lectines peuvent se lier aux saccharides des hématies.

### 4. Test d'agglutination avec les hématies humaines ABO:

**Tableau 14:** Test d'hémagglutination de l'extrait du *Ganoderma lucidum* avec les érythrocytes humains ABO.

Groupe sanguin	A	B	AB	O (H)
Activité agglutinante				

**Tableau 15:** Test d'hémagglutination de l'extrait du *Candolleomyces candolleanus* avec les érythrocytes humains ABO.

Groupe sanguin	A	B	AB	O (H)
Activité agglutinante				

Le test d'hémagglutination avec les hématies humaines ABO montre une agglutination avec tous les groupes sanguins du système ABO. Les lectines du *G.lucidum* et *C.candolleanus* sont donc polyvalentes d'un point des interactions avec les 4 groupes glycosidiques qui caractérisent les groupes sanguins humains (**tableaux 14,15**). Nos résultats indiquent qu'on ne pourra pas utiliser ces lectines comme réactif de groupage pour la détermination des groupes ABO.

Cette propriété est identique à la lectine du sérum de crevette *Litopenaeus vannamei* (Sun J., 2007) et à la lectine des graines du *Pisum sativum* (Sitohy M., 2007) qui se lient aux 4 groupes sanguins : A, B, O et AB. Par contre, il existe des espèces végétales qui ne possèdent aucune activité agglutinante vis-à-vis les 4 groupes sanguins. Il s'agit des lectines de : *Solanum lycopersium*, *Musa paradisiaca*, *Allium cepa*, *Vitis vinifera* (Zubcevic N. et al., 2016).

5. Purification partielle de l'extrait du *Ganoderma lucidum* et du *Candolleomyces candolleanus*:

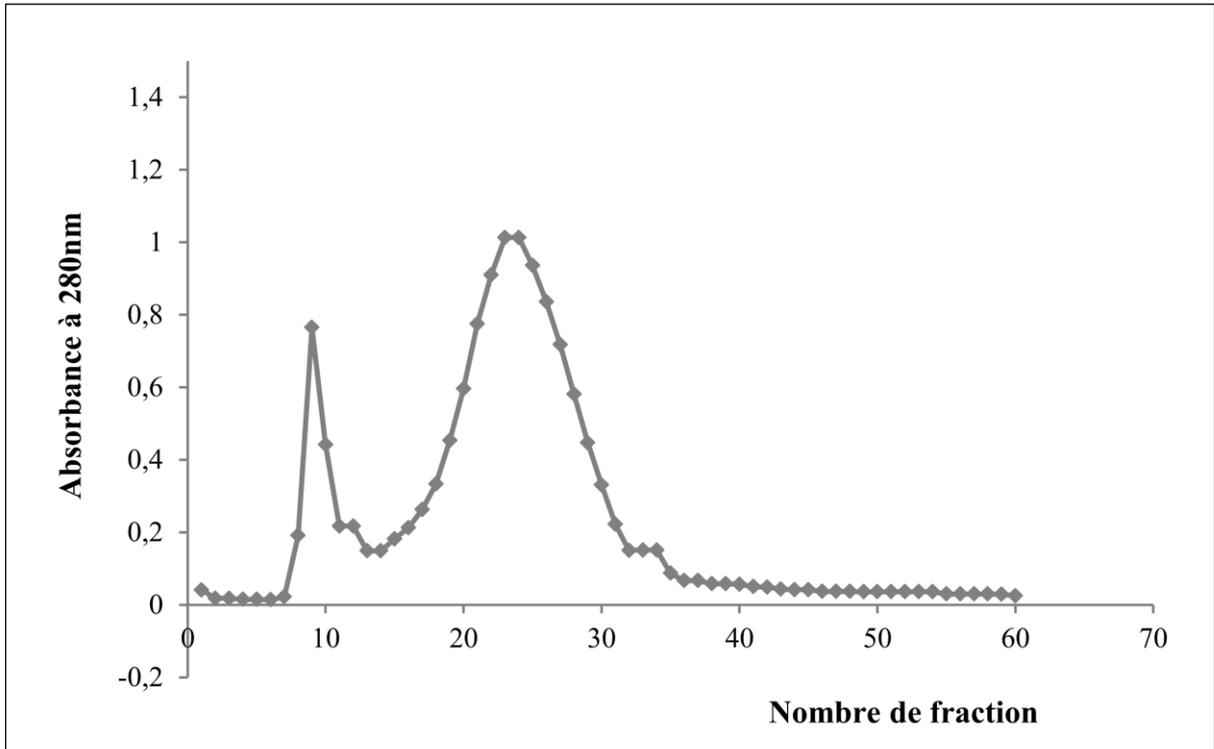


Figure 24: Profil de chromatographie sur gel sephadex G50 de l'extrait brut du *Ganoderma lucidum*.

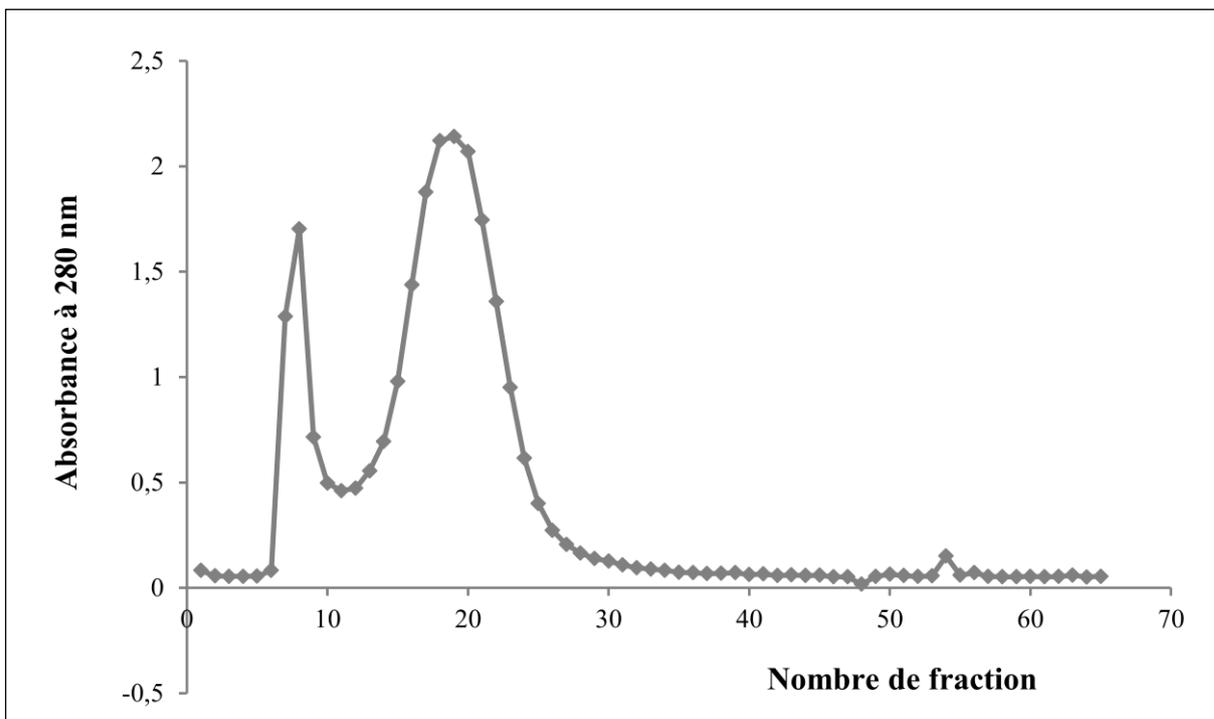


Figure 25: Profil de chromatographie sur gel sephadex G50 de l'extrait brut du *Candolleomyces candolleanus*.

Le volume de rétention : 4ml.

L'éluant : PBS (0.1 M, pH 7,4).

La longueur d'onde :  $\lambda = 280\text{nm}$ .

Le profil d'éluion de la figure X (qui correspond à l'extrait du *Ganoderma lucidum*), montre deux pics protéiques mesurés à 280 nm:

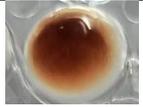
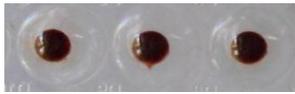
- Un 1<sup>er</sup> pic de concentration protéique moyenne élué aux fractions 8-13,
- Un 2<sup>ème</sup> pic majeur élué aux fractions 20-30.

Le profil d'éluion de la figure Y (correspond à l'extrait du *Candolleomyces candolleanus*), montre trois pics protéiques mesurés à 20 nm:

- Un 1<sup>er</sup> pic relativement élevé en concentration protéiques éluee aux fractions 5-10.
- Un 2<sup>ème</sup> pic majeur élué aux fractions 15-25.
- Un 3<sup>ème</sup> pic de très faible concentration protéique élué aux fractions 53-55.

Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces tubes, un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies fixées du lapin à 4% selon le protocole décrit précédemment. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

**Tableau 16:** Test d'hémagglutination des fractions 9 et 10 du *Ganoderma lucidum*.

Fraction	9	10
Activité agglutinante		
Témoin négatif		

**Tableau 17:** Test d'hémagglutination des fractions 7, 8 et 10 du *Candolleomyces candolleanus*.

fraction	7	8	9
Activité agglutinante			
Témoin négatif			

Les résultats obtenus ont réellement confirmé la présence des lectines avec une très forte hémagglutination. Les extraits obtenus par la chromatographie sur colonne ont une activité supérieure à celle des extraits initiaux. Ce résultat pourrait insinuer que l'extrait issu de la chromatographie sur colonne contient moins d'impureté sans être un extrait pur de lectine.

Le test d'hémagglutination nous a permis de sélectionner les fractions contenant nos lectines. Pour les deux échantillons *Ganoderma lucidum* et *Candolleomyces candolleanus*, les premiers pics représentent nos lectines cependant les autres pics reviennent à d'autres protéines.

Une étude de purification de lectines des graines de *Bandeiraea simplicifolia* par chromatographie d'affinité a révélé des résultats semblables aux nôtres, dont les fractions d'un pic seulement montrent une activité hémagglutinante. Cependant l'autre pic correspond à d'autres protéines (Hayes C.E. et Goldstein J.I., 1973). C'est aussi le cas de la lectine purifiée d'éponge *Aplysina archeri* (Miarons P.B. et Fresno M., 2000).

# *Conclusion et Perspectives*

## Conclusion et Perspectives

La recherche des molécules bioactives est toujours d'actualité pour éradiquer les pathologies persistantes (Cancer, diabète, les maladies cardiaques, les infections...). Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressées à la caractérisation des lectines fongiques. Ces derniers sont des glycoprotéines à propriétés biologiques.

Nous avons tout d'abord opéré une extraction de plusieurs champignons (macromycètes), la macération après le broyage des échantillons par un tampon PBS (0.1M, pH 7.4) pendant 24h à 4°C suivi d'une centrifugation pour récupérer les surnageants, pour la mise en évidence de la présence des lectines, nous avons passé par la suite au test d'hémagglutination. Après avoir testé nos échantillons, les deux espèces «*Ganoderma lucidum*» et «*Candolleomyces candolleanus*» ont été choisies pour effectuer nos tests souhaités.

Nos recherches ont montré que les lectines des deux champignons possèdent un fort pouvoir agglutinant, celle du «*Candolleomyces candolleanus*» peut résister à des seuils élevés de température qui s'étend jusqu'à 80°C.

Les deux extraits de «*Ganoderma lucidum*» et «*Candolleomyces candolleanus*», ont montré une activité hémagglutinante dans un intervalle large de pH de 2 à 12, l'activité a connu une stabilité vis-à-vis des pH très acides pH2 et pH4 où elle était maximale, c'est le pH optimal.

Le test d'agglutination effectué sur les hématies humaines du système ABO démontre que nos lectines extraites des deux champignons ont provoqué l'agglutination des érythrocytes de tous les groupes sanguins du système ABO, et donc on conclut qu'elles ne sont pas spécifiques à un groupe sanguin donné. Ces lectines ne peuvent pas être utilisées comme réactifs de groupage.

De plus, nous avons démontré que la lectine extraite du champignon «*Ganoderma lucidum*» n'a aucune affinité vis-à-vis les sucres utilisés (cellobiose, galactose, glucose, mannose, lactose, maltose, arabinose, glucosamine HCL). Ces derniers n'ont pas inhibé l'activité hémagglutinante de cette lectine avec les érythrocytes du lapin. Tandis que la lectine extraite du champignon «*Candolleomyces candolleanus*» est inhibée par le cellobiose, cette affinité permet la purification de cette lectine.

La purification partielle par le biais d'une chromatographie sur gel d'exclusion moléculaire Sephadex G50, nous a permis d'obtenir les profils d'élution dans lesquels sont mis en évidence 2 pics. Les premiers pics des extraits du «*Candolleomyces candolleanus*» et du «*Ganoderma lucidum*» représentent des lectines et le deuxième pic de chacun d'entre eux correspond à d'autres protéines.

Les perspectives de notre travail sont nombreuses et variées, et la poursuite des recherches sur ces lectines impliquent au préalable l'utilisation des techniques et des méthodes capables de fournir une très bonne purification et caractérisation de ces glycoprotéines.

Plusieurs axes doivent être menés, par exemple :

- L'utilisation d'autres sucres pour déterminer leur spécificité et surtout pour procéder à une chromatographie d'affinité afin de purifier totalement ces lectines.
- la détermination des poids moléculaires des lectines par électrophorèse et leur séquençage.
- Une étude cristallographique afin de déterminer la structure 3D avec de bonnes résolutions.

Les résultats de ces recherches pourraient également être poursuivis par des études in vivo et in vitro sur leur impact sur les plans immunologiques, anticancéreux, antidiabétiques, antioxydants et antiviraux. Tous ces paramètres pourraient mieux nous orienter pour l'évaluation du potentiel biologique, thérapeutique et immunomodulateur de ces lectines fongiques.

## **Références Bibliographiques**

## A

**Adhikari M.K. (2015).** PSATHYRELLA CANDOLLEANA (FR.:FR.) MAIRE VAR. CANDOLLEANA (FR.) MAIRE: A NEW RECORD OF MUSHROOM FOR NEPAL. *J.Sci.Worl.* 12(12): 77-78.

**Alencar N.M.N.,** Cavalcante C.F., Vasconcelos M.P., Leite K.B., Aragão K.S., Assreuy A.M.S. et Vale M.R. (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J. Pharm. Pharm.* 57(7): 919-922.

**Al-Habib M.N.,** Holliday J. et Aladahmy. M.S. (2018). *Psathyrella candolleana* and *Agaricus bisporus* Extracts Provide Protection against DNA Oxidative Damage Induced by Doxorubicin. *Int.J.Med.Mush.* 20(8): 749-759.

**Ando T.,** Kodera N., Takai E., Maruyama D., Saito K. et Toda A. (2001). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Nat.Aca.Sci.* 98(22): 12468-12472.

**Ang A.S.W.,** Cheung R.C.F., Dan X., Chan Y.S., Pan W. et Ng, T.B. (2014). Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese pinto beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. *App. Bioche.Biot.* 172(2) : 672-686.

**Aragão K.S. (2008).** Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. Doctoral dissertation. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

**Arnaud J. (2014).** Ingénierie de lectines de valence, topologie et spécificité contrôlées pour la biologie cellulaire et la biotechnologie. Doctoral dissertation. Université de Grenoble.83-90.

**Ashton A.W.,** Boehm M.K., Gallimore J.R., Pepys M.B. et Perkins S.J. (1997). Pentameric and decameric structures in solution of serum amyloid P component by X-ray and neutron scattering and molecular modelling analyses. *J. Mol. Bio.* 272(3) : 408-422.

**Aymred,J.P. (2012).** Karl Landsteiner (1868–1943) and the discovery of blood groups. *Transfusion clinique et biologique.* 19:244-248.

**Bernicchia A. (2005).** FUNGI EUROPAEI. Polyporaceae. 235-236.

**Bijalwan A.,** Bahuguna K., Vasishth A., Singh A., Chaudhary S., Tyagi A., et Chourasia P.K. (2020). Insights of medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*): prospects and potential in India. *Biod. Inter. J.* 4(5): 202-210.

## B

**BIRD G.W.G (1974).** Plant and other agglutinins in the study of some human erythrocyte membrane anomalies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234: 129-144.

**Bouteldja H. et Ynineb L.E. (2019).** Purification partielle, caractérisation et effet anti-inflammatoire des lectines extraites à partir du champignon (*Lepista seava*) et du gland du chêne vert (*Quercus suber*). 5-6.

**Boyd W.C. (1970).** Lectins. *J.Sci.* 169: 168-190.

**Boyd W.C. et Shapleigh E. (1954).** Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Scie.* 119(3091): 419.

**Boyd W.C., Almodóvar L.R. et Boyd L.G. (1966).** Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *Trans.* 6(1): 82-83.

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

## C

**Calvete J.J., Costa F.H.F., Saker-Sampaio S., Murciano M.P.M., Nagano C.S., Cavada B.S., Grangeiro T.B., Ramos M.V., Bloch J.C., Silveira S.B., Freitas B.T. et Sampaio A.H. (2000).** The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell. Mol. Lif. Sci.* 57(2): 343-350.

**Charungchitrak S. Petsom A. Sangvanich P. et Karnchanatat A. (2011).** Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food. Chem.* 126(3): 1025-1032.

**Cioci G., Mitchell E.P., Chazalet V., Debray H., Oscarson S., Lahmann M., Gautier C., Breton C., Perez S. et Imberty A. (2006).**  $\beta$ -Propeller crystal structure of *Psathyrella velutina* lectin: an integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *J. Mol Bio.* 357(5): 1575-1591.

**Concon J.M., Newburg D.S. et Eades S.N. (1983).** Lectins in Wheat Gluten protein. *J.Agric. Food. Chem.* 31: 939-941.

## D

**Danguy A.,** Camby I. et Kiss R. (2002). Galectins and cancer. *Bioch et Bioph Acta.* 1572(2-3): 285-293.

**Dhalla N.S.,** Temsah R.M et Netticadan T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hyper.* 18(6):655-673.

**Donnelly E.H.** et Goldstein I.J. (1970). Glutaraldehyde-insolubilized concanavalin A: an adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins. *Bioch. J.* 118(4): 679-680.

**Du J.,** Lu W.L., Ying X., Liu Y., Du P., Tian W., Men Y., Guo J., Li R.J. et Zhang Q. (2009). Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood– brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals. *Mol. Pharm.* 6(3):905-917.

**Dundar A.,** Okumus V., Ozdemir S., Celik K.S., Boga M., Ozcagli E., Ozhan G. et Yildiz A. (2015). Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic and Anticholinesterase Activities of Seven Mushroom Species with their Phenolic Acid Composition. *J.Hort.* 2(4): 1-7.

## E

**Elluru S.R.,** Van Huyen J.P.D., Delignat S., Prost F., Heudes D., Kazatchkine M.D., Friboulet A. et Kaveri S.V. (2009). Antiangiogenic properties of viscum album extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Antic. Resea.* 29(8):2945-2950.

**Etzler M.E.** et Kabat E.A. (1970). Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichos biflorus*. *J.Biochem.* 9(4): 869-877.

**Ewers H.,** Römer W., Smith A.E., Bacia K., Dmitrieff S., Chai W., Mancini R., Kartenbeck J., Chambon V., Berland L. et Johannes L. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat. Cell. Bio.* 12(1): 11-18.

## F

**Fernandes A.** (2017). Agglutinogène. Knoo.Net.  
<https://knoow.net/fr/sciences-terre-vie/biologie/agglutinogene/>

## G

**Ghopskins W.** et Evrard C.M. (2003). *Physiologie Végétale.* Deboeck. 1ère édition : 104-105.

**Giollant M.,** Guillot J., Damez M., Dusser M., Didier P. et Didier E. (1993). Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus* (research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation). *Plan. Physio.* 101(2): 513-522.

**Goldstein I.J. (1980).** What should be called a lectin?. *Nat.* 285(66).

**Gowda N.M.,** Goswami U. et Khan M.I. (2008). Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). *Fish. Shell. Immu.* 24(4): 450-458.

**Grahn E.M.,** Winter H.C., Tateno H., Goldstein I.J. et Krenzel U. (2009). Structural Characterization of a Lectin from the Mushroom *Marasmius oreades* in Complex with the Blood Group B Trisaccharide and Calcium. *J.Mol.Bio.* 390(3): 457-466.

**Guillot J.,** Guerry M., Kanska G., Caldefie-Chezet F., De Latour M. et Penault-Llorca F. (2004). Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull. Can.* 91(2): 141-158.

## H

**Hayes C.E.** et Goldstein J. (1973). A  $\alpha$ -D-Galactosyl-binding Lectin from *Bandeiraea simplicifolia* Seeds. *J. Biol. Chem.* 249(25): 1904-1914.

**Herbalist R.U. (2006).** Reishi Mushroom, *Ganoderma lucidum*. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. *Amer. Herb. Pharm.* 1-28.

**Hirabayashi J. (2004).** Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glyc. J.* 21(1) :35-40.

**Hordé P. (2015).** Rhésus-Définition. *Issu du santé-médecine.*

**Horejsi V. (1979).** Properties of *Ulex europaeus* II lectin isolated by affinity chromatography. *Bioch. Bioph.Acta.* 577(2): 389-393.

**Hori K.,** Miyazawa K. et Ito K. (1990). Some common properties of lectins from marine algae. *Chem.Comp.* 204: 561-566.

**Hündling D. (2015).** Caractérisation biochimique et structurale de lectines d'*Aspergillus fumigatus*. Doctoral dissertation. Université Grenoble Alpes (ComUE).

## I

**Imberty A.** et Varrot A. (2008). Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opi. Struc. Bio.* 18(5):567-576.

**Ito N.,** Nishi K., Kawahara S., Okamura Y., Hirota T., Rand S., Fechner G. et Brinkmann B. (1990). Difference in the ability of blood group-specific lectins and monoclonal antibodies to recognize the ABH antigens in human tissues. *J.hist.chem.* 22: 604-614.

## J

**Jain D.,** Kaur K.J. et Salunke D.M. (2001). Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Bioph. J.* 80(6):2912-2921.

**Janot, C.,** Mannessier, L., Chiaroni, J., Lejealle, A., Nafissi S. et Roubinel, F. (2002). Immunohématologie et groupes sanguins. *Cahier de formation Bioforma.* N26 Paris.

**Jeyaprakash A.A.,** Katiyar S., Swaminathan C. P., Sekar K., Surolia A. et Vijayan M. (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J. Mol Bio.* 332(1):217-228.

## K

**Kasuya T.,** Jung J., Kadoya H., Matsuzaki T., Tatematsu K., Okajima T., Miyoshi E., Tanizawa K. et Kuroda S.I. (2008). In vivo delivery of bionanocapsules displaying Phaseolus vulgaris agglutinin-L4 isolectin to malignant tumors overexpressing N-acetylglucosaminyltransferase V. *Hum.Gen. Ther.* 19(9):887-895.

**Kawamura T.,** Ogawa Y., Aoki R. et Shimada S. (2014). Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Derm. Scie.* 75(3): 159-166.

**Khan F.,** Khan R.H., Sherwani A., Mahmood S. et Azfer M.A. (2002). Lectins as markers for blood grouping. *Med.Sci.Monit.* 8(12): 293-300.

**Khil L.Y.,** Kim W., Lyu S., Park W.B., Yoon J.W. et Jun H.S. (2007). Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *J. Gastro.* 13(20): 2811.

**Kolatkhar A.R.,** Leung A.K., Isecke R., Brossmer R., Drickamer K. et Weis W.I. (1998). **Mechanism** of N-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain. *J. Bio. Chem.* 273(31):19502-19508.

**Komath S.S.,** Kenoth R. et Swamy M.J. (2001). Thermodynamic analysis of saccharide binding to snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin. Euro. J. Bioch. 268: 111-119.

**Konkummerd W.,** Karnchanatat A. et Sangvanich P. (2010). A thermostable lectin from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. J. Scie.Food. Agri. 90(11): 1920-1925.

**Kostlánová N.,** Mitchell E.P., Lortat-Jacob H., Oscarson S., Lahmann M., Gilboa-Garber N., Chambat G., Wimmerova M. et Imberty A. (2005). The fucose-binding Lectin from *Ralstonia solanacearum*: a new type of  $\beta$ -propeller architecture formed by oligomerization and interacting with fucoside, fucosyllactose, and plant xyloglucan. J. Bio. Chem. 280(30): 2783-2784.

**Kumaran S.,** Pandurangan A.K., Shenbhagaraman R. et Esa N.M. (2017). Isolation and Characterization of Lectin from the Artist's Conk Medicinal Mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), and Evaluation of Its Antiproliferative Activity in HT-29 Colon Cancer Cells.

**Kyle R.A.,** MD., Shampo M.A. et PhD. (2001). Karl Landsteiner Discoverer of the Major Human Blood Groups. *Mayo Clin Proc.* 76:830.

## L

**Labbé R.** (2021). *Candolleomyces candolleanus* / *Psathyrelle de De Candolle*. Mycoquéb.org. <https://www.mycoquebec.org/bas.php?post=Candolleomyces&l=r&nom=Candolleomyces%20candolleanus%20s.l.%20/%20Psathyrelle%20de%20De%20Candolle&tag=Candolleomyces%20candolleanus&gro=33>

**Lam S.K.** et Ng T.B. (2010). Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phyto.* 17(6): 457-462.

**Lee J.Y.,** Kim J.Y., Lee Y.G., Byeon S.E., Kim B.H., Rhee M.H. et Cho J.Y. (2007). In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Bio. Pharm. Bull.* 30(11):2043-2051.

**Li F.,** Zhang Y. et Zhong Z. (2011). Antihyperglycemic Effect of *Ganoderma Lucidum* Polysaccharides on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 12(9): 6135-6145.

**Li Y.R.,** Liu Q.H., Wang H.X. et Ng T.B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioch. Bioph. Acta.* 1780: 51-57.

**Lis H.** et Sharon N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98(2):637-674.

**Liu Y.P.**, Dai Q., Pu C.J., Wang M., Li Z.H., Liu J.K. et Feng T. (2019). Psathyrellanic Acid, a Monocyclic Diterpenoid From the Basidiomycete *Psathyrella candolleana*. *Sag.J.14(6):1-4*.

**Liu Y.P.**, Dai Q., Wang W.K., He J., Li Z.H., Feng T. et Liu J.K. (2020). Psathyrins: Antibacterial Diterpenoids from *Psathyrella candolleana*. *J.Nat.Prod.* 83(5): 1725-1729.

**Liu Y.P.**, Pu C.J., Wang M., He J., Li Z.H., Feng T., Xie J. et Liu J.K. (2019). Cytotoxic ergosterols from cultures of the basidiomycete *Psathyrella candolleana*. *Fito.J.* 138: 1-4.

## M

**Ma H.T.** Hsieh J.F. et Chen S.T. (2015). Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phyt. J.* 114: 109-113.

**Mahajna J.**, Dotan N., Zaidman B.z., Petrova R.D. ET Wasser S.P. (2013). Pharmacological Values of Medicinal Mushrooms for Prostate Cancer Therapy: The Case of *Ganoderma Lucidum*. *Nutr. Canc.* 61: 16-26.

**Miarons P.B.** et Fresno M. (2000). Lectins from Tropical Sponges. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LECTINS FROM GENUS *APLYSINA*. *Glyc. Extra. Matr.* 275(38): 29283-29289.

**Midlej V.**, Meinig I., Souza W. et Benchimol M. (2013). A new set of carbohydrate-positive vesicles in encysting *Giardia lamblia*. *Protist.* 164(2): 261-271.

**Mikiashvili N.A.**, Elisashvili V.I., Wasser S.P. et Nevo E.D. (2006). Comparative Study of Lectin Activity of Higher Basidiomycetes. *Inter. J. Med. Mush.* 8: 31-38.

**Miyoshi M.**, Nakabayashi J., Hara T., Yawata T., Tsukamoto I. et Hamaguchi Y. (1982). The lethal protein from Kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. Vitam.* 28(3): 255-264.

**Morgan G.W.**, Goulding D. et Field M.C. (2004). The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J. Bio. Chem.* 279(11):10692-10701.

**Morgan G.W.**, Kail M., Hollinshead M. et Vaux D.J. (2013). Combined biochemical and cytological analysis of membrane trafficking using lectins. *Anal. Bioch.* 441(1):21-31.

## N

**Nachbar M.S.** et Oppenheim J.D. (1980). Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *Ame.J.Clin.Nutr.* 33(11): 2338-2345.

**Nachbar M.S.** et Oppenheim J.D. (1980). Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *Ame. J. Clin. Nutr.* 33(11): 2338-2345.

**Nahata A.** (2013). *Ganoderma lucidum*: A Potent Medicinal Mushroom with Numerous Health Benefits. *Phar. Anal. Acta.* 4(10): 159-162.

**Ng T.B.** (2004). Peptides and proteins from fungi. *Pep.* 25(6): 1055-1073.

## **P**

**Park S.,** Lee M.R. et Shin I. (2008). Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.* 37(8): 1579-1591.

**Pean R.** et Schwab N. (2021). *Psathyrella candolleana*. MycoDB. <https://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=Psathyrella&espece=candolleana>

**Pemberton R.T.** (1994). Agglutinins (lectins) from some British higher fungi. *Myc. Res.* 98(3): 277-290.

**Peumans W.J.** et Van Damme E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plan. Phys.* 109(2): 347.

**Pilobello K.T.,** Slawek D.E. et Mahal L.K. (2007). A ratiometric lectin microarray approach to analysis of the dynamic mammalian glycome. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 104(28): 1534-1539.

**Pokrovskaya I.D.,** Willett R., Smith R.D., Morelle W., Kudlyk T. et Lupashin V.V. (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery. *Glyc.* 21(12):1554-1569.

## **R**

**Ramata.N.** (2010). ETUDE DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DESLECTINES ISOLEES DES GRAINES DE *Abrus precatorius*.L. Thèse de doctorat. Université de Bamako Mali.

**Rhodes J.M.,** Campbell B.J. et Yu L.G. (2008). Lectin–epithelial interactions in the human colon. *Bioch. Soc. Trans.* 36(6):1482-1486.

**Robert K.** et Marry M.D. (2008). Les glycoprotéines in *Biochimie de Harper*. Debo .527.

**Rogers D.J.** et Hori K. (1993). Marine algal lectins: new developments. *Hydro.* 260(1): 589-593.

**Rudiger H. (1977).** Purification and Properties of Blood-Group-Specific Lectins from *Vicia cracca*. *Eur.J.Bio.* 72(2): 317-322.

**Rüdiger H. (1993).** Isolation of plant lectins. *Lec. Glyc.* 31-46.

**Rüdiger H. et Gabius H.J. (2001).** Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glyc. J.* 18(8): 589-613.

## S

**Sabotič J. et Kos J. (2019).** CNL–*Clitocybe nebularis* Lectin—The Fungal GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-Binding Lectin. *J.Mol.* 24(23):4204.

**Sadananda T.S., Govindappa M. et Ramachandra Y.L. (2014).** In vitro antioxidant activity of lectin from different endophytic fungi of *Viscum album* L. *J. Pharm. Res. Intern.* 626-643.

**Saha R.K., Acharya S., Jamiruddin M., Roy P., Islam M.M.S. et Shovon S.S.H. (2014).** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *J. Phyto.* 3: 44-51.

**Sakuma S., Yano T., Masaoka Y., Kataoka M., Hiwatari K.I., Tachikawa H., Shoji Y., Kimura R., Ma H., Yang Z. et Yamashita S. (2009).** In vitro/in vivo biorecognition of lectin-immobilized fluorescent nanospheres for human colorectal cancer cells. *J. Contr. Rel.* 134(1): 2-10.

**Sakuma S., Yano T., Masaoka Y., Kataoka M., Hiwatari K.I., Tachikawa H., Shoji Y., Kimura R., Ma H., Yang Z. et Yamashita S. (2010).** Detection of early colorectal cancer imaged with peanut agglutinin-immobilized fluorescent nanospheres having surface poly (N-vinylacetamide) chains. *Euro. J. Pharm. Biophar.* 74(3): 451-460.

**Sampaio A.H., Rogers D.J. et Barwell C.J. (1998).** A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochem.* 48(5):765-769.

**Santos A.F., Da Silva M.D.C., Napoleão T.H., Paiva P.M.G., Correia M.D.S. et Coelho L.C.B.B. (2014).** Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. 42-62.

**Schöffski P., Riggert S., Fumoleau P., Campone M., Bolte O., Marreaud S. et Twelves C. (2004).** Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Ann. Onco.* 15(12):1816-1824.

**Sharon N.** et Lis H. (1990). Legume lectins a large family of homologous proteins. *Fas. J.* 4(14): 3198-3208.

**Sharon N.** et Lis H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glyco.* 14(11):53-62.

**Singh A.P.,** Bhari R.Saxsena K.D. (2013). Biological Activity of Purified Momardica Charantia Lectin. *Chem.Sci.Tran.* 2:258-262.

**Singh N.** et Cohen P.L. (2012). The T cell in Sjogren's syndrome: force majeure, not spectateur. *J. Auto.* 39(3):229-233.

**Singh R.** et Das H.R. (1994). Purification of lectins from the stems of peanut plant. *Glyco. J.* 11: 282-285.

**Singh R.S.,** Sharma S., Kaur G. et Bhari R. (2009). Screening of *Penicillium* species for occurrence of lectins and their characterization. *J. Bas. Micro.* 49: 471-476.

**Sitohy M.,** Doheim M. et Badr H. (2007). Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food.Chem.* 104: 971-979.

**Sliva D.** (2003). *Ganoderma lucidum* (reishi) in cancer treatment. *Integ. Can.Ther.* 2(4): 358-364.

**Šnajdrová L.** (2006). Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransférases (Doctoral dissertation, Université Joseph Fourier). 56-58.

**Surya S.** et Haridas M. (2018). A New Galactose-Specific Lectin from *Clerodendrum infortunatum*. *Ira. J. Biot.* 16 (4).

**Sze S.C.W.,** Ho J.C.K. et Liu W.K. (2004). *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *Journal of cellular biochemistry.* 92(6):1193-1202.

## T

**Tanaka H.,** Chiba H., Inokoshi J., Kuno A., Sugai T., Takahashi A., Ito Y., Tsunoda M., Suzuki K., Takénaka A. et Ōmura S. (2009). Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 106(37):5633-5638.

**Tang W.,** Gao Y., Chen G., Gao H., Dai X., Ye J., Chan E., Huang M. et Zhou S. (2005). A randomized, double-blind and placebo-controlled study of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract in neurasthenia. *J. Med. Food.* 8(1): 53-58.

**Tanne A.** et Neyrolles O. (2010). C-type lectins in immune defense against pathogens: the murine DC-SIGN homologue SIGNR3 confers early protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Viru.* 1(4): 285-290.

**Tanya V.N.** et Scott G.R. (1996). Hémagglutination virale des globules rouges de mouton stabilisés par la glutaraldéhyde. *Rev.Elev.Med.Vét.* 47(3) : 283-284.

**Teixeira P.J.,** Carraça E.V., Markland D., Silva M.N. et Ryan R.M. (2012). Exercise, physical activity, and self-determination theory: a systematic review. *Intern. J. Beh. Nutr.p Phys. Act.* 9(1): 1-30.

## V

**Vinary U.G.,** Shivayogeeswar N. et Madappa K. (2011). *Ganoderma lucidum*: A Source for Novel Bioactive Lectin. *Prot.Pep. Lett.* 18(11) : 1150-1157.

## W

**Wachter D.** et Melzer A. (2020). Proposal for a subdivision of the family Psathyrellaceae based on a taxon-rich phylogenetic analysis with iterative multigene guide tree. *Myco.Prog.* 19: 1151-1265.

**Wang H.X.** et Ng T.B. (2004). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Bioch. Bioph. Reas. Comm.* 315: 450-454.

## X

**Xu S.,** Wang L., Wang X.W., Zhao Y.R., Bi W.J., Zhao X.F. et Wang J.X. (2014). L-Type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immu.* 44(2): 397-405.

## Y

**Yin X.,** Feng T., Li Z.H., Leng Y. et Liu J.K. (2014). Five New Guanacastane-Type Diterpenes from Cultures of the Fungus *Psathyrella candolleana*. *Nat. Prod. Bioprospect.* 4: 149-155.

**Yue G.G.L.,** Fung K.P., Tse G.M.K., Leung P.C et Lau C.B.S. (2006). Comparative studies of various ganoderma species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. *J. Alter. Comp. Med.* 12(8): 777-789.

## **Z**

**Zachée P.** Snauwaert J., Vandenberghe P., Hellemans L. et Boogaerts M. (1996). Imaging red blood cells with the atomic force microscope. *Brit.J.Haem.* 95: 472-481.

**Zhao J.K.,** Wang H.X. et Ng T.B. (2009). Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxi.* 53: 360-366.

**Zitouni A.** (2015). Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de Terfèziaboudiéri (Truffe Blanche du Sahara).Thèse de doctorat. Université Frère Mentouri Constantine 1. 32-33.

**Zubcevic N.,** Damir S., Focak M. et Rukavina D. (2016). Effects of plant lectins on human erythrocyte agglutination. *Ser. J. Exp. Clin. Reas.* 17(3): 207-213.

# *Annexe*

### Annexe 01 : Broyage des échantillons en utilisant l'azote liquide.



### Annexe 02 : Tampon PBS (0.1M, pH7.4).

1. Les composants du tampon:

Réactif	Concentration (mM)	Quantité (g)
Sodium Chloride (NaCl)	137	8.006
Sodium hydrogen phosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8	1.42
Potassium Chloride (KCl)	2.7	0.20
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.5	0.20

2. Les solutions de titration :

- HCl
- NaOH

### Annexe 03 : Préparation du NaCl 0.9%.

- **NaCl** : 18g.
- **Eau distillée** : 2 L.

**Annexe 04 : Préparation des solutions des glucides à 400mM.**

Sucre	Quantité (g)	Volume du PBS (ml)
Glucose	0.0792	1
Galactose	0.0720	1
Mannose	0.0720	1
Arabinose	0.060	1
Glucosamine HCl	0.0862	1
Cellobiose	0.1269	1
Lactose	0.1441	1
Maltose	0.1441	1

**Annexe 05 : Chromatographie sur colonne (Sephadex G50).**





<b>Nom et Prénom : Bouhali Soumia</b>		<b>Date de soutenance : 15/09/2021</b>
<b>Nom et Prénom : Amamra Dalal</b>		
<b><u>Titre :</u></b>		
<i>L'extraction des lectines à partir des champignons : Ganoderma lucidum et Candolleomyces candolleanus et leurs caractérisations</i>		
<b>Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master</b>		
<b>Résumé :</b>		
<p>Le but de cette étude est de fournir des informations concises sur les développements récents dans la compréhension des lectines fongiques. Les lectines sont des glycoprotéines qui peuvent être d'origine animale, végétale, bactérienne ou virale. Elles sont capables d'interagir spécifiquement avec divers sucres avec un degré élevé de sélectivité et de former avec eux des liaisons non-covalentes et irréversibles.</p> <p>Un screening a été réalisé sur huit champignons pour mettre en évidence la lectine recherchée. L'extraction a été faite par broyage et macération dans une solution tampon PBS (0.1M, pH 7,4) pendant 24h à 4°C.</p> <p>Parmi les huit champignons testés, on a basé dans notre étude sur deux espèces : <i>Ganoderma lucidum</i> et <i>Candolleomyces candolleanus</i>. Les lectines extraites des deux espèces choisies ont montré une forte activité hémagglutinante contre les érythrocytes du lapin et humaines (les groupes sanguins du système ABO). Le traitement thermique des extraits bruts des deux espèces, à différentes températures pendant 1h, montre que la lectine du <i>Ganoderma lucidum</i> garde son activité agglutinante allant jusqu'à 60°C, cependant celle du <i>candolleomyces candolleanus</i> est thermorésistante car elle a conservé son pouvoir agglutinant pour 1h à 80°C. De plus, l'activité agglutinante des deux lectines fongiques étudiées n'est pas affectée par le pH compris entre 2 et 12. Le cellobiose inhibe l'activité agglutinante de la lectine du <i>Candolleomyces candolleanus</i> mais celle de la lectine du <i>Ganoderma lucidum</i> n'était pas inhibée par les sucres utilisés. La purification partielle des lectines de chaque champignon a été réalisée par chromatographie sur colonne (Séphadex G50), et qui a permis l'obtention d'un pic d'activité et un autre correspond à d'autres protéines pour chacun d'entre eux.</p>		
<b>Mots clés :</b>		
Lectine, glycoprotéine, champignons, <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Candolleomyces candolleanus</i> , activité agglutinante.		
<b>Jury d'évaluation</b>		
<b>Président du jury : BAH I A</b>	MCA	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Rapporteur : Mr NECIB Y</b>	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Examineur : Mme DJEMAI ZOUGHLACHE S</b>	MAA	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Année universitaire</b>		
<b>2020/2021</b>		