



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : *Mycologie et biotechnologie fongique*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Les techniques d'extraction et de purification des lectines bactériennes

---

Présenté par : Ammar Nazzer Roufeyda

Le : 20/06/2024

Jury d'évaluation :

Président : Meziani Meriem (MCA Université Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Boulahrouf Khaled (MCA Université Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s) : Abdelaziz Ouidad (MCB Université Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire  
2023 - 2024

## REMERCIEMENT

*Ce travail est le fruit de la combinaison des efforts de plusieurs personnes.*

*Avant tout, nous remercions Dieu tout-puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage et la persévérance nécessaires, ainsi que les moyens pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadrant, Monsieur Boulahrouf Khaled, Maître de Conférences au département de Microbiologie à l'Université des Frères Mentouri Constantine. Nous lui sommes reconnaissants pour avoir dirigé ce travail, pour sa compréhension, sa disponibilité et sa patience tout au long de notre parcours. Sa générosité scientifique, ses conseils précieux et ses encouragements ont été inestimables pour la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons également à remercier les membres de notre jury de mémoire. Mme Meziani Meriem, maître de conférences au département de Microbiologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Constantine I Frères Mentouri, c'est un réel plaisir pour nous que vous ayez accepté de présider notre jury de mémoire. À l'examinatrice Melle Abdelaziz Ouidad, maître de Conférences à l'Université Constantine I Frères Mentouri, nous sommes fiers que vous ayez accepté d'examiner et de juger notre travail.*

*Nous adressons aussi nos remerciements à tous les enseignants de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et plus précisément à ceux du département de Microbiologie, pour la qualité de leurs enseignements et leurs conseils qui nous ont permis de poursuivre notre parcours académique jusqu'à présent.*

## Dédicace

*(Ammar Nezzar Roufeyda)*

*Je dédie cet humble et modeste travail avec grand amour, sincérité et fierté :*

*À mon pilier de vie, qui m'a appris, soutenu et guidé vers la réussite...  
Mon grand-père Benour.*

*Du fond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers :*

*Premièrement, à la mémoire de ma chère mère Naima, qui a toujours souhaité nous voir réussir. Repose en paix, maman. Tu restes à jamais dans mon cœur.*

*À mon père, Allaoua Ammar Nezzar, ma précieuse bénédiction de Dieu. Aucun mot ne saurait exprimer mon respect et ma gratitude pour votre soutien et vos encouragements.*

*À mes sœurs, Amani et Meriem, et à mon cher frère Bilel, qui n'ont cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de ce mémoire.  
Que Dieu les protège et leur offre la chance et le bonheur.*

*À toutes les personnes de la famille Ammar Nezzar et Bettira.*

*À mes amies : Sara Lehas et Safia Melili.*

*À tous ceux qui me sont chers.*

**MERCI !**

## **Résumé**

Les lectines bactériennes sont des protéines produites par les bactéries, capables de se lier spécifiquement aux sucres présents sur les glycoprotéines, les glycolipides et les polysaccharides. Elles peuvent être classées en différentes familles, telles que les lectines de type C, de type S et de type R, en fonction de leurs caractéristiques. Ces protéines jouent un rôle crucial dans les interactions bactéries-hôtes, notamment dans l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes, la formation de biofilms bactériens et la modulation de la réponse immunitaire. Les lectines bactériennes ont des applications potentielles dans divers domaines ; elles peuvent être utilisées comme outils de diagnostic pour détecter des pathogènes spécifiques. Dans cette étude, nous nous intéressons aux différentes techniques d'extraction des lectines bactériennes, telles que la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. Chaque méthode présente des avantages et des limitations spécifiques, et le choix de la méthode d'extraction dépend des caractéristiques des lectines ciblées et des objectifs de l'étude. Les mécanismes impliqués dans ces processus et les facteurs influençant l'efficacité de l'extraction, tels que la nature de la source de lectines bactériennes, sont également explorés. Enfin, les méthodes d'analyse des lectines bactériennes, comme l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sont discutées.

**Mots clés :** lectines bactériennes, électrophorèse, précipitation avec des sels, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'affinité.

## **Abstract**

Bacterial lectins are proteins produced by bacteria that have the ability to specifically bind to sugars present on glycoproteins, glycolipids, and polysaccharides. They can be classified into different families based on their characteristics, such as C-type, S-type, and R-type lectins. These proteins play a crucial role in bacteria-host interactions, including bacterial adherence to host cells, biofilm formation, and modulation of the immune response. Bacterial lectins have potential applications in various fields; they can be used as diagnostic tools to detect specific pathogens.

In this study, we focus on the different techniques for extracting bacterial lectins, such as salt precipitation, ion-exchange chromatography, affinity chromatography, electrophoresis, ultrafiltration, and ultracentrifugation. Each method has specific advantages and limitations, and the choice of extraction method depends on the characteristics of the targeted lectins and the study's objectives. We also explore the mechanisms involved in these processes and the factors influencing extraction efficiency, such as the nature of the bacterial lectin source. Additionally, we discuss methods for analyzing bacterial lectins, such as polyacrylamide gel electrophoresis.

**Keywords:** bacterial lectins, electrophoresis, , salt precipitation, ion-exchange chromatography, affinity chromatography.

## ملخص

الليكتينات البكتيرية هي بروتينات تنتجها البكتيريا التي لديها القدرة على الارتباط بشكل خاص بالسكريات الموجودة على البروتينات السكرية، والشحميات السكرية، والسكريات. يمكن تصنيفها إلى عائلات مختلفة بناءً على خصائصها، مثل الليكتينات من النوع C ، والنوع S ، والنوع R. تلعب هذه البروتينات دورًا حاسمًا في التفاعلات بين البكتيريا والمضيف، وخاصة في التصاق البكتيريا بالخلايا المضيئة تشكيل الأغشية الحيوية البكتيرية وتعديل الاستجابة المناعية. تحتوي الليكتينات البكتيرية على تطبيقات محتملة في مجالات مختلفة ويمكن استخدامها كأدوات تشخيصية للكشف عن مسببات الأمراض المحددة. في هذه الدراسة، نحن مهتمون بتقنيات استخلاص الليكتينات البكتيرية المختلفة مثل الترسيب بالأملاح، وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني، وكروماتوغرافيا الألفة، والرحلان الكهربائي، والترشيح الفائق، والطرء المركزي الفائق. ولكل طريقة مزايا وقيود محددة، ويعتمد اختيار طريقة الاستخلاص على خصائص المحاضرات المستهدفة وأهداف الدراسة، والآليات المشاركة في هذه العمليات والعوامل المؤثرة على فعالية الاستخلاص مثل طبيعة المحاضرات. مصدر الليكتينات البكتيرية، وطرق تحليل اللكتينات البكتيرية مثل الترحيل الكهربائي للهلام متعدد الأكريلاميد.

**الكلمات المفتاحية:** الليكتينات البكتيرية، الرحلان الكهربائي، الترسيب بالأملاح، كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، كروماتوغرافيا الألفة.

# Sommaire

## Chapitre 1 : les lectines bactériennes

1 .	<b>Les lectines bactériennes</b> .....	01
1.1.	Les lectines solubles.....	03
1.2.	Les toxines.....	04
1.3.	Les adhésines.....	05
2.	<b>Propriétés Biologiques des lectines bactériennes</b> .....	06
2.1.	Spécificité de liaison.....	06
2.2.	Activité agglutinante.....	06
2.3.	Activité mitogène.....	06
2.4.	Rôle dans l'adhérence bactérienne.....	06
2.5.	Rôle dans la formation de biofilms .....	07
2.6 .	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses.....	07
2.7.	Régulation de la virulence.....	07
2.8.	Autres propriétés.....	07
3.	<b>Application des lectines bactériennes</b> .....	07
3.1.	Dans le domaine biomédical.....	08
3.1.1.	Diagnostic des infections bactériennes .....	08
3.1.2.	Étude des glycosylations .....	08
3.1.3.	Recherche biomédicale . .....	08
3.1.4.	Développement de thérapies antimicrobiennes .....	08
3.1.5.	Applications biotechnologiques .....	09
3.2.	Dans le domaine agronomique environnementales.....	09

<b>4.</b>	<b>Les techniques d'extraction des protéines</b>	<b>09</b>
4.1.	Extraction par précipitation avec des sels	10
4.2.	Extraction par chromatographie	10
4.3.	Extraction par ultracentrifugation	11
4.4.	Extraction par électrophorèse	11
4.5.	Extraction par ultrasons	11
4.6.	Extraction par broyage mécanique	11

## **Chapitre 2 :L'extraction des lectines bactériennes**

<b>1.</b>	<b>Historique de l'extraction des lectines bactériennes</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>d'extraction des lectines bactérienne</b>	<b>14</b>
2.1.	Extraction par précipitation avec des sels	14
2.1.1	Préparation de l'extrait bactérien	14
2.1.2.	Ajout de solution salée	14
2.1.3.	Mélange et incubation	14
2.1.4 .	Centrifugation	15
2.1.5	Dissolution de la précipitation	15
2.2.	Extraction par chromatographie d'échange d'ions	15
2.2.1.	Préparation de l'échantillon	16
2.2.2.	Équilibre de la colonne chromatographique	16
2.2.3.	Chargement de l'échantillon	16
2.2.4.	Lavage de la colonne	16
2.2.5.	Élution des lectines	16



2.2.6.	Caractérisation et analyse .....	16
2.3.	Extraction par chromatographie d'affinité .....	17
2.3.1.	Préparation de la matrice d'affinité.....	17
2.3.2.	Chargement de l'échantillon .....	17
2.3.3.	Lavage de la colonne .....	17
2.3.4.	Élution des lectines .....	18
2.3.5.	Caractérisation et analyse .....	18
2.4 .	.Extraction par électrophorèse.....	18
2.4.1.	Préparation de l'échantillon .....	18
2.4.2.	Préparation du gel d'électrophorèse .....	19
2.4.3.	Chargement de l'échantillon .....	19
2.4.4.	Électrophorèse .....	19
2.4.5.	Fixation et visualisation des protéines .....	19
2.4.6.	Caractérisation et analyse .....	19
2.5.	Extraction par ultrafiltration.....	20
2.5.1.	Préparation de l'échantillon .....	20
2.5.2.	Assemblage du système d'ultrafiltration .....	20
2.5.3.	Chargement de l'échantillon .....	20
2.5.4.	Lavage et concentration .....	20
2.5.5.	Élution des lectines.....	21
2.5.6.	Caractérisation et analyse.....	21

2.6	Extraction par ultracentrifugation.....	21
2.6.1.	Préparation de l'échantillon .....	21
2.6.2.	Centrifugation à basse vitesse .....	21
2.6.3.	Ultracentrifugation .....	22
2.6.4.	Récupération des fractions .....	22
2.6.5.	Lavage et purification .....	22
2.6.6.	Caractérisation et analyse .....	22
<b>3.</b>	<b>Comparaison des différentes technique d'extraction des lectines bactériennes .....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>Méthode d'analyse de lectine bactérienne.....</b>	<b>24</b>
4.1.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) .....	25
4.2.	Western blot .....	25
4.3.	Test d'agglutination .....	25
4.4.	Spectrométrie de masse .....	25
4.5	Résonance plasmonique de surface (SPR) .....	25
4.6.	Microscopie à fluorescence .....	25
4.7.	Biocapteurs .....	26

### **Chapitre 3 :Mécanisme d'extraction des lectines bactériennes**

<b>1.</b>	<b>Mécanismes d'extraction des lectines bactériennes.....</b>	<b>28</b>
1.1.	Principes de la précipitation avec des sels .....	28
1.2.	Mécanismes de la chromatographie d'échange d'ions.....	28
1.3.	Mécanismes de la chromatographie d'affinité .....	28

1.4.	Mécanismes de l'électrophorèse .....	28
1.5.	Mécanismes de l'ultrafiltration .....	29
1.6.	Mécanismes de l'ultracentrifugation .....	29
2.	<b>Facteurs influençant l'extraction des lectines bactériennes</b> .....	29
2.1.	Nature de la source de lectines bactériennes .....	29
2.2.	Choix de la technique d'extraction .....	30
2.3.	Condition de l'extraction.....	31
2.4.	Etapas de purification et caractérisation.....	31

## **Chapitre 4 : Perspective et Conclusion**

1.	<b>Perspectives de recherche</b> .....	33
1.1	.Amélioration de technique d'extraction .....	33
1.1.1	Optimisation des conditions d'extraction.....	33
1.1.2.	Utilisation de techniques combinées.....	33
1.1.3.	Développement de nouveaux ligands d'affinité .....	33
1.1.4.	Utilisation de nouvelles technologies .....	33
1.2.	.Développement de nouvelles techniques d'extraction.....	33
1.2.1.	Extraction assistée par enzymes .....	34
1.2.2.	Extraction basée sur des technologies de microfluidique .....	34
1.2.3.	Utilisation de techniques de séparation avancées.....	34
1.3.	.Etude des mécanisme d'interaction entre les lectines bactériennes et leurs substrats.....	34
1.3.1.	Caractérisation des sites de liaison .....	34

1.3.2. Étude de la spécificité de liaison.....	34
1.3.3. détermination des constantes d'affinité .....	35
1.3.4. Exploration des mécanismes de reconnaissance.....	35
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>LES REFERENCES bibliogaphique.....</b>	<b>39</b>

## Liste des Abréviations

**AB** : Les sous unités A et B de toxine bactérienne.

**CV-III**: *Chromobacterium violaceum* lectin II.

**E. coli** : *Escherichia coli*.

**ELISA** : *Enzyme linked immunosorbent assay*.

**mM** : Milli-molaire.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**PAGE** : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).

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

**RS-L** : *Ralstonia solanacearum* lectin

**SPR** : Résonance plasmonique de surface.

**VIH**: Virus immunodéficience humaine.

## Liste des figures

- Figure 1.** Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire ; Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.....02
- Figure 2.** L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-III (Gianluca, 2006) .....04
- Figure 3.** Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli (Lenka, 2006) .....05

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Comparaison des principales techniques d'extraction des lectines bactériennes.....	22
--	----

# ***INTRODUCTION***



## **Introduction**

Les lectines, également appelées agglutinines, ont la capacité d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués (**Liener *et al.*, 1986**). Ce sont des molécules ubiquitaires, présentes dans toutes les classes d'organismes, y compris chez les microorganismes (virus, bactéries, exemple : PA-IL de *Pseudomonas* et toxine du choléra), les plantes, les insectes et les animaux (**Van Damme *et al.*, 1998**).

En particulier, les lectines bactériennes, présentes chez les microorganismes, sont localisées à la surface de la bactérie ou dans le cytosol et jouent un rôle important dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules hôtes (**Sharon, 1996**). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles : les lectines fimbriales (adhésines), les toxines et les autres lectines solubles (**Imberty *et al.*, 2005**).

Les lectines bactériennes ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs propriétés biologiques et de leurs applications potentielles dans divers domaines. Cette étude vise à examiner les différentes techniques d'extraction des lectines bactériennes, notamment la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, l'électrophorèse, etc., ainsi que les mécanismes impliqués dans ces processus et les facteurs influençant l'efficacité de l'extraction.

L'étude des lectines bactériennes et de leurs techniques d'extraction revêt une grande importance scientifique et pratique. Les lectines bactériennes offrent des applications potentielles dans des domaines tels que la recherche biomédicale, la pharmacologie et la biotechnologie. Comprendre les mécanismes d'extraction des lectines et les facteurs influençant leur efficacité permettra d'optimiser les processus d'extraction et de favoriser l'utilisation efficace de ces protéines dans diverses applications.

**L'objectif spécifique de cette étude est de :**

1. Examiner les techniques couramment utilisées pour extraire les lectines bactériennes.
2. Comprendre les mécanismes d'extraction associés à chaque technique.
3. Évaluer les avantages et les inconvénients de chaque méthode.
4. Identifier les facteurs influençant l'efficacité de l'extraction, tels que la source de lectine, la méthode d'extraction et les conditions expérimentales.

Proposer des perspectives de recherche pour améliorer les techniques d'extraction existantes et développer de nouvelles approches

*Chapitre 1 :*  
*Les lectines*  
*bactériennes*

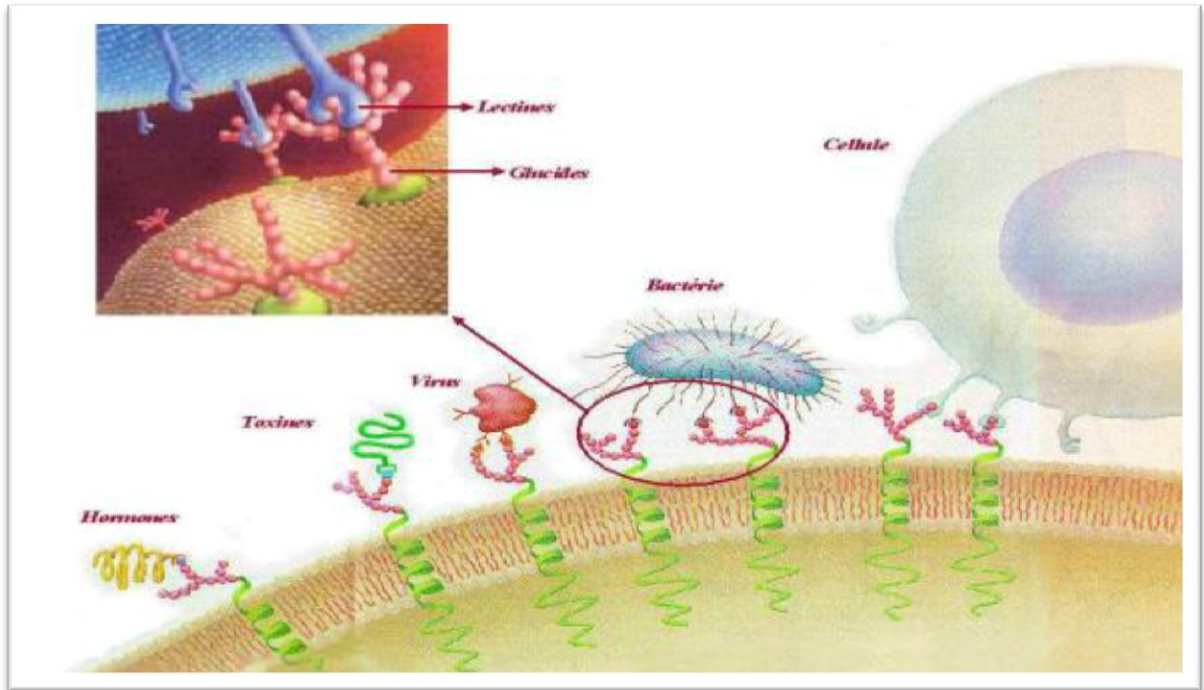
## 1. Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes sont des protéines produites par les bactéries qui ont la capacité de se lier de manière spécifique et réversible aux sucres présents sur les glycoprotéines, les glycolipides et les polysaccharides. Ces interactions lectine-sucres sont importantes dans de nombreux processus biologiques, tels que l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes, la formation de biofilms bactériens et la modulation de la réponse immunitaire.

Les lectines bactériennes présentent une grande diversité en termes de structures et de séquences d'acides aminés. Elles peuvent être classées en différentes familles en fonction de leurs caractéristiques, telles que les lectines de type C, de type S et de type R. Chaque famille de ce dernier a des spécificités de liaison différentes vis-à-vis des sucres cibles.

Ces protéines jouent un rôle fondamental dans les interactions bactéries-hôtes notamment dans la colonisation des tissus, la formation de biofilms et la virulence des pathogènes bactériens. Par exemple, les lectines bactériennes peuvent se fixer aux récepteurs glycosylés des cellules hôtes, ce qui favorise l'adhérence et l'invasion bactérienne.

Les interactions protéine-glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. Le site de liaison d'une lectine est formé par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie que peu après la liaison du ligand. Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone auxquels se lient (**Gabius, et al 1985**). (**Figure 1**) donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.



**Figure 1: Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire ; Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.**

En outre, les lectines bactériennes ont des applications potentielles dans divers domaines. Elles peuvent être utilisées comme outils de diagnostic pour détecter des pathogènes spécifiques, comme agents antimicrobiens pour inhiber la croissance bactérienne et comme vecteurs de ciblage pour délivrer des médicaments ou des nanoparticules à des cellules spécifiques.

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les lectines bactériennes à partir de sources bactériennes, telles que la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. Chaque méthode présente des avantages et des limitations spécifiques, et le choix de la méthode d'extraction dépend des caractéristiques des lectines ciblées et des objectifs de l'étude.

En résumé, les lectines bactériennes sont des protéines spécifiques qui jouent un rôle essentiel dans les interactions bactéries-hôtes et qui présentent des applications potentielles dans différents domaines. L'extraction des lectines bactériennes est une étape cruciale pour étudier leur structure, leurs propriétés et leurs applications.

Les lectines bactériennes se trouvent généralement à la surface des bactéries ou localisées dans le cytosol et jouent un rôle important dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules hôtes au cours des étapes initiales du processus d'infection. (Sharon, 1996). Les lectines bactériennes connues peuvent être divisées en trois familles :

Adhésines, toxines et autres lectines solubles n'appartenant pas aux deux premières classes (Imberty et al., 2005).

### 1.1. Les lectines solubles

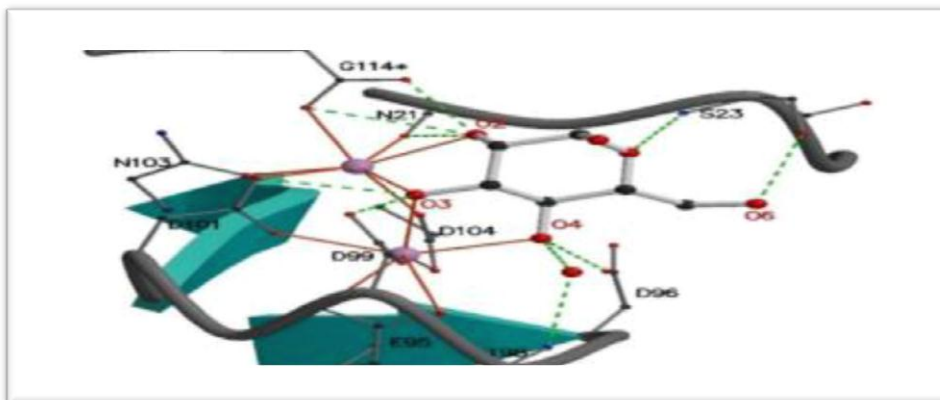
Sont classées dans cette famille de lectines bactériennes toutes les protéines solubles exprimées par des bactéries qui ont une affinité pour les sucres et ne présentent pas d'activité enzymatique. Seules quelques lectines solubles ont été caractérisées, élargissant le domaine de recherche. Deux lectines, comprend des protéines cytoplasmique nommées PA-IL et PA-IIL, sont produites par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* respectivement spécifique pour le a-D-galactose et le a-L-fucose. (Karoline, 2008) ; ces protéines ont une affinité pour les sucres et ne représentent pas d'activité enzymatique (Kostlanova et al.,2005), *Chromobacterium violaceum*, également pathogène humain, produit CV-IIL, une lectine présentant une homologie de séquence élevée avec PA-IIL. RSL est une lectine produite par *Ralstonia solanacearum*, une bactérie qui attaque les racines des plantes. La séquence montre la présence de deux unités peptidiques répétitives et, dans la structure cristalline, trois monomères se rejoignent pour former une structure d'hélice  $\beta$  à six pales. Les RSL sont les seules protéines qui adoptent une structure d'hélice  $\beta$  tertiaire qui résulte de l'oligomérisation des sous-unités plutôt que du repliement de la chaîne (Kostlanova et al.,2005). La cyanovirine-N, produite par la cyanobactérie *Nostoc elliposporum*, est sans doute la lectine bactérienne la plus connue et la plus étudiée, et cette protéine présente une puissante activité antivirale, plus spécifiquement contre le virus du SIDA (VIH) (Boyd et al., 1997). Sa structure tridimensionnelle a été élucidée d'abord par RMN puis par cristallographie, révélant de nouvelles régions de reconnaissance (Bewley, 2001). La cyanovirine-N reconnaît avec une très grande affinité les oligosaccharides mannosylés (oligomannose-8 et -9) de la glycoprotéine formant l'enveloppe virale gp120.

La protéine est représentée par un ruban rouge pour les hélices  $\alpha$  et un ruban jaune les brins  $\beta$ , un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté par de bâton et les cation par des boules.

L'affinité des lectines est généralement plus forte pour certains oligosaccharides ; leur constante de dissociation pour les oligosaccharides est d'ordre micro-molaire (M), par contre pour les monosaccharides elle est de l'ordre milli-molaire (mM) (**Dam et Brewer, 2002**).

Les lectines spécifiques pour les monosaccharides leurs sites de liaison sont des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand ; semblable à l'interaction Enzyme-Substrat (**Gianluca, 2006**), (**Figure 2**).

La lectine interagit de manière forte et directionnelle avec un ligand par un réseau de liaisons hydrogènes, hydrophobes et van der waals, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).



**Figure 2. L-Fucose dans le site de liaison du lectine PA-IIL (Gianluca, 2006).**

## 1.2. Les toxines

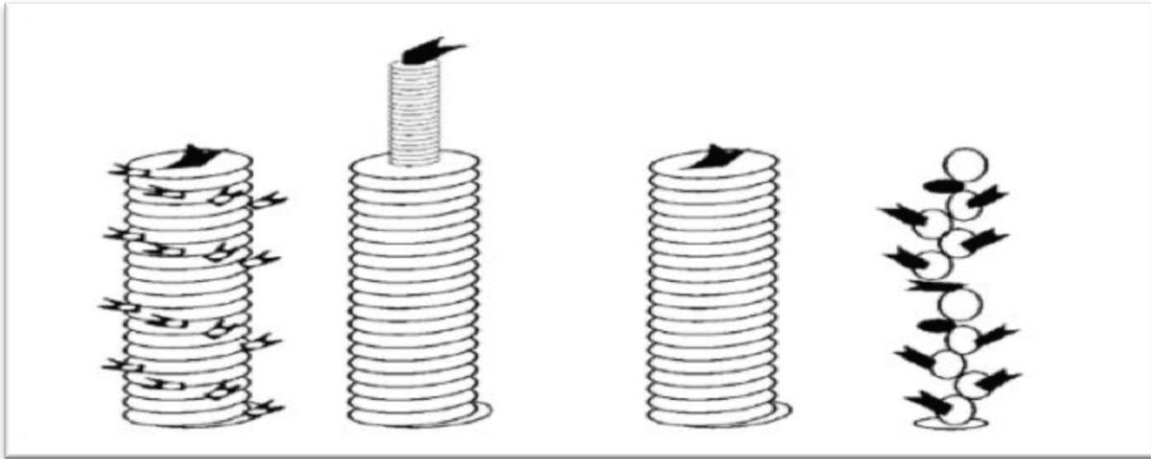
Les toxines sont des protéines sécrétées par des bactéries qui présentent une activité toxique directe dans les cellules cibles. Les dommages cellulaires peuvent résulter de la rupture de la paroi cellulaire, de l'inhibition de la synthèse des protéines ou de l'activation du

métabolisme secondaire. Les toxines AB5 sont sécrétées par divers micro-organismes, notamment *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*Escherichia coli* (ETEC), *Shigella* et *Borderella pertussis*. Ces toxines consistent en une sous-unité A responsable de l'activité enzymatique et une ou plusieurs sous-unités B spécifiquement conçues pour cibler les sialogangliosides de surface cellulaire tels que GM1, GM2 et Gb3 (**Merritt et Hol, 1995**).

### 1.3. Les adhésines

Dans les lectines bactériennes en ce trouvées ce groupe de les assemblage macromoléculaires qui nommées grâce à sa structure. Certaines bactéries, majoritairement Gram-négatives et exceptionnellement Gram-positives, possèdent à leur surface des organites appelés fimbriae ou pili. Les lectines fimbriaes sont trouvées dans des organelles de surface des bactérie (pili et flagelles) qui présentent diverses fonctions telles que la reconnaissance des glycanes de l'hôte et l'adhésion sur les surfaces de cellules cibles. Les pili sont impliqués dans une variété de processus, principalement dans la reconnaissance et l'adhésion aux cellules. Ils sont donc principalement responsables des processus pathogènes pour les eucaryotes. Les pili sont des structures protéiques filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et 100 nm de longueur, la plus grande partie d'un filament fimbriale est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui joue un rôle structurel seulement. Un seul type d'unité possède le site de liaison pour les glucides, donc est responsable de la capacité d'adhésion du pili (**Lenka, 2006**), (**Figure 3**). Trois types de pili sont distingués. Pili de type IV, pili de type P et pili de type I. Bien que de nature différente, l'organisation structurelle des pili est similaire (**Soto et Hultgren, 1999**). La méthode d'installation pour les broches de type I et de type P est la même. Il s'agit de la voie dite chaperon Usher (**Nishiyama et al., 2005 ; Kline et al., 2010**). La partie principale émergeant de la surface bactérienne est une longue structure polymère hélicoïdale rigide composée de nombreux monomères. La pointe du pilus peut contenir une lectine (adhésine) reliée au dernier monomère du pilus par une fraction flexible (monomère adaptateur).





**Figure 3. Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli (Lenka, 2006).**

## **2. Propriétés Biologiques des lectines bactériennes**

Les lectines bactériennes possèdent plusieurs propriétés biologiques caractéristiques qui les rendent uniques, multiples, variés et fonctionnellement importantes. Voici quelques-unes des principales propriétés des lectines bactériennes :

### **2.1. Spécificité de liaison**

Les lectines bactériennes ont une affinité spécifique et propre à chaque lectine pour se lier aux sucres présents sur les glycoprotéines, les glycolipides et les polysaccharides. De sorte que la connaissance du sucre spécifique, tels que les N-acétylglucosamines, les mannoses, les galactoses, les fucoses, etc conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (**Miyoshi et al, 1982**).

### **2.2. Activité agglutinante**

C'est le phénomène le plus visible de la façon dont les lectines bactériennes interagissent avec les cellules. L'activité agglutinante est souvent utilisée comme appareil de diagnostic pour détecter et identifier des bactéries spécifiques.

**2.3. Activité mitogène**

L'une des propriétés les plus étonnantes des lectines bactériennes est leur capacité. Convertit les petits lymphocytes sanguins en cellules blastiques. Cette transformation des cellules lymphoblastoïdes proviennent du pouvoir mitogène des lectines en se liant aux récepteurs spécifiques présents sur les cellules immunitaires et en activant des voies de signalisation intracellulaire, mais généralement pas agit uniquement sur les lymphocytes T (**Barbosa, 2001 ; Falasca 1989 ; Neighbor et al., 1980**).

**2.4. Rôle dans l'adhérence bactérienne**

Les lectines bactériennes jouent un rôle clé dans l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes. Elles se fixent aux récepteurs glycosylés présents sur la surface des cellules hôtes, favorisant ainsi l'attachement et la colonisation bactérienne.

**2.5. Rôle dans la formation de biofilms**

Les lectines bactériennes sont impliquées dans la formation de biofilms, qui sont des communautés de bactéries adhérant à des surfaces et encasées dans une matrice extracellulaire. Les lectines bactériennes facilitent l'adhésion des bactéries entre elles et à la surface, contribuant ainsi à la structure et à la stabilité du biofilm.

**2.6. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses**

Les travaux de (**Valentier et al. 2003**) lectines alimentaires peut inhiber la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses du sein humain qu'est-ce que (**Banwell et al. 1983**) ils ont découvert que les lectines des graines les haricots rouges bloquent la migration des cellules cancéreuses.

**2.7. Régulation de la virulence**

Les lectines bactériennes peuvent jouer un rôle dans la virulence des pathogènes bactériens en modulant l'interaction avec les cellules hôtes et la réponse immunitaire. Elles

peuvent faciliter l'adhérence et l'invasion des cellules hôtes, ainsi que moduler la réponse inflammatoire et la libération de cytokines.

### **2.8. Autres propriétés**

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

## **3. Application des lectines bactériennes**

Les lectines interagissent avec les systèmes biologiques, Diversité des fonctions dans ces organismes. Avoir ces interactions .Ils sont très importants car ils sont impliqués dans le processus. Dans les processus biologiques et pathologiques (Lis et Sharon 1998). Aujourd'hui, les lectines bactériennes sont souvent utilisées comme outils de recherche.

### **3.1. Dans le domaine biomédical**

#### **3.1.1. Diagnostic des infections bactériennes**

Les lectines bactériennes peuvent être utilisées comme outils de diagnostic pour détecter et identifier des pathogènes bactériens spécifiques. En se liant aux sucres présents sur la surface des bactéries, les lectines peuvent être utilisées dans des tests de dépistage pour détecter la présence de bactéries pathogènes dans des échantillons cliniques.

#### **3.1.2. Étude des glycosylations**

Les lectines bactériennes sont utilisées pour étudier les motifs de glycosylation des protéines et des lipides. En se liant aux sucres spécifiques, les lectines bactériennes permettent de caractériser les structures glycosylées, d'identifier les changements dans les motifs de glycosylation associés à des conditions pathologiques et de comprendre les interactions glycosylées impliquées dans divers processus biologiques.

**3.1.3. Recherche biomédicale**

Les lectines bactériennes sont utilisées comme outils de recherche dans les études impliquant des cellules et des tissus. Elles permettent d'étudier les interactions entre les sucres et les protéines, d'analyser les mécanismes d'adhésion cellulaire, de caractériser les récepteurs glycosylés sur les cellules et d'étudier les voies de signalisation impliquées.

**3.1.4. Développement de thérapies antimicrobiennes**

Certains types de lectines bactériennes présentent des activités antimicrobiennes, en se liant aux sucres présents sur les parois cellulaires bactériennes et en perturbant leur intégrité. Ces propriétés peuvent être exploitées dans le développement de nouvelles thérapies antimicrobiennes pour lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

**3.1.5. Applications biotechnologiques**

Les lectines bactériennes peuvent être utilisées dans des applications biotechnologiques telles que la purification de glycoprotéines, la détection et la séparation de cellules spécifiques, et le ciblage de vecteurs de médicaments ou de nanoparticules vers des cellules spécifiques.

**3.2. Dans le domaine agronomique environnementales**

Les lectines bactériennes peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) dans les cultures, ainsi que pour étudier les interactions entre les bactéries et les plantes. Elles peuvent également être utilisées dans des études environnementales pour évaluer la présence de bactéries pathogènes dans les échantillons d'eau et de sol.

**4. Les techniques d'extraction des protéines**

L'extraction des protéines est un processus efficace pour séparer et récupérer les protéines des autres constituants non protéiques dans les produits initiaux pour avoir une mixture homogène et riche en protéines. Pour isoler une certaine protéine dans cette mixture, on applique une méthode dite la purification de protéines. Le but de l'extraction et de la purification des protéines est de simplifier l'étude des propriétés de structure fonctionnalité de certaine protéine et obtenir un produit convenable à l'utilisation dans les systèmes alimentaire.

Avant de s'intéresser en détail à l'étape d'extraction des protéines, il est essentiel de connaître la composition des matières premières. En générale, celles qui contiennent un taux élevé de lipides doivent être dégraissées, soit avant l'extraction des protéines (*Nath et al, 1981 ; Ragab et al, 2004*), soit après cette extraction (*Wang, 1976 ; Sathe, 1982*). L'élimination des lipides avant l'extraction des protéines est préférable parce que la présence des lipides peut provoquer la formation d'une émulsion et donc empêcher l'extraction des protéines. Un autre facteur qui affecte fortement l'extraction des protéines est la présence de composés phénoliques. Ceux-ci peuvent être toxiques, empêcher l'isolement des protéines, ou contribuer à la décoloration et donner un mauvais goût aux ingrédients ; ils peuvent aussi provoquer une diminution de la fonctionnalité des protéines isolées. Par exemple, les acides phénoliques peuvent réduire les interactions entre protéines qui ont un rôle essentiel sur les propriétés émulsifiantes et gélifiantes (*Arntfield, 1996*). Par conséquent, des traitements préliminaires sont en générale nécessaires pour éliminer ces contaminants indésirables avant l'extraction des protéines. Par exemple, les composés phénoliques du tournesol ont été éliminés en utilisant du méthanol à 80%, sans qu'un effet négatif n'ait été observé sur le rendement de récupération et la structure native des protéines (*Gonzalez-Perez, 2002*).

Afin d'extraire les protéines de produits solides ou semi-solides, la première étape consiste à les solubiliser dans un solvant approprié. L'objectif de cette première étape est donc de faire passer sélectivement la fraction protéique d'intérêt en solution et de maintenir les autres constituants en suspension. Le choix du solvant dépend de sa capacité à solubiliser la ou les fractions de protéines ciblées. En revanche, les solvants organiques sont rarement utilisés pour extraire les protéines à cause de leurs effets négatifs sur la structure et les fonctionnalités de celles-ci. L'extraction des protéines peut également être conduite par **hydrolyse enzymatique** ; l'efficacité de cette méthode dépend de l'action des enzymes utilisées (donc de la variété des enzymes : protéolytiques, collagénolytiques ou élastolytiques) qui a pour but de libérer les protéines de leurs matrices et donc d'améliorer leur solubilité sans pour autant provoquer leur dénaturation. Cette méthode a été utilisée pour extraire les protéines de la VSM de dinde (*Fonkwe et Singh, 1996*) et les protéines de poumon de bœuf (*Webster et al, 1982*) : même si le rendement d'extraction est très élevé pour le poumon de bœuf (environ 80%), cette méthode reste assez coûteuse et difficile à contrôler.

Il existe plusieurs techniques d'extraction des protéines, adaptées en fonction des propriétés des protéines ciblées, des échantillons utilisés et des objectifs de l'étude. Voici quelques-unes des techniques couramment utilisées pour l'extraction des protéines :

#### **4.1. Extraction par précipitation avec des sels**

Cette méthode utilise des sels, tels que le chlorure d'ammonium ou le sulfate d'ammonium, pour précipiter les protéines à partir de la solution. Les sels diminuent la solubilité des protéines, favorisant leur agrégation et leur séparation du reste de la solution.

#### **4.2. Extraction par chromatographie**

C'est une technique basée sur la différence d'affinité des protéines pour les matrices stationnaires. Il existe différents types de chromatographie, notamment la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, la chromatographie en phase inverse, etc. Ces méthodes permettent la séparation et l'isolement des protéines en fonction de leurs propriétés spécifiques, telles que la charge, l'hydrophobicité ou l'affinité pour des ligands spécifiques.

#### **4.3. Extraction par ultracentrifugation**

L'ultracentrifugation est une technique utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur taille, de leur forme et de leur densité. Elle utilise des forces centrifuges élevées pour sédimenter les protéines en fonction de leurs propriétés physiques, permettant ainsi leur séparation.

#### **4.4. Extraction par électrophorèse**

L'électrophorèse est une technique qui utilise un champ électrique pour séparer les protéines en fonction de leur charge et de leur taille. Les méthodes couramment utilisées sont l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE), qui permettent la séparation et l'isolement des protéines en fonction de leurs propriétés électrophorétiques.

#### **4.5. Extraction par ultrasons**

L'extraction par ultrasons utilise des ondes ultrasonores pour rompre les liaisons entre les protéines et les autres composants cellulaires. Les ultrasons créent des vibrations et des cavitations dans le milieu, favorisant ainsi la libération des protéines.

#### **4.6. Extraction par broyage mécanique**

Cette méthode consiste à broyer les échantillons contenant les protéines dans un milieu de broyage à l'aide d'instruments tels qu'un mortier et un pilon ou un homogénéisateur. Le broyage mécanique permet de rompre les cellules et d'extraire les protéines de l'échantillon.

**Chapitre 2 :**

**Extraction des**

**lectines bactériennes**



## **1. Historique de l'extraction des lectines bactériennes**

En 1960, les premières études sur les lectines bactériennes ont débuté avec la découverte de la lectine bactérienne d'*Escherichia coli* (*E. coli*) par L.A. Hermodson et ses collègues en 1967. Cette découverte a ouvert la voie à de nouvelles recherches sur les lectines bactériennes et leurs propriétés.

Dans les années 1970, les chercheurs ont continué à isoler et à caractériser différentes lectines bactériennes à partir de diverses espèces bactériennes. Des études ont été menées pour déterminer leurs spécificités de liaison aux sucres, leurs propriétés physicochimiques et leurs activités biologiques.

Au cours des années 1980, de nombreuses méthodes d'extraction et de purification des lectines bactériennes ont été développées et améliorées. Des techniques telles que l'extraction par précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité et l'électrophorèse ont été largement utilisées pour isoler les lectines bactériennes à partir de différentes sources bactériennes.

À partir des années 1990, l'utilisation des lectines bactériennes s'est étendue à divers domaines de recherche et d'application. Des études ont été menées sur les mécanismes d'interaction entre les lectines bactériennes et leurs substrats, ainsi que sur leurs applications potentielles en biotechnologie, en recherche biomédicale, en diagnostic et en développement de thérapies.

Au fil du temps, de nouvelles techniques d'extraction et de purification ont été développées, permettant une isolation plus efficace et une meilleure caractérisation de ces protéines. Les progrès technologiques ont également permis l'utilisation de méthodes plus sophistiquées d'analyse et de caractérisation des lectines bactériennes, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de leurs propriétés et de leurs applications.

## 2. Technique d'extraction des lectines bactériennes

### 2.1. Extraction par précipitation avec des sels

L'extraction par précipitation salinée est une méthode couramment utilisée pour isoler les lectines bactériennes à partir d'extraits bactériens. Cette technique est basée sur le principe selon lequel l'ajout de sels, tels que le chlorure de sodium (NaCl), à une solution protéique peut provoquer la précipitation sélective des protéines solubles, y compris les lectines. Voici les étapes principales de l'extraction par précipitation avec des sels :

#### 2.1.1. Préparation de l'extrait bactérien

Les bactéries sont généralement cultivées en milieu approprié jusqu'à la phase de croissance souhaitée. Ensuite, les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation ou filtration. Les protéines extracellulaires, y compris les lectines, peuvent être libérées des bactéries en utilisant différentes méthodes de lyse, telles que la lyse chimique avec des agents comme le Triton X-100 ou le lysozyme, la lyse mécanique par sonication ou la lyse enzymatique avec des enzymes tels que le lysozyme ou la mutanolysine, en fonction des caractéristiques de la bactérie étudiée (**Pereira et al., 2017**).

#### 2.1.2. Ajout de solution salée

Une solution de chlorure de sodium (NaCl) est ajoutée à l'extrait bactérien. La concentration de NaCl utilisée peut varier en fonction des besoins expérimentaux et des propriétés spécifiques des lectines recherchées. Par exemple, Jermyn et Boyd (1972) ont utilisé une concentration finale de NaCl de 2 M pour précipiter les lectines bactériennes.

#### 2.1.3. Mélange et incubation

La solution bactérienne contenant le NaCl est soigneusement mélangée pour assurer une répartition uniforme du sel dans la solution. L'incubation est généralement effectuée à une température appropriée, souvent à 4 °C, pendant une période donnée. Cette étape permet aux protéines solubles, y compris les lectines, de former des agrégats et de précipiter (**He et al., 2007**).

**2.1.4. Centrifugation**

Après l'incubation, la solution est centrifugée à une vitesse élevée et une durée appropriées pour séparer la précipitation de protéines du surnageant. La centrifugation permet de récupérer la fraction insoluble, qui contient les lectines précipitées. Le précipité est peut être lavé pour éliminer les contaminants. La centrifugation peut être réalisée à basse température pour minimiser la dégradation des protéines (Mohapatra et *al.*, 2021).

**2.1.5. Dissolution de la précipitation**

La précipitation de protéines contenant les lectines est dissoute dans un tampon approprié pour obtenir une solution de lectines purifiées. La composition du tampon dépendra des besoins expérimentaux ultérieurs, tels que l'analyse fonctionnelle ou structurale des lectines. Par exemple, un tampon Tris-HCl à pH neutre peut être utilisé pour dissoudre les lectines précipitées (Tripathi et *al.*, 2012). Des techniques telles que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et des tests d'activité spécifiques aux lectines peuvent être utilisées pour caractériser et analysé le précipité pour évaluer la pureté et l'activité des lectines extraites.

Il est important de noter que les protocoles d'extraction par précipitation salinée peuvent varier en fonction des bactéries étudiées, des objectifs de l'étude et des conditions expérimentales spécifiques.

L'extraction par précipitation avec des sels est une méthode relativement simple et économique pour l'isolement des lectines bactériennes. Cependant, elle peut entraîner la co-précipitation de protéines indésirables et nécessite souvent des étapes supplémentaires de purification et de caractérisation pour obtenir des lectines hautement purifiées. D'autres techniques d'extraction peuvent être utilisées en combinaison avec la précipitation avec des sels pour améliorer la pureté et l'efficacité d'extraction des lectines bactériennes.

**2.2. Extraction par chromatographie d'échange d'ions**

C'est une méthode largement utilisée et efficace. Cette technique repose sur la différence de charge nette des protéines, y compris les lectines, qui permet leur séparation sur une colonne chromatographique en fonction de leurs interactions avec les résines échangeuses d'ions. Voici les étapes principales de l'extraction par chromatographie d'échange d'ions :

**2.2.1. Préparation de l'échantillon**

L'échantillon contenant les lectines bactériennes est préparé en homogénéisant les cellules bactériennes dans un tampon approprié. Le tampon doit être compatible avec la chromatographie d'échange d'ions et peut contenir des sels tampons, des agents réducteurs ou d'autres additifs nécessaires.

**2.2.2. Équilibre de la colonne chromatographique**

Une colonne chromatographique contenant une résine échangeuse d'ions est préparée et équilibrée avec le tampon approprié. La résine peut être chargée positivement (anionique) ou négativement (cationique), selon la charge des lectines bactériennes.

**2.2.3. Chargement de l'échantillon**

L'échantillon est chargé sur la colonne chromatographique. Les protéines, y compris les lectines, s'adsorbent sur la résine en fonction de leurs interactions électrostatiques avec les groupes fonctionnels de la résine.

**2.2.4. Lavage de la colonne**

Après le chargement de l'échantillon, la colonne est lavée avec un tampon approprié pour éliminer les protéines non liées ou faiblement liées. Ce lavage permet de réduire les impuretés et d'obtenir des lectines bactériennes plus pures.

**2.2.5. Éluion des lectines**

Les lectines bactériennes sont ensuite éluées de la colonne chromatographique en modifiant les conditions de l'éluion, telles que la force ionique ou le pH du tampon. Les lectines bactériennes se désorbent de la résine et sont collectées sous forme de fractions contenant les protéines d'intérêt.

**2.2.6. Caractérisation et analyse**

Les fractions contenant les lectines bactériennes sont caractérisées et analysées pour évaluer leur pureté, leur activité et leur spécificité de liaison aux sucres. Des techniques d'analyse telles

que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), les tests d'agglutination ou d'hémagglutination et la spectrométrie de masse peuvent être utilisées.

L'extraction par chromatographie d'échange d'ions permet une séparation efficace des lectines bactériennes en fonction de leurs charges nettes. Elle offre une grande flexibilité en termes de choix de la résine et de conditions d'élution, ce qui permet d'optimiser la séparation et la purification des lectines. Cependant, cette méthode nécessite une instrumentation spécifique et peut être plus coûteuse que d'autres techniques d'extraction.

### **2.3. Extraction par chromatographie d'affinité**

L'extraction des lectines bactériennes par chromatographie d'affinité est une méthode puissante qui exploite l'interaction spécifique entre les lectines et leurs ligands, généralement des sucres ou des glycoconjugués. Cette technique permet une purification hautement sélective des lectines à partir d'extraits bactériens complexes. En suivant les étapes principales de l'extraction par chromatographie d'affinité :

#### **2.3.1. Préparation de la matrice d'affinité**

Une matrice d'affinité est préparée en conjuguant les ligands spécifiques des lectines (sucres ou glycoconjugués) à une matrice support telle que des billes de sépharose ou d'agarose. La matrice est ensuite équilibrée avec un tampon approprié.

#### **2.3.2. Chargement de l'échantillon**

L'échantillon contenant les lectines bactériennes est chargé sur la colonne chromatographique contenant la matrice d'affinité. Les lectines se lient spécifiquement aux ligands immobilisés sur la matrice en raison de leurs interactions de reconnaissance.

#### **2.3.3. Lavage de la colonne**

Après le chargement de l'échantillon, la colonne est lavée pour éliminer les protéines non spécifiques ou faiblement liées. Cela permet de réduire les impuretés et d'obtenir des lectines bactériennes plus pures et spécifiques.

**2.3.4. Élu­tion des lectines**

Les lectines bactériennes sont éluées de la colonne chromatographique en utilisant un tampon spécifique ou une solution compétitive contenant un excès du ligand correspondant. L'élu­tion compétitive rompt l'interaction entre les lectines et les ligands, permettant la récupération spécifique des lectines bactériennes.

**2.3.5. Caractérisation et analyse**

Les fractions contenant les lectines bactériennes sont caractérisées et analysées pour évaluer leur pureté, leur activité et leur spécificité de liaison aux sucres. Des techniques d'analyse telles que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), les tests d'agglutination ou d'hémagglutination et la spectrométrie de masse peuvent être utilisées.

L'extraction par chromatographie d'affinité permet une purification spécifique des lectines bactériennes en exploitant leur affinité sélective pour des ligands spécifiques. Cette méthode offre une haute pureté et une grande spécificité, permettant l'isolement de lectines intactes et actives. Cependant, elle nécessite la disponibilité de ligands spécifiques et peut être plus coûteuse que d'autres techniques d'extraction.

**2.4. .Extraction par électrophorèse**

L'extraction des lectines bactériennes par électrophorèse est une méthode basée sur la séparation des protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un gel. Voici les étapes principales de l'extraction par électrophorèse :

**2.4.1. Préparation de l'échantillon**

L'échantillon contenant les lectines bactériennes est préparé en homogénéisant les cellules bactériennes dans un tampon approprié contenant des agents de solubilisation et de dénaturation des protéines.

**2.4.2. Préparation du gel d'électrophorèse**

Un gel d'électrophorèse est préparé, généralement en utilisant du polyacrylamide pour la séparation des protéines. La concentration du gel est choisie en fonction de la taille des protéines d'intérêt.

**2.4.3. Chargement de l'échantillon**

L'échantillon est chargé dans les puits du gel d'électrophorèse. Une électrode positive (anode) et une électrode négative (cathode) sont placées aux extrémités du gel.

**2.4.4. Électrophorèse**

Un courant électrique est appliqué aux électrodes, ce qui provoque la migration des protéines dans le gel en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les lectines bactériennes se déplacent à des vitesses différentes en fonction de leurs propriétés électrophorétiques.

**2.4.5. Fixation et visualisation des protéines**

Après l'électrophorèse, les protéines sont fixées dans le gel, généralement en utilisant des colorants tels que le Coomassie Brilliant Blue ou l'argent. Les bandes de protéines, y compris les lectines, peuvent être visualisées et excisées du gel pour une analyse ultérieure.

**2.4.6. Caractérisation et analyse**

Les bandes contenant les lectines bactériennes sont caractérisées et analysées pour évaluer leur pureté et leur activité. Des techniques telles que la spectrométrie de masse, l'immunoblotting ou les tests d'agglutination peuvent être utilisées pour identifier et caractériser les lectines extraites.

L'extraction par électrophorèse permet la séparation des protéines, y compris les lectines bactériennes, en fonction de leur mobilité électrophorétique. Cette méthode offre une séparation rapide des protéines, mais elle peut nécessiter des étapes supplémentaires de purification et de caractérisation pour obtenir des lectines hautement purifiées. Elle est souvent utilisée en

combinaison avec d'autres techniques d'extraction et de purification pour une isolation plus poussée des lectines bactériennes.

### **2.5. Extraction par ultrafiltration**

Cette méthode permet de concentrer et de purifier les protéines en fonction de leur taille moléculaire. Voici les étapes principales de l'extraction par ultrafiltration :

#### **2.5.1. Préparation de l'échantillon**

L'échantillon contenant les lectines bactériennes est préparé en homogénéisant les cellules bactériennes dans un tampon approprié pour maintenir la stabilité et l'intégrité des protéines.

#### **2.5.2. Assemblage du système d'ultrafiltration**

Un dispositif d'ultrafiltration est assemblé avec une membrane de filtration appropriée pour retenir les protéines de taille supérieure à celle des lectines. La membrane choisie doit avoir une taille de pores adaptée pour permettre le passage des lectines tout en retenant les molécules de plus grande taille.

#### **2.5.3. Chargement de l'échantillon**

L'échantillon est chargé dans la chambre d'ultrafiltration. Lorsque la pression est appliquée, le tampon et les petites molécules passent à travers la membrane tandis que les lectines bactériennes de taille supérieure sont retenues.

#### **2.5.4. Lavage et concentration**

Le tampon de lavage est ajouté à la chambre d'ultrafiltration pour éliminer les impuretés et les petites molécules non désirées. En continuant à appliquer la pression, les lectines bactériennes sont concentrées à travers la membrane.



**2.5.5. Éluion des lectines**

Une fois les lectines bactériennes concentrées, elles peuvent être éluées de la membrane en utilisant un tampon approprié ou un agent de désorption spécifique. L'éluion permet de récupérer les lectines sous une forme plus concentrée.

**2.5.6. Caractérisation et analyse**

Les lectines bactériennes obtenues par ultrafiltration sont caractérisées et analysées pour évaluer leur pureté, leur activité et leur spécificité de liaison aux sucres. Des techniques d'analyse telles que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), les tests d'agglutination ou d'hémagglutination et la spectrométrie de masse peuvent être utilisées.

L'extraction par ultrafiltration permet la concentration et la purification des lectines bactériennes en fonction de leur taille moléculaire. Cette méthode offre une purification rapide et efficace des protéines, en éliminant les impuretés et en concentrant les lectines dans une plus petite volume. Cependant, elle peut nécessiter l'utilisation de dispositifs spécifiques d'ultrafiltration et une optimisation des conditions de filtration pour obtenir des rendements élevés et des lectines de haute pureté.

**2.6. Extraction par ultracentrifugation**

L'extraction des lectines bactériennes par ultracentrifugation est une méthode basée sur la séparation des composants cellulaires en fonction de leur densité et de leur taille. Voici les étapes principales de l'extraction par ultracentrifugation :

**2.6.1. Préparation de l'échantillon**

L'échantillon contenant les lectines bactériennes est préparé en homogénéisant les cellules bactériennes dans un tampon approprié pour maintenir la stabilité et l'intégrité des protéines.

**2.6.2. Centrifugation à basse vitesse**

L'échantillon est soumis à une première centrifugation à basse vitesse pour éliminer les débris cellulaires, les membranes et les grosses particules. Cela permet d'obtenir une fraction plus claire contenant les protéines solubles, y compris les lectines.

### **2.6.3. Ultracentrifugation**

La fraction obtenue après la centrifugation à basse vitesse est transférée dans des tubes à ultracentrifugation et soumise à une ultracentrifugation à haute vitesse. Cette étape permet de séparer les protéines en fonction de leur densité, les plus lourdes se sédimentant au fond des tubes.

### **2.6.4. Récupération des fractions**

Après l'ultracentrifugation, les fractions contenant les lectines bactériennes sont récupérées en prélevant les couches supérieures du surnageant ou en prélevant les fractions précipitées au fond des tubes, en fonction de la densité des lectines.

### **2.6.5. Lavage et purification**

Les fractions contenant les lectines sont lavées pour éliminer les impuretés et les contaminants indésirables. Des techniques de purification supplémentaires, telles que la précipitation avec des sels ou la chromatographie, peuvent être utilisées pour obtenir des lectines plus pures.

### **2.6.6. Caractérisation et analyse**

Les lectines bactériennes obtenues par ultracentrifugation sont caractérisées et analysées pour évaluer leur pureté, leur activité et leur spécificité de liaison aux sucres. Des techniques d'analyse telles que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), les tests d'agglutination ou d'hémagglutination et la spectrométrie de masse peuvent être utilisées.

Ce type d'extraction permet la séparation des lectines bactériennes en fonction de leur densité et de leur taille. Cette méthode offre une purification relative des protéines, mais elle peut nécessiter des étapes supplémentaires de purification et de caractérisation pour obtenir des lectines hautement purifiées. L'ultracentrifugation est une technique couramment utilisée en

combinaison avec d'autres méthodes d'extraction et de purification pour isoler les lectines bactériennes à partir de diverses sources.

### 3. Comparaison des différentes techniques d'extraction des lectines bactériennes

Voici le Tableau 1 :Comparaison des principales techniques d'extraction des lectines bactériennes ( *boulahrouf khaled , et al 2023*)

comparant les principales techniques d'extraction des lectines bactériennes, évaluant leur efficacité, facilité de mise en œuvre, coût, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

**Tableau 1. Comparaison des principales techniques d'extraction des lectines bactériennes.**

<b>Techniques d'extraction</b>	<b>Avantages :</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Ultracentrifugation</b>	Séparation basée sur la densité et la taille des protéines. rendement élevé. Possibilité d'obtenir des fractions enrichies en lectines.	Nécessite des équipements spécialisés d'ultracentrifugation. nécessite souvent des étapes supplémentaires de purification. faible spécificité de liaison.
<b>Ultrafiltration</b>	Concentration et purification rapides des lectines en fonction de leur taille moléculaire. Rendement élevé. Méthode douce pour les protéines.	Nécessite des dispositifs spécifiques d'ultrafiltration. Optimisation des conditions de filtration requise. Peut nécessiter des étapes supplémentaires de purification.
	Méthode simple et peu	Peut entraîner une contamination par

<b>Précipitation avec des sels</b>	coûteuse. bonne récupération des lectines. adaptée à de grandes quantités d'échantillons.	des sels. des protéines indésirables et des impuretés. faible spécificité de liaison.
<b>Chromatographie Echangeuse d'ions</b>	Bonne séparation des lectines en fonction de leur charge. possibilité d'optimiser les conditions de séparation. Meilleure spécificité de liaison.	Nécessite des colonnes et des résines d'échange d'ions. Peut-être plus coûteuse. temps de séparation plus long.
<b>Chromatographie d'affinité</b>	Grande spécificité de liaison grâce à l'utilisation de ligands spécifiques aux lectines. meilleure pureté des lectines. Méthode plus douce pour les protéines.	Nécessite des ligands d'affinité spécifiques aux lectines. coûts plus élevés. processus de purification plus complexe.
<b>Électrophorèse</b>	Bonne séparation des protéines en fonction de leur taille et de leur charge. Peut être utilisée en combinaison avec d'autres techniques.	Peut nécessiter des équipements spécialisés. temps de séparation plus long. faible rendement pour les lectines de faible abondance.

**Tableau 1 : Comparaison des principales techniques d'extraction des lectines bactériennes ( boulahrouf khaled , *et al* 2023)**

#### 4. Méthode d'analyse de lectine bactérienne

Il existe plusieurs méthodes d'analyse couramment utilisées pour étudier les lectines bactériennes. Ces méthodes permettent de caractériser les propriétés et les interactions des

lectines, d'évaluer leur activité de liaison aux sucres et de déterminer leur structure. Voici quelques-unes des principales méthodes d'analyse des lectines bactériennes :

#### **4.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)**

Cette méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur taille et de leur charge. Elle est souvent utilisée pour évaluer la pureté des lectines et pour analyser les interactions protéine-protéine.

#### **4.2. Western blot**

Le western blot est une technique qui permet de détecter spécifiquement les lectines bactériennes dans un échantillon à l'aide d'anticorps spécifiques. Elle permet de confirmer la présence des lectines et d'évaluer leur expression et leur quantité.

#### **4.3. Test d'agglutination**

Les lectines bactériennes ont la capacité de provoquer l'agglutination (regroupement) des cellules ou des particules qui contiennent des sucres spécifiques. Ce test est utilisé pour évaluer l'activité agglutinante des lectines et pour déterminer leur spécificité de liaison aux sucres.

#### **4.4. Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est utilisée pour déterminer la masse moléculaire des lectines et pour identifier les peptides constitutifs. Elle peut également être utilisée pour étudier les modifications post-traductionnelles des lectines et pour évaluer leur structure tridimensionnelle.

#### **4.5. Résonance plasmonique de surface (SPR)**

La SPR est une technique qui permet d'étudier les interactions entre les lectines bactériennes et leurs ligands (sucres) en temps réel. Elle fournit des informations sur l'affinité, la cinétique de liaison et la spécificité de liaison des lectines.

#### **4.6. Microscopie à fluorescence**

La microscopie à fluorescence est utilisée pour visualiser la localisation et la distribution des lectines bactériennes à l'intérieur des cellules ou sur des surfaces. Elle permet de comprendre leur localisation subcellulaire et leur rôle dans les interactions cellulaires.

#### **4.7. Biocapteurs**

Les biocapteurs basés sur des lectines sont utilisés pour détecter et quantifier spécifiquement la présence de sucres dans des échantillons biologiques. Ces dispositifs permettent de réaliser des dosages sensibles et spécifiques des sucres et de comprendre leur rôle dans les interactions lectine-sucres.

# **Chapitre 3 :**

## **Mécanisme**

### **d'extraction des**

#### **lectines bactériennes**

### **1. Mécanismes d'extraction des lectines bactériennes**

#### **1.1. Principes de la précipitation avec des sels**

La précipitation avec des sels repose sur la solubilité différente des protéines dans différentes conditions de concentration ionique. Les sels, tels que l'ammonium sulfate, sont ajoutés à l'échantillon pour atteindre une concentration critique où les protéines précipitent, tandis que les lectines restent en solution. Ce processus repose sur la séparation des protéines en fonction de leur hydrophobicité et de leur stabilité structurale en présence de concentrations élevées de sels.

#### **1.2. Mécanismes de la chromatographie d'échange d'ions**

La chromatographie d'échange d'ions est basée sur l'interaction entre les charges des protéines et les groupes ioniques immobilisés sur la résine de la colonne. Les protéines, y compris les lectines bactériennes, sont séparées en fonction de leur charge nette. Les protéines chargées de manière opposée à la résine sont retenues et peuvent être éluées en modifiant les conditions de l'éluion, comme le pH ou la force ionique de la solution.

#### **1.3. Mécanismes de la chromatographie d'affinité**

La chromatographie d'affinité utilise des ligands spécifiques immobilisés sur la résine de la colonne pour se lier sélectivement aux lectines bactériennes. Les ligands sont choisis en fonction de leur affinité pour les lectines, généralement des sucres ou des glycanes spécifiques. Les lectines se lient spécifiquement aux ligands d'affinité, tandis que les autres protéines sont éluées. Les lectines peuvent ensuite être récupérées en utilisant une solution compétitive ou en modifiant les conditions de l'éluion.

#### **1.4. Mécanismes de l'électrophorèse**

L'électrophorèse est basée sur le mouvement des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Les lectines bactériennes sont séparées en fonction de leur charge électrique et de leur taille moléculaire en utilisant un gel de polyacrylamide ou un gel d'agarose. Les protéines migrent à travers le gel en fonction de leur charge, leur taille et la force du champ électrique appliqué, ce qui permet de séparer les lectines des autres protéines présentes dans l'échantillon.



## **Chapitre 3 : Mécanisme d'extraction des lectines bactériennes**

---

### **1.5. Mécanismes de l'ultrafiltration**

L'ultrafiltration est basée sur la séparation des protéines en fonction de leur taille moléculaire à travers une membrane semi-perméable. Les lectines bactériennes sont concentrées et purifiées en passant l'échantillon à travers une membrane avec une taille de pore adaptée pour exclure les molécules de taille supérieure, tout en permettant le passage des lectines. Le mécanisme repose sur la différence de taille moléculaire entre les lectines et les autres protéines présentes dans l'échantillon.

### **1.6. Mécanismes de l'ultracentrifugation**

L'ultracentrifugation est basée sur la séparation des particules en fonction de leur densité et de leur taille dans un gradient de densité généré par une centrifugation à grande vitesse. Les lectines bactériennes sont séparées des autres composants de l'échantillon en fonction de leur densité et de leur taille. Les particules plus denses sédimentent plus rapidement vers le fond du tube de centrifugation, tandis que les particules moins denses se trouvent dans les fractions supérieures.

## **2. Facteurs influençant l'extraction des lectines bactériennes**

### **2.1. Nature de la source de lectines bactériennes**

La source de lectines bactériennes, c'est-à-dire l'espèce bactérienne à partir de laquelle les lectines sont extraites, peut avoir une influence sur le rendement et la qualité de l'extraction. Différentes espèces bactériennes peuvent produire des lectines avec des caractéristiques structurales et fonctionnelles variables. Par conséquent, il est important de prendre en compte la nature de la source lors du choix de la technique d'extraction et des conditions expérimentales.

Plusieurs lectines ont été découvertes suite à des tests d'adhésion de diverses bactéries sur différents types de cellules via une interaction avec les glycosides présents sur la surface cellulaire.

Au début des années 1980, les bactéries spécifiques au mannose avaient été identifiées, le principal exemple étant *E. Coli* type 1. Depuis, une très grande variété de bactéries se liant à des glycosides, via des lectines.

## Chapitre 3 : Mécanisme d'extraction des lectines bactériennes

---

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste une grande quantité de produit protéine se liant aux glycosides, incluant les lectines solubles I (PA-IL ou Lec A) et II (PA-IIL ou Lec B). Spécifiques pour la sous-unité galactose et fucose respectivement. Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais dans certaines conditions elles sont aussi présentes sur la surface de la membrane externe de la bactérie .

PA-IL a été la première lectine de *P. aeruginosa* à être isolée par chromatographie d'affinité utilisant une colonne sepharose. Cette protéine est constituée de 121 acides aminés (12.75 kD par monomère) associé en un homotétramère.

Les toxines du type AB5 sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*E.coli* (ETEC), *Shigella dysenteriae* et *Bordetella pertussis*.

*Chromobacterium violaceum* est aussi un pathogène pour les humains et produit une lectine, CV-IIL, ayant une forte homologie de séquence avec PA-IIL.

RSL est une lectine produite par la bactérie *Ralstonia solanacearum*, qui attaque les racines des plantes.

La Cyanovirine-N, produite par le cyanobactérie *Nostoc ellipsosporum* est sans doute la lectine bactérienne la plus connue et mieux étudiée, car cette protéine montre une puissante activité antivirale et plus précisément elle est capable d'inhiber le virus du SIDA (HIV) (Boyd, Gustafson et al. 1997).

### 2.2. Choix de la technique d'extraction

Le choix de la technique d'extraction des lectines bactériennes est important pour obtenir un rendement élevé et une pureté satisfaisante. Différentes techniques d'extraction, telles que la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation, peuvent être utilisées en fonction des caractéristiques des lectines et des objectifs de l'étude. Chaque technique présente des avantages et des limites spécifiques en termes de rendement, de pureté et de facilité d'utilisation.

### **2.3. Condition de l'extraction**

Les conditions expérimentales utilisées lors de l'extraction des lectines bactériennes peuvent avoir un impact significatif sur l'efficacité de l'extraction. Cela comprend des facteurs tels que le pH, la force ionique, la température, le temps d'incubation, le type et la concentration des sels utilisés, ainsi que la méthode d'extraction spécifique. Il est important d'optimiser ces conditions pour maximiser le rendement et la pureté des lectines extraites.

### **2.4. Etapes de purification et caractérisation**

Les étapes de purification et de caractérisation après l'extraction initiale sont également importantes pour obtenir des lectines bactériennes de haute qualité. Cela peut inclure des techniques de purification supplémentaires, telles que la chromatographie par affinité, la filtration sur gel, l'électrophorèse bidimensionnelle, ainsi que des méthodes d'analyse pour évaluer la pureté, l'activité et la structure des lectines extraites. Les étapes de purification et de caractérisation doivent être adaptées aux objectifs de l'étude et aux exigences spécifiques des lectines bactériennes étudiées.

En prenant en compte ces facteurs, il est possible d'optimiser l'extraction des lectines bactériennes afin d'obtenir des rendements élevés, une pureté satisfaisante et des échantillons de lectines de qualité pour des applications ultérieures.

# **Chapitre 4 :**

**Perspectives et**

**Conclusion**

## 1. Perspectives de recherche

Les techniques d'extraction des lectines bactériennes continuent d'évoluer et peuvent bénéficier d'améliorations afin d'optimiser les rendements et la pureté des lectines extraites. Certaines pistes de recherche pour l'amélioration des techniques d'extraction comprennent :

### 1.1. Amélioration des techniques d'extraction

#### 1.1.1. Optimisation des conditions d'extraction :

Explorer différentes conditions expérimentales telles que le pH, la force ionique, la température, le temps d'incubation, et la concentration des réactifs peut améliorer l'efficacité de l'extraction des lectines bactériennes.

#### 1.1.2. Utilisation de techniques combinées :

La combinaison de techniques comme la chromatographie d'affinité avec la chromatographie d'échange d'ions peut augmenter la spécificité de l'extraction des lectines bactériennes.

#### 1.1.3. Développement de nouveaux ligands d'affinité :

Créer des ligands d'affinité spécifiques pour les lectines bactériennes peut améliorer la sélectivité de l'extraction. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour développer de nouveaux ligands ou améliorer ceux existants afin de faciliter cette extraction.

#### 1.1.4. Utilisation de nouvelles technologies :

Explorer des technologies telles que l'extraction assistée par ultrasons, par micro-ondes, par solvant supercritique, ou l'utilisation de nanomatériaux peut améliorer l'efficacité et la rapidité de l'extraction des lectines bactériennes.

### 1.2. Développement de nouvelles techniques d'extraction

En parallèle de l'amélioration des techniques existantes, le développement de nouvelles méthodes d'extraction des lectines bactériennes est également prometteur. Certaines perspectives de recherche incluent :

### **1.2.1. Extraction assistée par enzymes :**

L'utilisation d'enzymes spécifiques peut faciliter une extraction plus sélective des lectines bactériennes en ciblant leurs interactions avec les substrats, préservant ainsi leur intégrité.

### **1.2.2. Extraction basée sur des technologies de microfluidique :**

Les dispositifs de microfluidique permettent un contrôle précis des conditions d'extraction, une rapidité accrue et une faible consommation de réactifs, ce qui pourrait révolutionner l'extraction des lectines bactériennes.

### **1.2.3. Utilisation de techniques de séparation avancées :**

L'application de techniques comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou en phase supercritique (SFC) peut améliorer l'efficacité et la précision de la séparation des lectines bactériennes.

## **1.3. Étude des mécanismes d'interaction entre les lectines bactériennes et leurs substrats**

L'étude approfondie des mécanismes d'interaction entre les lectines bactériennes et leurs substrats est cruciale pour comprendre la spécificité et l'affinité de liaison des lectines. Voici quelques aspects clés de cette étude :

### **1.3.1. Caractérisation des sites de liaison :**

Utilisation de techniques telles que la cristallographie aux rayons X, la spectroscopie RMN et la modélisation moléculaire pour déterminer la structure tridimensionnelle des complexes lectine-substrat et analyser les interactions moléculaires.

### **1.3.2. Étude de la spécificité de liaison :**

Utilisation de substrats variés pour évaluer la spécificité de liaison des lectines bactériennes, avec des approches comme la spectroscopie de fluorescence, l'ITC et la bio-informatique.

**1.3.3. Détermination des constantes d'affinité :**

Mesure précise des constantes d'affinité entre les lectines bactériennes et leurs substrats par des méthodes comme l'ITC, la SPR et la chromatographie d'affinité pour évaluer la force de l'interaction.

**1.3.4. Exploration des mécanismes de reconnaissance :**

Comprendre comment les lectines bactériennes reconnaissent spécifiquement leurs substrats pour concevoir des ligands d'affinité spécifiques et développer de nouvelles stratégies d'extraction et de purification.

Ces perspectives de recherche offrent un cadre complet pour l'amélioration continue des techniques d'extraction des lectines bactériennes, visant à répondre aux défis actuels et à explorer de nouvelles applications potentielles de ces biomolécules importantes.

# **Conclusion**



## Conclusion

---

En conclusion, notre étude des techniques d'extraction des lectines bactériennes a mis en lumière leur importance en tant que protéines spécifiques capables de se lier aux sucres. Nous avons exploré diverses méthodes telles que la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation, chacune offrant des avantages spécifiques pour répondre aux besoins de caractérisation des lectines.

Les techniques d'analyse comme l'ELISA, la chromatographie d'affinité inversée et l'électrophorèse sur gel ont été utilisées pour étudier la spécificité de liaison et l'affinité des lectines extraites, bien que le développement continu de méthodes plus sensibles et spécifiques soit nécessaire pour une caractérisation approfondie.

Comprendre les mécanismes d'extraction et d'interaction des lectines bactériennes est essentiel non seulement pour optimiser les procédures d'extraction, mais aussi pour explorer leur potentiel dans des applications biomédicales, pharmaceutiques et biotechnologiques. Ces protéines jouent un rôle crucial dans la reconnaissance moléculaire et offrent des opportunités de développement de nouveaux outils thérapeutiques et de diagnostic.

Pour l'avenir, il est recommandé de poursuivre la recherche sur l'amélioration des techniques d'extraction afin d'augmenter le rendement et la spécificité des lectines bactériennes. De plus, approfondir notre compréhension des mécanismes d'interaction aidera à concevoir de nouveaux ligands d'affinité et à explorer de nouvelles applications dans la détection des glycanes, la thérapie ciblée et la conception de vaccins.

En somme, l'étude des lectines bactériennes représente une voie prometteuse pour la recherche fondamentale et appliquée. En continuant à explorer leurs propriétés et leurs applications potentielles, nous pourrions exploiter pleinement leur diversité fonctionnelle et contribuer à de nouvelles avancées dans les domaines de la biologie structurale et des interactions protéine-sucres.

# **Références**

# **Bibliographiques**

### Références Bibliographiques

1. Agents and Chemotherapy, 41(7), 1521–30. and biophysical research communication, , 253, 143- 146
2. Architecture and assembly. Journal of Bacteriology, 181(4), 1059–71
3. ASSREURY, A.M.S. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. Mediators of Inflammation, 6, 201-210.
4. BABOSA, T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95(5), 673-678.
5. BANWELL, J.G. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. Gastroenterology, 84, 506-515.
6. Bewley, C. A. (2001). Solution structure of a cyanovirin-N: Man alpha 1-2Man alpha complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120. Structure (London, England : 1993), 9(10), 931-940.
7. Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O’Keefe, B. R., Mori, T., ... Henderson, L. E. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human

## References bibliographiques

---

- immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1521-1530.
8. BOYD, W.C., & SHAPLEIGH, E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.
  9. Boulahrouf Khaled , (2023) . Comparaison des principales techniques d'extraction des lectines bactériennes .
  10. BANWELL J.G. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean : a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenterology* , 84, 506-515
  11. FALASCA, A.I. (1989). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *FEBS Letters*, 246(1-2), 159-162.
  12. GOMES, J.C. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. *Agents Actions*, 41, 132-135.
  13. GREER, F., BREWER, A.C., & PUSZTAI, A. (1985). Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *British Journal of Nutrition*, 54, 95-103.

## References bibliographiques

---

14. GUILLOT, J., GUERRY, M., KONSKA, G., CALDEFIE-CHEZET, F., DE LATOUR, M., & PENAULT-LLORCA, F. (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bulletin du Cancer*, 91, 141-158.
15. HIRABAYASHI, J. (2004). Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconjugate Journal*, 21, 35-40.
16. Imberty, A., Mitchell, E. P., & Wimmerová, M. (2005). Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(5), 525-534.
17. Jaffe, W.G. (1980). Hemagglutinins (Lectins). In *toxic constituents of plant foodstuffs*. New York: Academic Press, 502 p.
18. KENOTH, R., et al. (2001). Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichosanthes cucumerina* seed lectin. *European Journal of Biochemistry*, 268, 5541-5549.
19. Kostlánová, N., Mitchell, E. P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gilboa-Garber, N., ... 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27839-27849.

## References bibliographiques

---

20. KULKARNI, G.V. (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A induced apoptosis in human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 245, 170-178.
21. LIS, H., & SHARON, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98, 637-674.
22. LOPEZ, S. (2003). Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta Medica*, 69(2), 109-112.
23. Merritt, E. A., & Hol, W. G. (1995). AB5 toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(2), 165-171.
24. MURDOCK, L.L., & SHADE, R.E. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6605-6611.
25. MYOSHI, M., et al. (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 28, 255-264.
26. NACHBAR, M.S., & OPPENHEIM, J.D. (1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33, 2238-2345.

## References bibliographiques

---

27. Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., & Capitani, G. (2005). Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *The EMBO Journal*, 24(12), 2075-2086.
28. Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., Capitani, G. of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American*
29. PEUMANS, W.J., & VAN DAMME, J.M. (1995). Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109, 347-352.
30. Sharon, N. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 408, 1-8.
31. Soto, G. E., & Hultgren, S. J. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1059-1071.
32. VALENTINER, U., et al. (2003). The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. *Anticancer Research*, 23(2B), 1197-1206.
33. WANG, H., & NG, T.G. (1998). Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253, 143-146.

**Année universitaire : 2023-2024**

**Présenté par : Ammar Nazzar Roufeyda**

**Les techniques d'extraction et purification des lectines bactérienne**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en *Mycologie et biotechnologie fongique***

**Résumé**

Les lectines bactériennes sont des protéines produites par les bactéries, capables de se lier spécifiquement aux sucres présents sur les glycoprotéines, les glycolipides et les polysaccharides. Elles peuvent être classées en différentes familles, telles que les lectines de type C, de type S et de type R, en fonction de leurs caractéristiques. Ces protéines jouent un rôle crucial dans les interactions bactéries-hôtes, notamment dans l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes, la formation de biofilms bactériens et la modulation de la réponse immunitaire. Les lectines bactériennes ont des applications potentielles dans divers domaines ; elles peuvent être utilisées comme outils de diagnostic pour détecter des pathogènes spécifiques. Dans cette étude, nous nous intéressons aux différentes techniques d'extraction des lectines bactériennes, telles que la précipitation avec des sels, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. Chaque méthode présente des avantages et des limitations spécifiques, et le choix de la méthode d'extraction dépend des caractéristiques des lectines ciblées et des objectifs de l'étude. Les mécanismes impliqués dans ces processus et les facteurs influençant l'efficacité de l'extraction, tels que la nature de la source de lectines bactériennes, sont également explorés. Enfin, les méthodes d'analyse des lectines bactériennes, comme l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sont discutées.

**Mots clés :** lectines bactériennes, électrophorèse, précipitation avec des sels, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'affinité.

**Laboratoires de recherche :** laboratoire de .....(U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Président :** Meziari Meriem (MCA Université Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Boulahrouf Khaled (MCA Université Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur(s) :** Abdelaziz Ouidad (MCB Université Constantine 1 Frères Mentouri).