



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 : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire: قسم

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques / Biotechnologies / Écologie et Environnement

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Extraction et purification d'un lectine du champignon *Agrocybe cylindracea* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire

Présenté par : BOUAFIA Meissa

Le : 09/06/2024

BOUZIDI Zineb

Jury d'évaluation :

Président : KLIBET F. (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : TOUMI M.E.S. (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinatrice : AYECH A. (MAB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr. TOUMI Mohammed Es-seddik, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous exprimons nos estimes et nos remerciements aux membres de mon jury :

La présidente de jury Mme. KLIBET F. de nous faire l'honneur de présider le jury de ma mémoire. Et aussi Mme. AYECHÉ A. pour avoir accepté l'examen de notre travail, et pour conseils motivants.

Nous devons passer mes salutations et remerciements à l'équipe du Laboratoire Génie microbiologique et Applications département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire pour leur honorable collaboration dans la réalisation de cette étude.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour les générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve.

Dédicaces

Cette Mémoire est dédiée à nos chers parents, nos chers frères et sœurs, toute nos familles, nos chers amis et collègues, ainsi qu'à nos chers professeurs et chers lecteurs, qui ont été une source de vie, d'amour, d'affection, de joie, d'ambiance, de bonheur d'espoir et de motivation tout au long de notre parcours.

Liste des abréviations

- AAA** Agrocybe *aegerita* agglutinin
- AAL** Agrocybe *aegerita* lectin
- ABA II** *Agaricus bisporus* agglutinin II
- ABA IV** *Agaricus bisporus* agglutinin IV
- Ac Si** Acide sialique ou l'acide N-acétylneuraminique (NeuA)
- ACG** Agrocybe *cylindracea* galectin
- AMS** Sulfate d'ammonium
- ANOVA** Analysis of variance
- APL** *Auricularia polytricha* lectin
- BSA** Sérum bovin albumine
- BEL** *Boletus edulis* lectin
- CDR** Domaine de reconnaissance saccharidiques
- DEAE-Sephacel** Diethylaminoethyl- Sephacel gel
- FPLC** Fast protein liquid chromatography.
- GFL** *Grifola frondosa* lectin
- GLL** *Ganoderma lucidum* lectin
- CCL** *Cyclocybe cylindracea* lectin
- HA** hémagglutination
- HRL** *Hygrophorus russula* lectin
- LDL** *Lactarius deliciosus* lectin
- MIC** Concentration inhibitrice minimale

Liste des abréviations

MOA *Marasmius oreades* Mannose-recognizing agglutinin

MOL *Marasmius oreades* Mannose-recognizing lectin

PPL *Pleurocybella porrigens* lectin

PSL *Polyporus squamosus* lectin

PSM Mucine de stroma porcine

RBC Globule rouges ou Red blood cells

SAc Activité spécifique (UHA/mg de protéines)

T-Ag Antigène Thomsen-Friedenreich

Tn Tumor-associated carbohydrate antigen

Liste des figures

Figure	Légende	Page
1	Structure tridimensionnelle de la Concavaline A : est une lectine d'origine légumineuse <i>Canavalia ensiformis</i> de structure simple comprend quatre sous unités symétriques, dans chaque monomère, il existe un site CDR spécifique soit pour le mannose ou le glucose, et un site pour la fixation des oligoéléments soit le manganèse et le calcium. (PDB : 1TEI) Moothoo D.N. & Naismith J. H. (1998)	6
2	Structure mosaïque d'une lectine virale H1 : Hémagglutinine du virus A d'influenza, elle contient des nombreux domaines de structure secondaire Alpha et Beta plus des CDR pour le 2-(Acétylamino)-2-Deoxy-a-D-Glucopyranose Et N-Acétyl-D-Glucosamine (PDB: 1RUZ).	6
3	Structure tridimensionnelle d'un lectine de type fimbriaes FimH chez E. coli Uropathogène responsable de l'infection urinaire et spécifique pour le mannose (source PDB: 1t7).	7
4	L'interaction entre le galactose (GAL 4000) et la galectine humaine 'Galectin 1 par des liaisons hydrogènes entre groupements hydroxyles en position 6 du sucre avec les chaînes latérales des acides aminés respectivement : l'asparagine (n) et glutamate (E) en position 61 et 71 (PDB : 1GZW). Le sucre GAL 4000 est représenté par des bâtons épais, les acides aminés par des Dâtons fins, les liaisons hydrogènes par des pointillés bleus.	9
5	L'interaction entre les acides aminés du CDR de lectine de < EcorL, avec le N- acétylgalactosamine A2G [401].Les liaisons H-H ont représenté par des pointillés Bleues, les interactions hydrophobes avec des pointillés grises (source PDB : 3n35).	9
6	L'interaction entre la protéine A liant mannose du rat : <i>Rattus norvegicus</i> lectine de type C et ALPHA-L-METHYL-FUCOSE (Met-Fuc) par des liaisons hydrogènes pointillés bleues et des	10

Liste des figures

	liaisons de coordination ' ioniques' pointillés violètes assurées par le calcium CA) 703 avec les groupements hydroxyle du sucre (source PDB: 1KWW).	
7	Les principaux sucres intervenant dans la glycosylation des protéines et lipides membranaires, la flèche indique le groupement qui permet de former une liaison hydrogène le site de glycoconjugaison) et qu'ils sont détectés par les lectines (Gabijs H. J . et al, 2009).	12
8	Représente le champignon <i>Cyclocybe cylindracea</i> (pholiote du peuplier) source Base de données mycologique (MycoDB) consulté le : 20/04/2024. https://www.mycodb.fr/fiche.php?genreCvelocvbe&espece_vlindracea &numphoto 2& source list&filter _&numfiche 2233 .	21
9	Champignon sauvage <i>Cyclocybe cylindracea</i> collecté (photo personnelle prise en février 2024).	27
10	Test d'HA des érythrocytes fixées, en présence d'un témoin négatif (PBS)	29
11	Les culots protéiques obtenus après la précipitation avec le sulfate d'ammonium.	29
12	Le profil chromatographique de la fraction AMS 80%: a- le spectre d'absorption UV des fractions séparées sur le Sepharose 2B obtenu par l'FPLC ; b- le spectre des fractions éluées par le Galactose 0,4 M, après la mesure des densités optiques.	36
13	Résultats du poids moléculaire de la lectine CCL : a- Electrophorèse SDS-PAGE, les puits 2 jusqu'à 5 représentent la bande obtenue après la dénaturation de la lectine CCL de PM approximative 18 kDa, le puits 1 correspond au marqueur PS-103 ; - Electrophorèse PAGE, le puits 9 représente le marqueur de taille protéique PS-103, les puits 6	37

Liste des figures

	jusqu'à 8 représentent la bande protéique de la lectine CCL de PM> 35 kDa.	
14	Effet de la variation de la température sur le titre d'hémagglutination (UHA).	38
15	Effet de la variation de pH du milieu sur la stabilité de la lectine CCL.	38
16	test d'inhibition de l'activité hémagglutinante par les sucres et les glycoprotéines.	40
17	Variation de pourcentage d'œdème pendant le temps chez les souris traitées par la lectine CCL.	41

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Les rôles physiologiques des lectines.	4
2	Classes de lectines (Imberty A. <i>et al</i> , 2005. Imberty A. <i>et al</i> , 2004).	11
3	Quelques lectines utilisées dans le groupage sanguin (Sharon N. et Lis H. 2003).	14
4	Certaines glycanes liées avec le cancer (Guillot J. <i>et al</i> , 2004).	15
5	Les rôles et fonctions potentielles des lectines dans le cycle de vie des champignons (Konska G., 2006).	10
6	Purification de la lectine à partir <i>Cyclocybe cylindracea</i> .	35
7	Effet de la variation de la température sur le titre d'hémagglutination (UHA).	37
8	Effet de la variation de pH du milieu sur le titre d'hémagglutination (UHA).	38
9	Résultats de test d'inhibition d'HA.	39

Sommaire

Sommaire

Remerciements	<i>i</i>
Dédicaces	<i>ii</i>
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tables et tableaux	
Introduction	1
Revue bibliographique	
Chapitre 1 : Généralités sur Lectines	
1. Les lectines.....	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Rôle physiologique.....	3
2. La biochimie des lectine.....	5
2.1. Structure biochimique des lectines.....	5
2.1.1. Lectine de structure simple.....	5
2.1.2. Lectine de structure mosaïque.....	5
2.1.3. Lectine de structure complexe.....	7
2.2. Site de reconnaissance	7
2.3. Classifications des lectines.....	10
2.4. La spécificité et l'affinité.	12
2.5. Multivalence.....	13

Sommaire

3. Les applications des lectines dans le domaine thérapeutique.....	13
3.1. Agglutination cellulaire et groupage sanguin	14
3.2. Traitement et diagnostic du cancer.....	14

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes

1. L'importance biologique des champignons <i>Cyclocybe cylindracea</i>	16
2. Les rôles physiologiques de lectines dans le cycle de vie des champignons	16
3. Les lectines des basidiomycètes	17
4. Classification des lectines fongique.....	17
4.1. Les lectines fongiques réparties des familles des Galectine, R-Type, Jacalin et Monocot Related	18
4.2. Les lectines type ABL- Like (Fungal Fruiting Bodies.....	18
4.3. La famille des Fuc-lectines AAL-like.....	19
4.4. La famille des <i>Pholiota squarrosa</i> like lectines PhoSL.....	19
5. Les champignons comestibles et médicinales <i>Agrocybes</i>	20
5.1. Description des <i>Agrocybe aegerita</i> (<i>Cyclocybe cylindracea</i>)	21
5.2. Taxonomie	21
5.3. Habitat et distribution géographique	23
5.4. Cycle de vie des champignons	23
6. Propriété nutritionnelles et médicinales des <i>Cyclocybes</i>	24

Matériels et Méthodes

1. Récolte et identification du champignon <i>Cyclocybe cylindracea</i>	27
2. Extraction et purification de la lectine	27
2.1. Extraction de protéines totales	27
2.2. Préparation et fixation des érythrocytes.....	28
2.3. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA)	28
2.4. Purification	29
2.4.1. Précipitation et fractionnement des protéines par salting out.....	29
2.4.2. Dialyse	30
2.4.3. Chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose 2B	30

Sommaire

2.4.4. Lyophilisation	30
3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée.....	31
3.1. Dosage des protéines	31
3.2. Détermination du poids moléculaire	31
3.2.1. Electrophorèse dénaturante SDS-PAGE	31
3.2.2. Conditions natives PAGE.....	32
3.3. Test limite d'HA et dinhibition	32
3.4. Evaluation de la stabilité protéique	33
4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo	33
5. Analyse statistique	34
Résultats	
1. Purification de la lectine.....	35
2. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée.....	36
2.1. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et PAGE.....	36
2.2. Effet de la variation de la température et le pH sur l'activité protéique	37
2.3. Inhibition de l'activité hémagglutinante	39
3. Evaluation d'activité anti-inflammatoire <i>in-vivo</i>	40
Discussion générale	41
Conclusion.....	43
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	
Résumé	

Introduction

Introduction

Introduction

Les protéines sont des biomolécules très connus dans le domaine de la biologie médicale, en raison de leurs interventions dans de multiples voies métaboliques dans les cellules vivantes grâce à leurs structures et fonctions. Une des familles de protéines très connues dans les domaines thérapeutiques et biotechnologiques grâce à leurs propriétés biochimiques et applications potentiels décrite sous le nom « **Lectines** ».

Les lectines sont définies comme des protéines d'origine non immunitaire qui se lient spécifiquement en manière réversible aux sucres sans interactions enzymatiques avec ces substrats. Elles sont très distribuées dans le monde vivant (Lam et Ng, 2011).

Les champignons sauvages comestibles sont depuis longtemps considérés comme faisant partie de l'alimentation humaine en raison de leurs vertus médicinales et nutritionnelles dans de nombreux pays d'Asie et d'Europe depuis l'Antiquité. Les champignons sont considérés comme une riche source de composés biologiquement actifs qui possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, hépatoprotectrices, immunomodulatrices et apoptogènes (Mallick *et al*, 2016 ; Chatterjee *et al*, 2011)

Ils produisent des lectines avec des concentrations importantes, les recherches montrent qu'elles agissent dans de nombreuses réactions biologiques, comme des substances de bio-contrôle d'environnement, la lutte biologique et molécules de transport afin d'assurer la croissance des champignons. Certaines lectines fongiques induisant des activités biologiques intéressantes, tels que : l'inhibition de cellules tumorales, les virus comme l'hépatite virale, virus du SIDA, la régulation de la glycémie et des autres activités (Hassan *et al*, 2015 . Elkhateeb *et al*, 2020 . Jeitler *et al*, 2020).

Les études menées sur la purification des lectines provenant de champignons macroscopiques (basidiomycètes) et l'évaluation de leurs propriétés biologiques ont démontré que ces protéines ont des effets positifs dans le traitement et le diagnostic de certaines pathologies, tels que l'inhibition de la prolifération des tumeurs et des cancers dans le corps humain, ainsi que la lutte contre les virus tels que le VIH et le virus d'influenza (Imberly *et al*, 2005 ; Hassan *et al*, 2015).

En raison de l'absence d'études approfondies sur la flore fongique algérienne et l'utilisation des champignons dans la médecine populaire, ainsi que du régime alimentaire, nous avons la

Introduction

possibilité de sélectionner ce sujet en raison de leur importance pour exploiter notre flore. Cependant, il existe des difficultés concernant les lectines : comment sélectionnent-elles ces cibles membranaires et par quels mécanismes provoquent-elles ces effets biologiques ?

La présente étude a été réalisée sur le champignon comestible sauvage *Cyclocybe cylindracea* de la zone d'Oued Athmania- Mila, où nous avons traités de trois objectifs respectivement :

- Extraction et purification d'une lectine.
- Etude et détermination des caractéristiques biochimiques de cette molécule.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* par la mesure d'inhibition d'œdème induite par une molécule inflammatoire : caraghénane.

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

1. Les lectines

1.1. Définition

Le terme « lectine » a été introduit par Boyd et Shapleigh en 1954, vient du verbe latin «légère», signifiant « choisir » ou « sélectionner » à toutes protéines qui interagissent spécifiquement et réversiblement avec les sucres (mono/oligosaccharides) (Boyd et Shapleigh, 1954).

Selon la définition du généticien Goldstein, les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine non immune et ubiquitaires dans le monde vivant, elles sont connues par leurs interactions spécifiques et réversibles aux sucres portés dans la membrane cellulaire et avec les glycoconjugués, sans induire une modification catalytique sur leurs ligands, ce qui conduisant ensuite vers l'activation ou la désactivation ainsi une de plusieurs processus biologiques (Lis et Sharon, 1998).

Les lectines ont le pouvoir de créer plusieurs liaisons avec leurs ligands exposés dans la membrane cellulaire, ce qui aboutit au phénomène d'agglutination cellulaires et à la précipitation des glycoconjugués. Elles sont aussi nommées agglutinines à cause de ce phénomène, qu'elle est la clé de leur détection dans les extraits protéiques, en utilisant un test d'agglutination des globules rouges en fonction de la spécificité du sucre (Iam et Ng. 2011).

1.2. Rôles physiologiques

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, elles possèdent des propriétés communes telles que : la reconnaissance spécifique et la liaison aux glucides libres ou liés avec des protéines ou lipides dans la membrane cellulaire (tableau 1).

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

Tableau 1 : Les rôles physiologiques des lectines.

Lectines		Rôle	Références
végétales		<ul style="list-style-type: none"> - Inhibent la sporulation et la croissance de certains champignons par exemple : l'action de <i>Wheat Germ</i> agglutinin (WGA lectine du blé). -La reconnaissance des certaines bactéries symbiotiques comme la rhizobia qui fixe le nitrogène dans le sol. -Un effet hemagglutinante d'une part et d'une autre part à l'effet toxique comme la ricine, l'abrine. -Un rôle primordial dans les réactions de défense contre les agents phytopathogènes. 	<p>(Sharon <i>et</i> Lis, 2004). (Sharon N. 1993).</p>
Microbiennes	Virales	-Les virus exposent des lectines au niveau de leur surface pour interagir et l'agresser la cellule hôte.	(Varki <i>et al</i> , 2009).
	Bactéries	- Les adhésines jouant un rôle dans l'adhésion avec les cellules hôtes et la colonisation, aussi les toxines bactériennes sont un type des lectines ; qu'elle initie ensuite les processus d'infection dans le cas d'une bactérie pathogène.	
animales	Galectines Fuc-lectines Siglectines Selectines	<ul style="list-style-type: none"> - La reconnaissance intercellulaire - La stimulation de la mitogénèse - L'homéostasie de l'immunité adaptative. 	

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

2. La biochimie des lectines

La biochimie structurale des lectines montre qu'elles contiennent un ou deux domaines peptidiques portant le site de reconnaissance et d'interaction spécifique avec les mono ou oligosaccharides. Il s'appelle domaine de reconnaissance saccharidique (CDR). Il peut lire l'information codée par les sucres (libres ou liées aux lipides ou protéines cytoplasmiques et membranaires) (Hans *et al*, 2011. André *et al*, 2015).

L'interaction s'effectue entre les résidus d'acides aminés situés sur la chaîne peptidique du CDR et sa spécificité dépend de l'affinité saccharidique et du type de la liaison. Les études structurales des lectines ont montré qu'elles ne possèdent pas une similitude structurale primaire, à cause de l'évolution de leurs gènes (Gorelik *et al*, 2001).

2.1. Structure biochimique des lectines

Leurs structures biochimiques sont généralement différentes en fonction de la polymérisation et du repliement de la chaîne polypeptidique. D'après Sharon et Lis (1998), les lectines peuvent être classées en trois catégories structurales.

2.1.1. Lectines de structure simple :

Possèdent une configuration spatiale formé de plusieurs sous unités, de PM inférieur à 40 KDa et ne sont pas totalement identiques. Les sous unités contiennent un site pour fixation d'un ou deux oligoéléments métalliques qui joue un rôle essentiel dans l'adaptation de la conformation pour mise en liaison avec le sucre (figure 1).

Elles regroupent les lectines végétales (chez légumineuses plus fréquemment), les lectines bactériennes, certaines galectines ou les lectines animales ayant une spécificité au Gal.

2.1.2. Lectines de structure mosaïque

Elles constituent des domaines structuraux d'hélices α et de feuillets β , comporte un seul CDR est présent dans l'un de ces domaines (figure 2). Elles rassemblent différentes agglutinines : les hémagglutinines virales et les lectines animales de type : lectines dépendantes du calcium (type C), lectines liant le manose-6-phosphate (type P), lectines semblables à l'immunoglobuline (Ig-like-lectins).

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

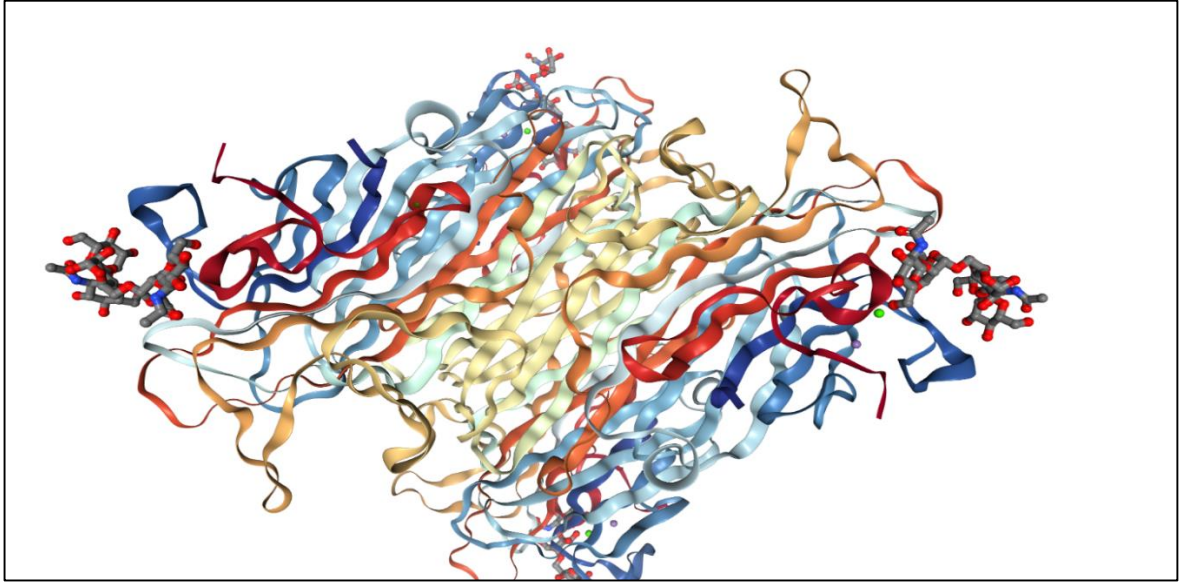


Figure 1. Structure tridimensionnelle de la Concavaline A : est une lectine d'origine légumineuse *Canavalia ensiformis* de structure simple comprend quatre sous unités symétriques, dans chaque monomère, il existe un site CDR spécifique soit pour le mannose ou le glucose, et un site pour la fixation des oligoéléments soit le manganèse et le calcium. (Source PDB : 1TEI).

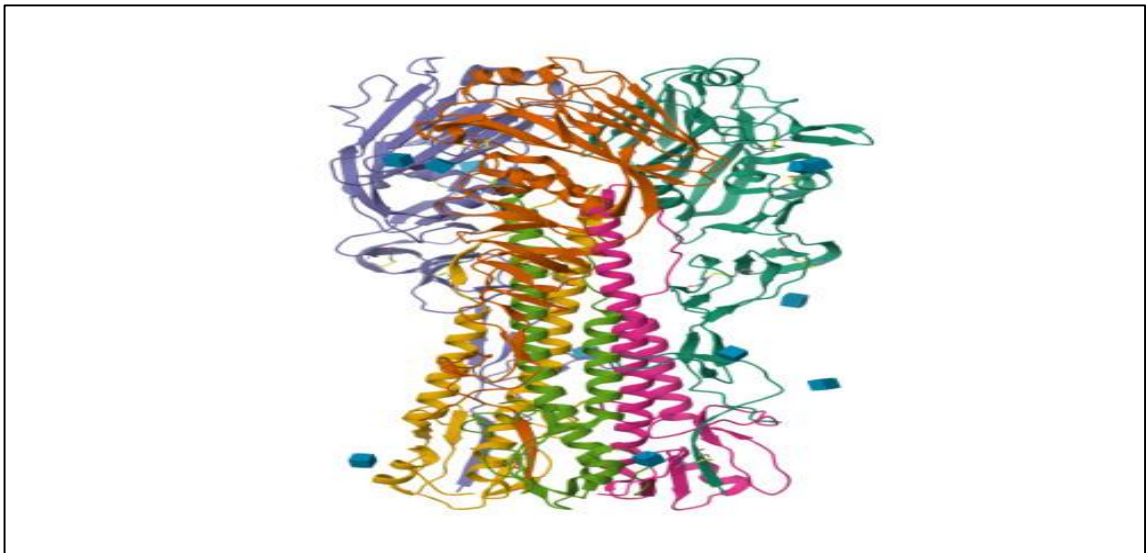


Figure 2. Structure mosaïque d'une lectine virale H1 : Hémagglutinine du virus A d'influenza, elle contient des nombreux domaines de structure secondaire Alpha et Beta plus des CDR pour le 2-(Acétylamino)-2-Deoxy- α -D-Glucopyranose Et N-Acetyl-D-Glucosamine(source PDB : 1RUZ).

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

2.1.3. Lectines de structure complexe

Résultantes de l'assemblage moléculaire et la condensation des chaînes polypeptidiques qui sont présentées fréquemment chez les bactéries au niveau de la paroi, et elles reforment des structures filamenteuses de diamètre 3-7 nm et jusqu'à 100 nm de longueur.

Elles se sont appelées les fimbriaes ou Pili et jouent un rôle structurale, possèdent une sous unités contenant d'un seul site de liaison pour les glucides(CDR).

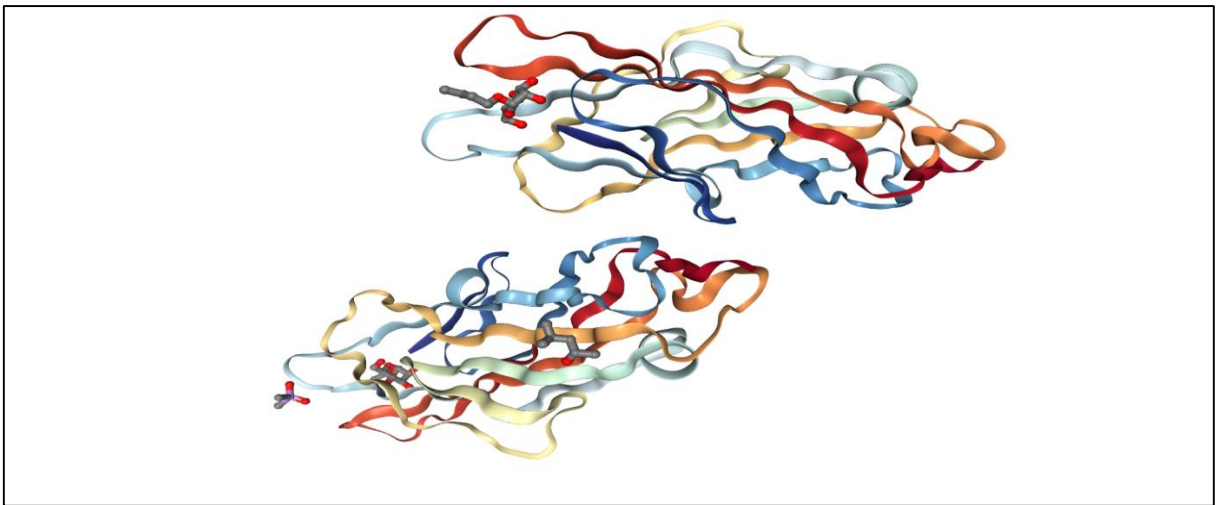


Figure 3. Structure tridimensionnelle d'un lectine de type fimbriaes FimH chez *E. coli* uropathogène responsable de l'infection urinaire et spécifique pour le mannose (source PDB : 1tr7).

2.2. Site de reconnaissance

Les aa du CDR permettent de reconnaître et d'interagir avec les lectines, ce qui se traduit par un creux ou une dépression à la surface de la protéine, contrairement à celles qui sont propres aux oligosaccharides. Le fait que ce domaine soit présent à l'intérieur entraîne une forte complémentarité avec le ligand (Sharon et Lis, 1993).

Ces aa peuvent attachés soit avec une ou deux extrémités du sucre, la conformation du CDR ne change que légèrement après l'interaction. Les sites d'une même famille de lectine sont similaires, mais ils se différent dans les différentes familles, même si la spécificité est la même, l'interaction est maintenue par des liaisons chimiques comme chez les autres interactions protéines-ligands.

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

La stabilité de l'interaction est garantie par les liaisons hydrogènes H, qui jouent un rôle crucial dans l'octroi de la spécificité d'interaction et l'accroissement de l'affinité. Ces interactions se déroulent entre les chaînes latérales des résidus chargés tels que l'acide aspartique D, l'acide glutamique E, l'asparagine N et la glutamine Q, en interaction avec les groupements hydroxyles des sucres, comme c'est le cas des Galectines (Galec) (figure 4).

Parfois, les liaisons hydrogènes sont formées par les groupements hydroxyles des chaînes latérales des autres résidus (aa alcools) et par les groupements NH et CO de la chaîne principale de la protéine. Le groupe OH du sucre joue le rôle d'un donneur ou d'un récepteur de proton (H). En ce qui concerne un donneur d'hydrogène, l'OH a l'avantage de rotation libre sur l'axe C-OH, ce qui permet de former une liaison linéaire avec l'accepteur. Ceci augmente la spécificité lorsque deux groupements OH proches du sucre interagissent avec des atomes du même résidu, tels que les deux atomes oxygènes du carboxyle d'Ac aspartique ou d'Ac glutamique.

Dans le complexe lectine-sucre, les forces de Van Der Waals jouent également un rôle, et l'interaction par l'hydrophobicité (stacking interaction) est causée par la position particulière des groupements OH des sucres (molécules de forte polarité créant des zones hydrophobes), ce qui permet d'interagir avec les aa aromatiques. Cette interaction est particulièrement observée chez les lectines des légumineuses, les Galec et certaines lectines de type C (Sharon N. *et* Lis H. 1993).

Lors de l'interaction avec le Gal de la lectine «EcorL» de l'*Erythrina corallodendron*, les liaisons H entre les groupements OH avec D89, A218 et N133 permettent cela. La tyrosine Y108 et le tryptophane W135 forment des interactions hydrophobes (fig. 5).

On observe également une stabilité de l'interaction grâce aux ions cationiques, tels que les lectines de type C (figure 6) qui possèdent un site de fixation du Ca qui joue un rôle direct dans la liaison de coordination avec les groupements hydroxyles OH en position 3 et 4 du Man ou 2 et 3 chez le fucose (Fuc).

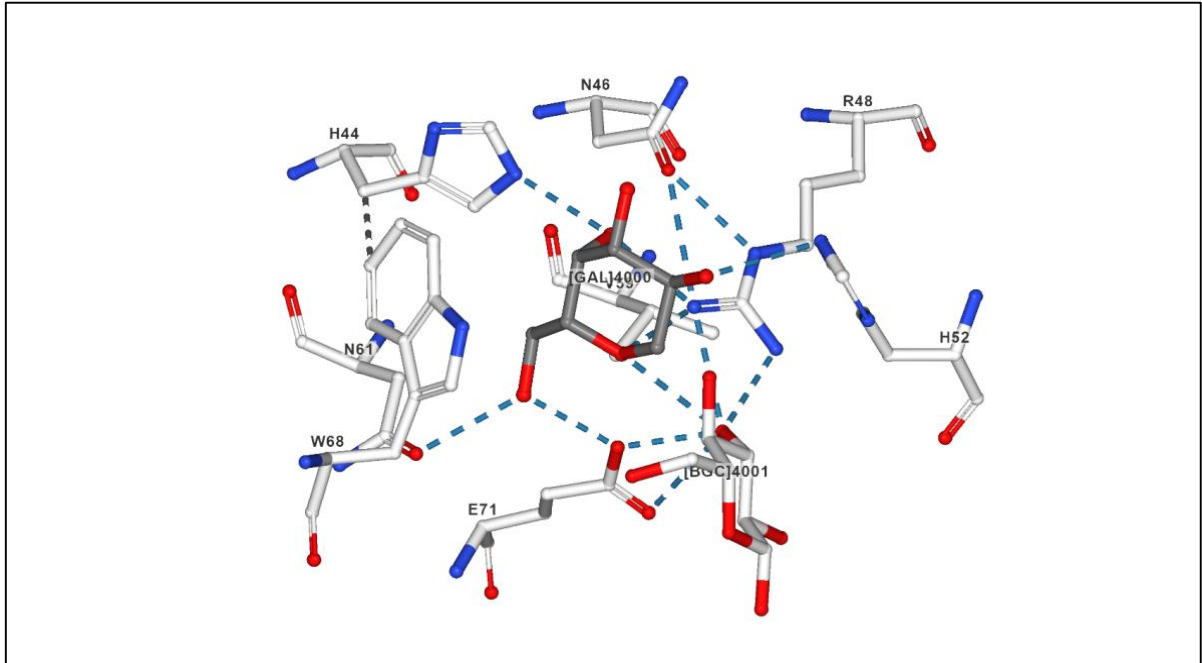


Figure 4. L'interaction entre le galactose (GAL 4000) et la galectine humaine 'Galectin 1' par des liaisons hydrogènes entre groupements hydroxyles en position 6 du sucre avec les chaînes latérales des acides aminés respectivement : l'asparagine (N) et glutamate (E) en position 61 et 71. Le sucre GAL 4000 est représenté par des bâtons épais, les acides aminés par des bâtons fins, les liaisons hydrogènes par des pointillés bleus, (source PDB : 1GZW).

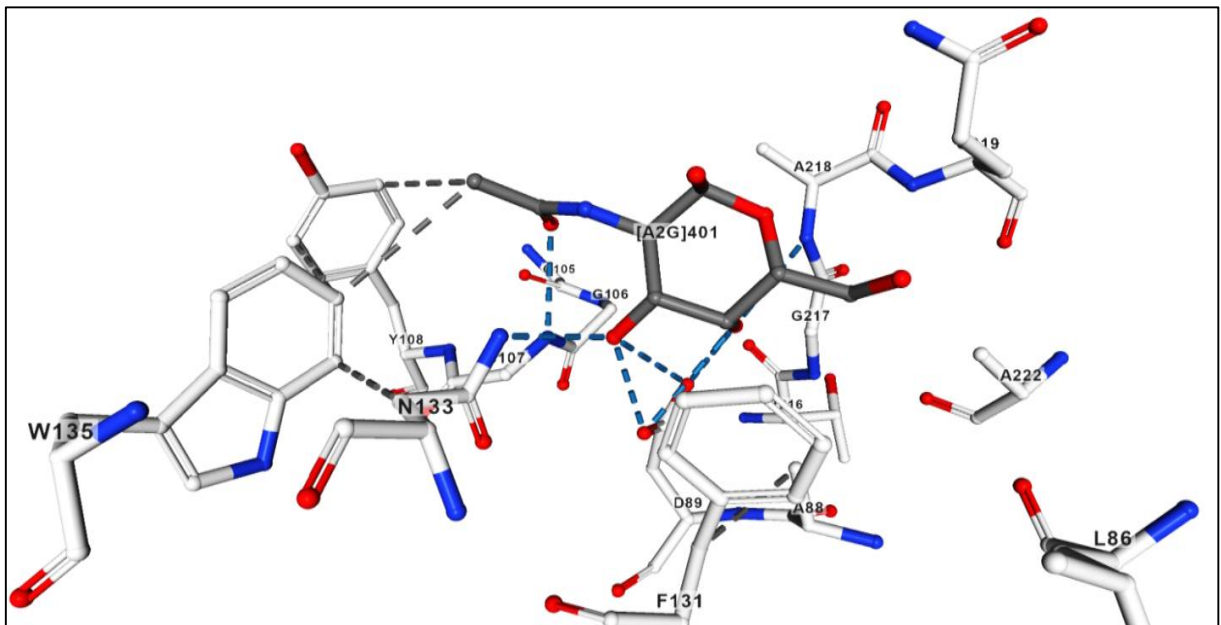


Figure 5. L'interaction entre les acides aminés du CDR de lectine de « EcorL » avec le N-acétylgalactosamine A2G [401]. Les liaisons H-H ont représenté par des pointillés Bleues, les interactions hydrophobes avec des pointillés grises (source PDB : 3n35).

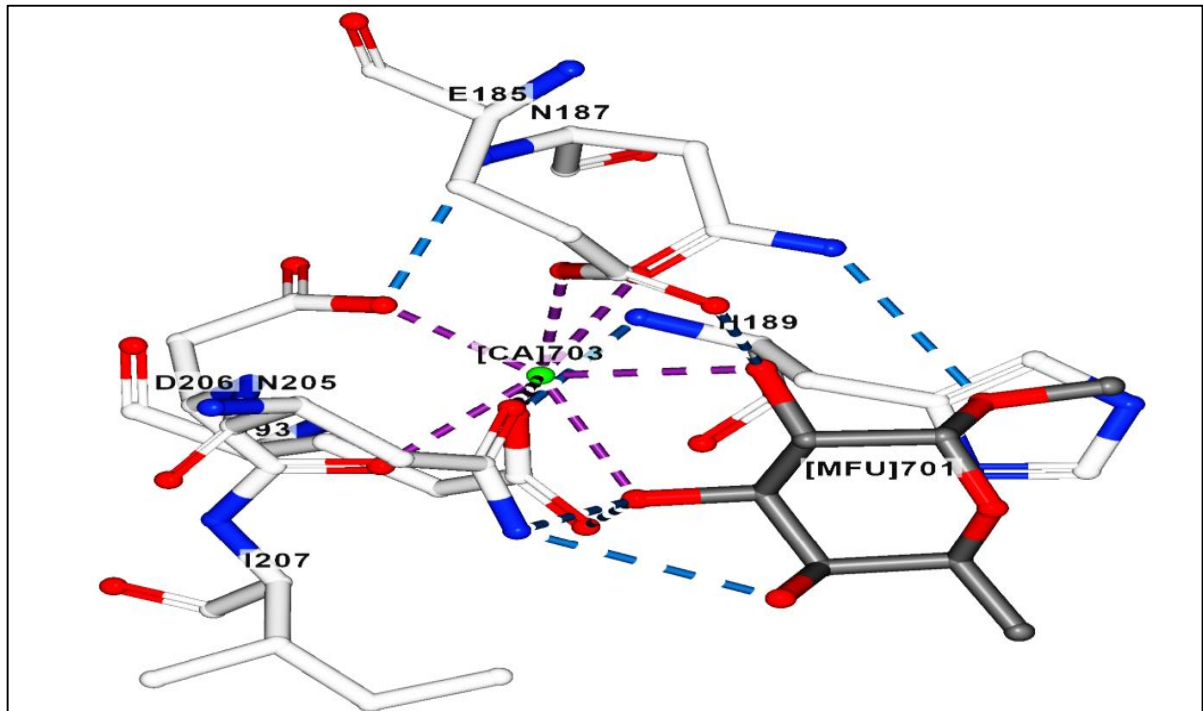


Figure 6. L'interaction entre la protéine A liant mannose du rat : *Rattus norvegicus* lectine de type C et ALPHA-L-METHYL-FUCOSE (Met-Fuc) par des liaisons hydrogènes pointillés bleues et des liaisons de coordination 'ioniques' pointillés violets assurées par le calcium (CA) 703 avec les groupements hydroxyle du sucre (source PDB : 1KWW).

2.3. Classification des lectines

Actuellement, deux grandes classifications ont été proposées selon deux critères : la structure tridimensionnelle, la spécificité et l'affinité pour les glucides. Généralement les lectines ont divisés en plusieurs types selon leur source biologique, la structure et la spécificité biochimique (tableau 2).

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

Tableau 2 : Classes de lectines (Imberty A. *et al*, 2005 .2004).

Lectines	Catégories	Caractérisations
Végétales	Merolectines	<ul style="list-style-type: none"> - Protéine à un seul domaine de reconnaissance et liaison pour des sucres CDR - Elles sont monovalent n'induisent pas une agglutination - Une seule chaine polypeptidique - Petite taille
	Hololectines (majoritaires)	<ul style="list-style-type: none"> - Elle à deux ou plusieurs CDR identique ou homologue - Capacité d'agglutiné les cellules de combiner et de précipiter avec les glycoconjugués.
	Chimérolectines	<ul style="list-style-type: none"> - Elles sont des protéines de fusion composées d'une chaine peptidique combine avec les glycanes et une chaine peptidique à une activité catalytique.
Animales		<ul style="list-style-type: none"> - Drickamer et Taylor 1993 classent les lectines animales en fonction de deux critères « la séquence consensus (motif) de CDR, la dépendance de la liaison avec les cations pour assurer l'interaction aux sucres.
Bactériennes	Adhésines	<ul style="list-style-type: none"> - Les bactéries expriment des agglutinines dans leurs parois pour assurer la reconnaissance et l'adhésion avec les cellules supérieures (Esko J. D. & Sharon N. 2009).
	Toxines	<ul style="list-style-type: none"> - Ces types de lectines possèdent une activité toxique provoquant l'endommagement dans leur cible par le blocage de la machinerie métabolique. (Merritt E.A. <i>et al</i>,1995).
	Solubles	<ul style="list-style-type: none"> - Elles regroupent les protéines solubles ayant une affinité pour les sucres et n'exercent pas une activité enzymatique, parmi les, la PA-IL et PA-IIL produites par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

2.4. La spécificité et l'affinité

Elle repose sur l'interaction Ag-Ac en raison de la localisation de ces sucres sur les épitopes des récepteurs membranaires des cellules. Bien que les lectines interagissent principalement avec les monosaccharides, elles ont une affinité plus faible pour eux par rapport aux oligosaccharides. Cela est dû à la présence d'une concentration élevée de ces sucres dans les chaînes oligosaccharidiques ou polysaccharidiques, où la constante d'association K_a pour les monosaccharides est d'environ millimolaire (mM), tandis que pour les oligosaccharides, elle est de micromolaire (μM).

Les chercheurs Sharon et Lis. (1998) les répartissent en cinq groupes en fonction de leur affinité pour les monosaccharides pour lesquels la lectine présente une grande spécificité et affinité : Man, GlcNAc, Gal/GalNAc, le Fuc, ainsi que l'acide sialique (Ac sial).

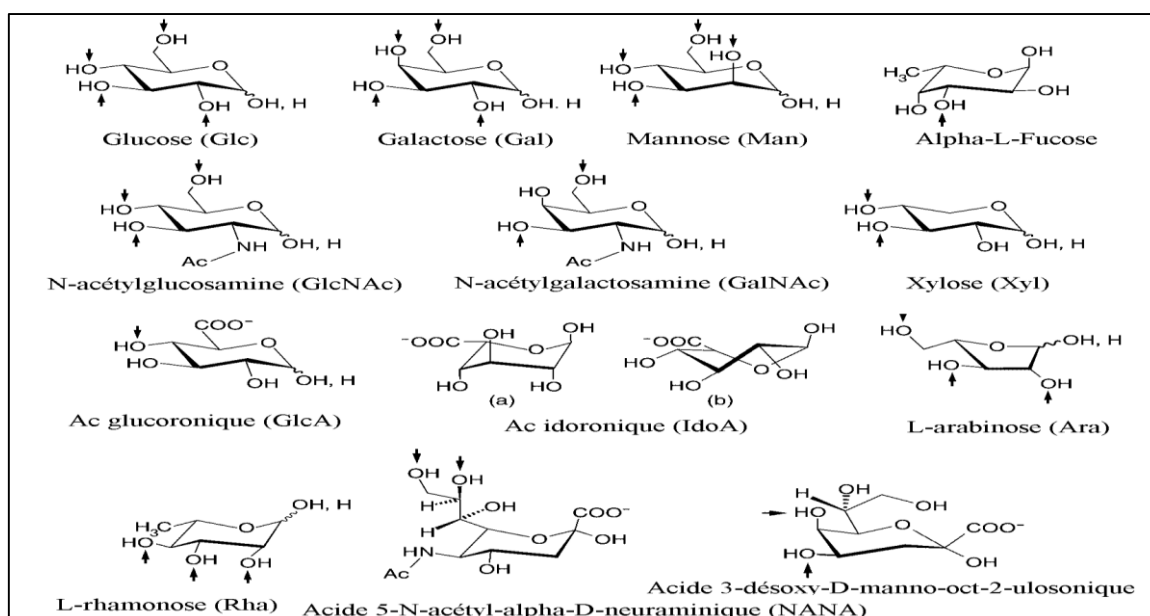


Figure 7 : Les principaux sucres intervenant dans la glycosylation des protéines et lipides membranaires, la flèche indique le groupement qui permet de former une liaison hydrogène (le site de glycoconjugaison) et qu'ils sont détectés par les lectines (Gabijs *et al*, 2009).

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

2.5. Multivalence

Les lectines sont perçues comme des protéines polyvalentes compte tenu de leurs structures biochimiques (la présence de différentes CDR). Bien qu'un monomère (ou un dimère ou un trimère) puisse s'ancrer avec un monosaccharide avec une faible affinité, la présence de plusieurs CDR pour le même ligand est essentielle pour renforcer l'interaction. D'après Van Kooyk Y. et Rabinovich G.A. (2008), la multivalence peut résulter de la répétition en tandem du CDR dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de l'exposition de plusieurs lectines à la membrane cellulaire. Il est courant que les systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multiples plutôt qu'une seule interaction forte. Selon Lee et Lee, 1995, les surfaces cellulaires peuvent également assurer une grande spécificité et affinité entre ces récepteurs.

3. Les applications des lectines dans le domaine thérapeutique

Les lectines sont utilisées dans de nombreux domaines thérapeutiques intéressants : greffage de la moelle osseuse, diagnostic médical de la glycémie, traitement antiviral (VIH et Influenza H2 N1), en nutrition (anti-obésité pour la lectine de *Pleurotus ostreatus*) (Kawagishi *et al*, 2000 ; Necib *et al*, 2014).

3.1. L'agglutination cellulaire et groupage sanguin

Grace à la présence de deux ou plusieurs CDR, une lectine interagit particulièrement avec les cellules sanguines par l'intermédiaire de ligands membranaires, ce qui provoque leur agglutination et leur précipitation. C'est une méthode de détection des lectines à partir des hématies des animaux et de leur détermination par l'inhibition d'HA par les sucres. Sa détermination est influencée par la structure, le nombre de CDR et la taille moléculaire (Sharon *et Lis*, 1998 ; Santos *et al*, 2015).

Les antigènes dans le groupage sanguin (système ABO ou ABH) sont des sucres (tableau 1) ou des protéines liées aux différentes parties de la membrane érythrocytaire, qui sont différenciés par des résidus saccharidiques terminaux spécifiques de la chaîne commune d'oligosaccharides. Grâce à la spécificité saccharidique des lectines, il sera possible et simple de réaliser une typologie du système ABO, ce qui permettra également de déterminer d'autres types cellulaires et de faire la taxonomie de certains microorganismes.

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

Tableau 3 : Quelques lectines utilisées dans le groupage sanguin (Sharon et Lis, 2003).

Lectine	Affinité	Spécificité	Espèces
LBL	GalNAc, α -D-GalNAc-(1→3), (α -L-Fuc-[1→2])-D-Gal.	Anti-A (A)	<i>Phaseolus limensis</i>
HPA	α -GalNAc, Muc	<i>Helix pomatia</i>	
MOA	Gal1,3Gal, Gal1,3Gal1,4GlcNAc	Anti-B (B)	<i>Marasmius oreades</i>
PPA	Résidu α -D-Gal terminale		<i>Ptita plumose</i>
AAA	Anti-H type 1: (Fuc α 1-2 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ; l'antigène de Lewis : (Gal β 1-3[Fuc α 14] GlcNAc β 1-3Gal β 1- 4Glc)	Anti-A+B (O)	<i>Anguilla Anguilla</i>
PNA	Gal	Anti-T	<i>Arachis hypogaea</i>
MLL	GalNAc	Anti- A+N (AMM et ONN)	<i>Moluccella laevis</i>
SSL	GalNAc α -O-Ser/Thr	Anti-Tn	<i>Salvia sclarea</i>

3.2. Traitement et diagnostic du cancer

Des études montrent que les lectines peuvent jouer un rôle important dans l'inhibition de la croissance et l'induction de la mort des cellules malignes par de plusieurs mécanismes : l'autophagie, l'apoptose et le suivi de la croissance de ces cellules, dans le diagnostic et le traitement du cancer.

Les lectines jouent des fonctions dans l'induction de la mort cellulaire par l'induction d'apoptose (la programmation de la mort cellulaire). L'interaction des lectines avec leurs récepteurs sur la membrane de la cellule cancéreuse déclenche une série de signalisation conduit

Chapitre 1 : Généralités sur lectines

à l'activation de la voie de caspase 8 et caspase 3 et interagissent avec le récepteur de la mort cellulaire FasR porté sur la membrane de la cellule, ces réactions induisent ensuite l'apoptose de ces cellules (Lichtenstein *et* Rabinovich, 2013).

Les lectines réagissent avec une forte affinité avec les glycanes (tableau 3) des cellules tumorales qu'avec les cellules normales ce qu'elle donne une possibilité de détecter les cellules cancéreuses plus rapidement, elles sont considérées comme des biomarqueurs potentiels dans le diagnostic des pathologies cancéreuses (Yeu *et al*, 2015).

Tableau 4 : Certaines glycanes liées avec le cancer (Guillot *et al*, 2004)

Non de l'antigène	Séquence glycannique
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Tn	SA α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
T	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Lea	SA α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1-4 Fuc
Le ^x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Sialyl- Le ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3Fuc
Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1-3 Fuc
N-acétyllactosamine	Gal β 1-4GlcNAc
Séquence b 1-6-branchée	GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β - (oligosaccharides N-liés)

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

1. L'importance biologique des champignons

Les champignons comestibles ou toxiques représentent une filière biologique riche en biomolécules à intérêt thérapeutique et agronomique, elles synthétisent des substances possédant des valeurs nutritionnelles très essentielles pour l'alimentation humaine (Saltarelli *et al*, 2019 ; Lai *et al*, 2019) et d'autres substances toxiques généralement les alcaloïdes et les toxines peuvent servir comme étant des insecticides et des armes de défense contre les agressions pathogènes présentées dans leurs biotopes (Ruiqing *et Ji*, 2006).

2. Les rôles physiologiques de lectines dans le cycle de vie des champignons

Les lectines jouent probablement des fonctions essentielles dans la vie des basidiomycètes spécifiquement dans les différents stades de la croissance de champignon Table4 (Guillot *et Konsa*, 1997).

Tableau 5 : Les rôles et fonctions potentielles des lectines dans le cycle de vie des champignons (Konska G. 2006).

Stade de vie	Rôles et fonctions	Exemple
Dormance du mycélium	Assurent la vie des champignons lors de la période de dormance. Activent des réactions symbiotiques et déclenchent la croissance du mycélium	<i>Aegopodium podagraria</i> <i>Eranthis hyemalis</i>
La croissance et la morphogenèse	Contrôlent de la croissance et induction des voies métaboliques ou de synthèse, par la stimulation des enzymes avec la partie glycolysés Assurent la cohésion des hyphes durant le développement de basidiome	<i>Pleurotus cornucopiae</i>
la reconnaissance moléculaire lors de mycorhization	La présence des lectines avec une spécificité stricte dans les champignons agit sur l'initiation de la symbiose entre la spore ou mycélium et les plantes grâce aux communications intercellulaires	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>L. deterrimus</i>

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

3. Les lectines des basidiomycètes

Les champignons sont très riches en lectines que chez les plantes, elles sont isolées depuis de différentes parties du champignon : le mycélium, le stipe ou le pied, les basides, les spores et le fruit. Les purifiées initialement à partir de fruits des champignons comestibles *Agaricus campestris* et *Agaricus bisporus* (Goldstein & Poretz, 1986)

Des lectines purifiées du mycélium lors de la culture à partir différentes parties de champignons doivent soit similaires dans la structure et l'affinité comme chez *L. deliciosus* et *L. deterrimus* (Guillot et Konsa, 1997 ; Guillot *et al*, 1991) ou différentes comme : *Pholiota squarrosa* et *Agrocybe aegerita*. (Ticha *et al*, 1985).

Quelques d'eux a une activité hémolytique avec l'activité hémagglutinante, qui est responsable de l'intoxication, grâce à cette fonction la lectine joue un rôle dans la défense contre les prédateurs des champignons.

4. Classification des lectines fongique

Il existe plusieurs bases de données spécifiques : UniLectin interactive lectin database (<https://www.unilectin.eu>, et 3D Lectin Database (<http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/search.php?type=lectin>) ; pour les séquences peptidiques des milliers de lectines et leurs structures 3D, A partir de ces informations biologiques : les lectines ont été classes en 48 familles (Fujimoto *et al*, 2014). Les lectines fongiques ont été partagées et classées des galectines, les lectines de type Ricin β domain-like (R type), lectine de type Jacalin et monocote-like comme celles animales et végétales ; des autres lectines fongiques n'entrent pas dans cette classification à cause de l'absence de similarité structurale et la séquence peptidique avec les autres familles. Kobayashi et Kawagishi. (2014) ont proposé une classification en 4 familles :

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

4.1. Les lectines fongiques réparties des familles des Galectine, R-Type, Jacalin et Monocot Related

La classification des lectines fongiques n'est pas bien claire contrairement aux lectines végétales et animales. Les séquences en acides aminés sont généralement employées pour établir les relations évolutives et attribuer la réactivité de ces molécules. Toutefois, il n'existe aucune lectine fongique qui soit classée avec celle des animaux ou des végétaux dans la même famille.

Par exemple, les lectines d'*A. aegeria* (AAA et ACG) sont considérées comme des Galectines en raison de leur présence d'un ou plusieurs domaines structuraux et de leur spécificité pour les B galactosides et les Lac/LacNAc. Par ailleurs, les molécules purifiées de *Pleurocybella porrigens* (PPL), *Polyporus squamosus* (PSL) et *Marasmius oreades* (MOA) appartiennent à la famille des lectines de type Ricin.

Les autres lectines ayant une affinité pour le Gal et ces dérivés n'ont pas incluse dans cette famille car elles n'ont pas de structure bien définie et l'absence de l'homologie et avec celles de ces familles. Les lectines semblables de la famille Jacalin-Related comme HRL et GFL possèdent un CDR spécifique pour le Man et Mucine de stroma porcine PSM respectivement, la deuxième lectine MOL de *Marasmius oreades* spécifique pour le Man rentre dans la famille monocot related lectine.

4.2. Les lectines type ABL- Like (Fungal Fruiting Bodies)

Elle comporte les lectines de structure biochimique similaire celle d'ABL. Elle constitue un hétérotétramère dont l'organisation de chaque monomère de forme α/β sandwich et un domaine de feuilles β connectés par un motif structural hélice-boucle-hélice, Il existe deux sites CDR distincts dans chaque monomère qui reconnaissent différentes configurations du groupement hydroxyle épimérique du sucre, Cette famille assemble: *Xerocomus chrysenteron* lectin (XCL), *Sclerotium rolfsii* lectin (SRL), ABL et *Boletus edulis* Lec (BEL) Ses lectines ont une structure biochimique similaire à celle de l'ABL.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

Il s'agit d'un hétéro tétramère où chaque monomère de forme α/β sandwich est organisé et un domaine de feuilles β est relié par un motif structural hélice-boucle-hélice. Chaque monomère possède deux sites CDR distincts qui reconnaissent différentes configurations du groupement hydroxyle épimérique du sucre. Cette famille regroupe les lectins de *Xerocomus chrysenteron* (XCL), de *Sclerotium rolfsii* (SRL), d'ABL et de *Boletus edulis* (BEL).

4.3. La famille des Fuc-lectines AAL-like

Généralement, elle regroupe les agglutinines possédant une spécificité, une affinité pour les glycanes fucosylés (riches en fucose), et une structure similaire de la structure de la lectine d'*Aleuria aurantia* qu'elle constitue d'un dimère dans chaque monomère étant organisé en une hélice à six pales (hélices) β et une petite feuille antiparallèle à deux brins β . Où le pli de l'hélice β est important pour la reconnaissance de fucose, et les cinq sites de fixation situent dans les pales d'hélice, la petite feuille β comprend la séquence responsable à la désertisation de la lectine, Elle regroupe les lectines des micromycètes AFL (fungous, *Aspergillus fumigatus*) et AOL (fungous, *Aspergillus oryzae*) ; l'AAL.

4.4. La famille des *Pholiota squarrosa* like lectines PhoSL

La structure multimérique de la lectine est connue pour sa capacité à agglutiner les cellules de manière intense et à précipiter les glycoconjugués de manière similaire à l'interaction immunologique Ac-Ag. Cette lectine pourrait être un outil efficace pour étudier les glycoconjugués et diagnostiquer les changements anormaux des glycanes de la membrane cellulaire.

Le champignon *Pholiota squarrosa* a produit une lectine de spécificité pour la séquence saccharidique suivante : Fuc-1-6GlcNAc (Fuc-corps) et une structure trimérique de 40 aa. Selon Kobayashi et Kawagishi. (2014) cette famille comprend des molécules d'origine fongique telles que les lectines des *Strophariacées* qui ont une affinité pour les Fuc-corps.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

5. Les champignons comestibles et médicinales *Agrocybes*

Au fil des milliers d'années, les champignons comestibles et médicinaux sont devenus les plus importants au monde, en raison de son importance nutritionnelle et de l'alimentation humaine courante bénéfiques thérapeutiques leurs (Patel *et al*, 2012 ; Liuzzi *et al*, 2023). Riche en glucides, acides aminés, protéines, acides gras, vitamines, minéraux et autres métabolites secondaires, tels que polyphénols, tanins, terpènes Alcaloïdes qui contrôlent et améliorent diverses fonctions du corps humain, maintenir une bonne santé et réduire l'apparition de nombreuses maladies chroniques.

Les activités biologiques et thérapeutiques varient selon le type d'espèce et sont Composition en métabolites secondaires. Il existe 140 000 espèces de champignons sur Terre, plus de 3 000 espèces de champignons riches en substances biologiques bénéfiques pour l'homme (Podkowa *et al*, 2021. Wasser S.P. 2002).

La famille des basidiomycètes est une source importante de nutriments, Célèbre pour sa nomenclature caractérisée par ses propriétés médicinales attractives, sur le plan taxonomique, on la connaît sous le nom de famille des Strophariacées, qui comprennent plusieurs genres.

Les champignons *Cyclocybes* sont des champignons de la famille des saprophytes. *Macrocybeaceae*, caractérisés par une taille petite ou moyenne, poussant dans l'herbe, copeaux de bois, engrais, paillis de jardin ou bois, que ce soit sur terre ou dans Ils proviennent de bois mort et portent des empreintes de spores brunes. Certaines espèces ressemblent *Agrocybe aegerita*, *Agrocybe praecox* produisent des niveaux élevés de certains métabolites tels que les alcaloïdes et les nutriments (Gargano *et al*, 2017).

Ces métabolites extraits du mycélium ou des fruits de ces basidiomycètes ont Propriétés bénéfiques pour la santé, notamment : anticancéreuses, anti- hypertension artérielle, protection contre les dommages à l'ADN, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, et permettent d'assurer une bonne amélioration du système immunitaire.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

5.1. Description des *Agrocybe aegerita* (*Cyclocybe cylindracea*)

Champignon est une espèce saprophyte de taille petite à moyenne qui pousse dans Herbe, le fumier, le paillis de jardin ou bois, moyen Ils proviennent de la terre ou du bois mort et portent des empreintes de spores brunes. Ils ont Un chapeau convexe ou en forme de cloche ou presque plat.

Dans certaines régions, Mai et juin sont favorables à la plupart des espèces de champignons de l'arbre à thé. Ils ont des chapeaux Convexe ou en forme de cloche ou presque plat. Dans certaines régions, mai et juin Disponible pour la plupart des espèces d'origine Base de données sur les champignons (MycoDB) consulté électronique:10/03/2023sur le site web : https://www.mycodb.fr/fiche.php?genreCvelocvbe&espece vlindracea &numphoto 2& souree list&filter _&numfiche 2233.



Figure 8 : Représente le champignon *Cyclocybe cylindracea* (pholiote du peuplier) source Base de données mycologique (MyocoDB) consulté le : 20/04/2024 https://www.mycodb.fr/fiche.php?genreCvelocvbe&espece vlindracea &numphoto 2& souree list&filter _&numfiche 2233.

5.2. Taxonomie

La détection des *Agrocybes* est souvent basée sur plusieurs paramètres tels que l'analyse microscopique, l'analyse des spores. La mesure des dimensions de pores et la taille des pores à l'une des extrémités de la spore. Parfois, il est également important d'observer les cystides.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

Le cas de l'espèce *Cyclocybe crebia* et *Cyclocybe cylindracea* (*Agrocybe aegerita*) étaient classés parmi les espèces d'*Agrocybe* en raison de leurs nombreuses caractéristiques morphologiques (Vizzini & Angelini, 2014).

Leur identification macroscopique est basée sur divers critères tels que les dimensions générales, la présence ou l'absence d'un voile partiel (laissant des traces sur le bord du chapeau ou un anneau sur la tige), ainsi que des données : sur l'endroit où les champignons ont poussé dans l'herbe, l'observation microscopique des spores, leurs dimensions et la taille des pores à l'une des extrémités de la spore.

Il arrive parfois que l'étude des cystides soit également essentielle, étant donné leurs similitudes, les chercheurs ont (Vizzini *et al*, 2014) démontré que l'approche d'identification moléculaire, basée sur les concepts phylogénétiques des espèces, est une méthode appréciable pour identifier les espèces en se basant sur les marqueurs moléculaires (ITS, nuc-LSU et nuc-SSU) porté sur le gène ribosomal (Toumi *et al*, 2021. Kebaili *et al*, 2022).

Domaine : Biota

Règne : Fungi

Sous-Règne : Dikarya (Hibbett *et al*, 2007)

Phylum: Basidiomycota

Sous-Division : Agaricomycotina

Classe : Agaricomycetes

Sous-Classe : Agaricomycetidae

Ordre : Agaricales

Genre : *Cyclocybe*

Espèce : *Cyclocybe cylindracea* (DC.) Vizzini & Angelini, 2014.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

5.3. Habitat et distribution géographique

Le champignon des peupliers, contrairement à la plupart des autres champignons, semble être un peu rebelle et se développe sur des souches de peupliers morts. Ce champignon, bien qu'il ait un nom commun, se trouve aussi sur le sol dans les bois humides et les taillis.

Le Poplar Fieldcap (*Cyclocybe cylindracea*) est rare dans le sud de la Grande-Bretagne et de l'Irlande, mais plus répandu dans les parties centrales et méridionales de l'Europe d'Europe.

Le paillis de copeaux de bois est l'un des lieux les plus favorables à la découverte du Poplar Fieldcap en Grande-Bretagne. Depuis l'époque des Grecs et des Romains, ce champignon qui cause la pourriture blanche du bois est cultivé. Les *Agrocybes* se trouvent principalement dans les régions où l'humidité relative est élevée, notamment en Asie, en Europe et en Amérique du Nord. (Source web sur les sites suivants le 10/03/2023 : <https://www.first-nature.com/fungi/cyclocybecylindracea.php> ; [https://pecies.nbnatlas.org/species/NHMSYS0001474231#tab_records view](https://pecies.nbnatlas.org/species/NHMSYS0001474231#tab_records_view)).

5.4. Cycle de vie des champignons

Selon le mycologiste Peter. (2005). Les champignons ne possèdent pas la principale caractéristique des végétaux, sans chlorophylle, sans racines, sans feuilles et sans tiges. Actuellement, un autre règne fascine les scientifiques, qui les distinguent de celui des plantes ou des animaux, le règne fongique. Ils doivent donc garantir leur alimentation en absorbant les nutriments du matériel alimentaire provenant d'autres organismes. Le milieu naturel où ils vivent Sur le plan microscopique, le mycélium représente l'ensemble du réseau d'hyphes d'un même champignon, que l'on trouve sous terre.

Les champignons de la forêt que l'on peut observer sur le sol sont en train de se développer. Le carpophore, également appelé sporophore, renferme les spores qui ont été dispersées dans l'environnement. Selon Ripert *et al*, 2013. chaque cellule d'hyphe peut posséder un noyau (monocaryotique), deux noyaux (dicaryotique) ou même plusieurs, ce qui les différencie des cellules animales et des cellules de végétation. On peut voir sur le sol les champignons de la forêt qui sont en train de se développer.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

Dans l'environnement naturel, les champignons se reproduisent en générant entre millions et millions de spores. Quand l'une de ces spores se trouve dans un environnement propice, le germe et la ramifie se rencontrent. Afin de créer un mycélium. Quand deux mycéliums sont sexuellement compatibles, ils se fusionnent pour créer un mycélium secondaire capable de produire des fructifications (Peter, 2005).

6. Propriété nutritionnelles et médicinales des *Cyclocybes*

Les champignons ont joué un rôle essentiel dans le développement d'éléments actifs essentiels. Domaine d'activité l'utilisation de la chimie pharmaceutique comme source de substances bioactives et Des instruments essentiels pour la santé humaine et animale grâce à leurs propriétés nutritives et nutritionnelles. Ils offrent une abondance pour leurs applications en tant que produits nutraceutiques qui se distinguent par leurs capacités. Ici, nous avons illustré l'importance biologique de l'espèce *Cyclocybe aegerita*. Afin de mettre en évidence certaines propriétés nutritionnelles et thérapeutiques.

Selon les analyses nutritionnelles, il est démontré que ces champignons génèrent une quantité importante de glucides, de protéines et d'acides gras insaturés, tout comme chez l'espèce *Cyclocybe aegerita* de la Serbie. Elle présente les concentrations suivantes : glucides 84,51 g/100 g MS, cendre et protéines avec 6,69 g/100 MS et 6,68 g/100 g MS, respectivement. Selon Petrovic *et al*, (2015). l'acide linoléique est le principal acide gras insaturé avec un pourcentage de 78,40%.

Selon Petrovic *et al*, 2015, ce champignon génère les 4 iso formes de la vitamine E (Tocophérol) avec une concentration supérieure en l'isomforme γ -tocophérol (86,08 μ g/100 g MS), suivie par P tocophérol, 5-tocopherol et α -tocophérol (3,40 μ g/100g MS et 2,10 μ g/100 g MS, respectivement).

Une étude récente réalisée par Chen *et al*, 2023 a révélé les niveaux suivants d'éléments nutritifs essentiels chez *Agrocybe cylindracea* de la Chine : En protéines, il y a 14,09-27,24 g/100 g MS, en fibres alimentaires non solubles, 25,27-34,17 g/100 g MS, en fibres solubles, 0,49 3,19 g/100 g MS et en lipides, 1,69-3,45 g/100 g MS. On découvre dix-sept acides aminés, dont l'acide glutamique est le plus présent, avec une concentration de 18,24 à 46,78 g/100 g MS.

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

Le champignon du peuplier noir *Cyclocybe cylindracea* ou *Agrocybe aegerita* des Agaricomycetes, connu sous le nom de « pioppini » appartenant aux Basidiomycètes et connu sous le nom de « Yangshugu » en Chine, est considéré comme un champignon comestible et médicinal parmi la population chinoise, en raison de ses effets antimicrobiens et thérapeutiques des syndromes de néphrite et d'œdème. (Uhart *et al*, 2007) . Une attention particulière a été attirée sur *C. cylindracea* en raison de son potentiel en tant que champignon médicinal et nutraceutique. Selon une étude récente, une supplémentation alimentaire en *C. cylindracea* a protégé le microbiote intestinal des souris et pourrait diminuer.

Le poids corporel, l'accumulation adipeuse, la tolérance au glucose, les niveaux de lipides et réparer des lésions hépatiques chez les souris C57BL/6 nourries avec des régimes riches en graisses. (Zhu *et al*, 2022). De plus, deux fractions polysaccharidiques d'*A. aegerita* obtenues par diverses méthodes ont inhibé la prolifération des cellules MGC-803 en induisant l'apoptose par la voie du cytochrome *c*/caspase (Liu *et al*, 2023).

Ce champignon est une riche source de polysaccharides ; il a été mentionné que les polysaccharides extraits (ACP) présentaient une plus forte inhibition des radicaux libres in vitro (DPPH, anion superoxyde). De plus, les ACP exercent des effets anti-âges et anti-inflammatoires (Lius *et al*, 2022 ; Zhu *et al*, 2022).

Ce champignon agaric contient une bonne source de biomolécules naturelles utiles telles que des composés phénoliques et des terpénoïdes, qui sont utilisés dans des applications médicales et biotechnologiques comme antioxydants et bioconservateurs alimentaires. Il a montré des effets protecteurs sur les cellules hépatiques contre la toxicité du tétrachlorure de carbone. (Selvakumar *et al*, 2015 ; Sankar *et al*, 2015 ; Dogan *et al*, 2022).

Plusieurs études ont démontré que *C. cylindracea* contient une bonne réserve de protéines et d'acides aminés. Les protéines sont les molécules les plus étudiées, et plusieurs familles sont caractérisées, comme les Hydrophobins et l'Ageritin (protéine de type ribotoxine). Il est utilisé comme modèle pour produire des enzymes biotechnologiquement pertinentes de type UPO (peroxygénases non spécifiques, EC 1.11.2.1) et de la lipoxigénase (Ragucci *et al*, 2021 .Hofrichter *et al*, 2015, 2020 ; Karrer *et al*, 2019).

Chapitre 2 : Les lectines des basidiomycètes et le champignon *Cyclocybe cylindracea*

Des études antérieures ont confirmé la présence de différentes lectines de pioppini, caractérisées par diverses propriétés biologiques. Le galactose et les lectines liant le lactose (glectines) étaient les principales molécules purifiées (Ban *et al*, 2005). Il a été rapporté que les glectines d'*A. cylindracea* présentaient des effets antitumoraux, stimulant les processus de mitogénèse (Wang, *et al*, 2002), et inhibant la transcriptase inverse du VIH-1 (Li *et al*, 2008) Dans d'autres découvertes, la lectine mycélienne de pioppini a montré une activité antiphytovirale inhibant le virus de la mosaïque du tabac. De plus, l'application de lectines comme adjuvant immunitaire peut protéger l'animal contre le virus de la grippe aviaire H₉N₂ (Ma *et al*, 2017) .

Dans la présente étude, nous avons purifié une lectine de champignon *C. cylindracea* souche TMES43 par une chromatographie d'affinité, et étudié ces caractéristiques biochimiques et évalué leur activité biologique.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Récolte et identification du champignon *Cyclocybe cylindracea*

La collecte du champignon a été réalisée en février 2023 dans la ville d'Oued Athmania-Mila (voir figure 8). Toumi *et al*, 2024 (Laboratoire Génie microbiologique et Applications – UFMC 1) ont été identifiés l'espèce en utilisant une approche moléculaire des gènes ITS et nuc-LSU de l'opéron ribosomal eucaryotique. L'espèce est désignée sous le nom de *Cyclocybe cylindracea* souche TMES42.



Figure 9 : Champignon sauvage *Cyclocybe cylindracea* collecté (photo personnelle prise en février 2024).

2. Extraction et purification de la lectine

2.1. Extraction de protéines totales

Le champignon a été décongelé et lavé avec l'eau du robinet puis avec l'eau distillée pour être découpé en petits morceaux. Macéré 300 g de morceaux dans un volume de 700 mL du tampon PBS 10 mM pH 7,4 (10 mM Na₂HPO₄ ; 2 mM KH₂PO₄ ; 2,7 mM KCl ; 137 mM NaCl ; 2 mM EDTA) à l'aide d'un mixeur broyeur le contenu.

Le mélange a été filtré à l'aide un système de filtration sous vide, le filtrat a été centrifugé pendant 30 min à 15000 rpm à 4 °C pendant 24h. Le surnageant obtenu est récupéré pour évaluer la présence des lectines par le test d'HA et de quantifier les protéines totales.

2.2. Préparation et fixation des érythrocytes

Le sang du lapin a été recueilli par ponction du sinus rétro-orbitaire dans des tubes citratés. Les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min à 4 °C, ensuite les plasmas ont été éliminés et les culots récupérés ont été lavés par une solution saline stérile (eau physiologique NaCl 0,9 %, ou par le tampon PBS 10 mM pH 7,4) puis centrifugés pendant 5 min à 1000 rpm et à 4 °C. Les deux étapes seront répétées cinq fois successives.

La fixation des globules rouges (GR ou les érythrocytes) sera réalisée selon la méthode de Sano et Ogawa. (2014). Les GR ont été incubés dans le PBS 10 mM pH 7,4 contenant le glutaraldéhyde 1% (Sigma Aldrich, G5882) pendant 10 à 15 min. Cinq cycles de lavage et de centrifugation ont été réalisés afin d'éliminer l'excès du glutaraldéhyde.

Une étape de lavage, par une solution glycine 1M dans NaCl 0,9% ou le PBS a été ajoutée pour éliminer l'interaction du glutaraldéhyde avec les glycanes membranaires des érythrocytes. A la fin, les érythrocytes fixées s'immergent dans le PBS avec une concentration (v/v) de 3% pour les érythrocytes du lapin et 4% pour le système ABO et sont conservées à 4 °C (Sano et Ogawa, 2014).

2.3. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA)

Ce procédé est largement employé afin de repérer les lectines et leur présence dans les extraits protéiques, grâce à sa rapidité et à son coût abordable. Cependant, il n'est pas toujours fiable (Sharon N. et Lis H. 1998). Chaque puits d'une plaque à microtitration a été rempli de 50 µL de tampon PBS (10 mM pH 7,4). Ensuite, un volume équivalent de la solution protéique a été ajouté dans le premier puits et a été délicatement mélangé à l'aide d'une micropipette.

Un prélèvement de 50 µL a été effectué et il a été dilué avec 50 µL de PBS afin d'obtenir une dilution de ½ dans le premier puits. Après 50 µL sera prélevé et soumis à des dilutions géométriques dans le reste des puits. Enfin, nous avons incorporé 50 µL de suspension des RBC (figure 09) (Sano K. *et al*, 2014). Après 1h l'agglutination a été observé à l'œil nu.

Matériels et Méthodes

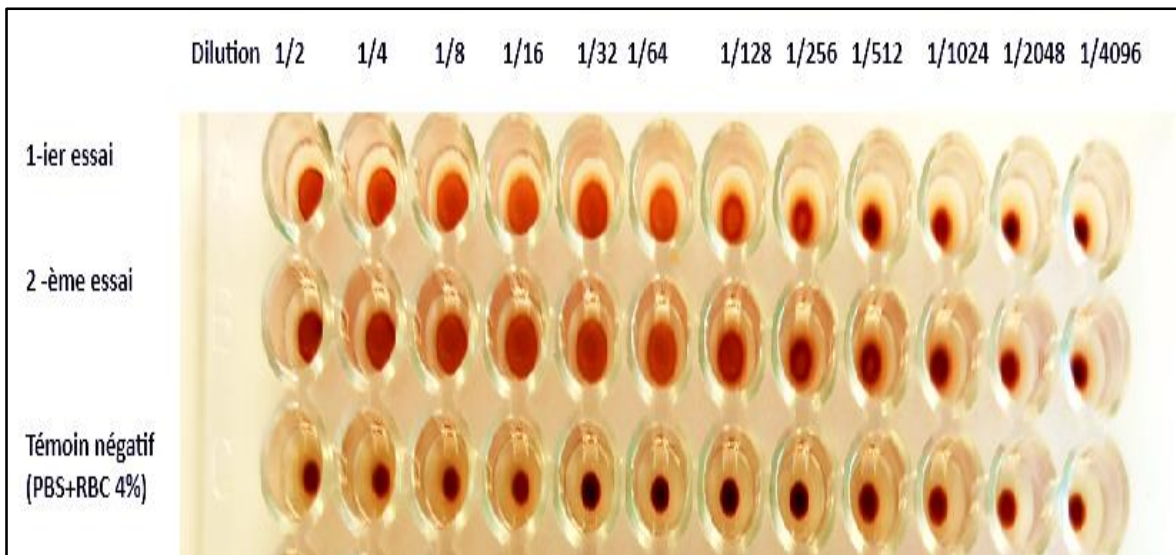


Figure 10. Test d'HA des érythrocytes fixés, en présence d'un témoin négatif (PBS), (photo personnelle prise le 7 /02/2024).

2.4. Purification

2.4.1. Précipitation et fractionnement des protéines par salting out

Les protéines de l'extrait brut sont fractionnées à l'aide du sel de sulfate d'ammonium (AMS) (tableau de précipitation à 0 °C, annexe 1). Après la solubilisation du sel dans l'extrait protéique, une fractions protéiques avec une saturations en AMS a été collectée après la solubilisation du sel dans l'extrait protéique selon: la méthode suivante : Incorporer une quantité de 16g d'AMS afin d'atteindre une saturation de 80 % dans l'extrait initial, puis dissoudre en agitation à froid dans un bain de glace pendant 20 minutes. Après 10 minutes de centrifugation à 15000 rpm et à 4 °C, les protéines précipitées sont collectées dans le culot (figure 11).

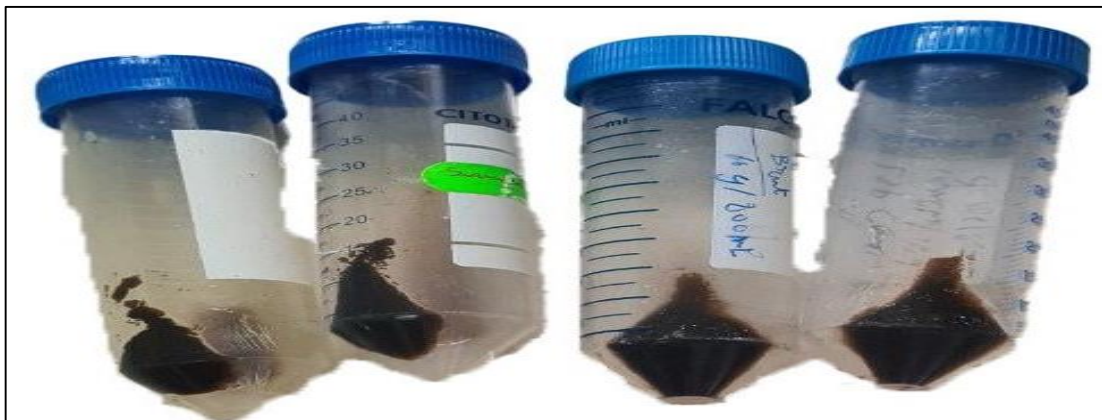


Figure 11. Les culots protéiques obtenus après la précipitation avec le sulfate d'ammonium.

2.4.2. Dialyse

La fraction de 80% est dissoute dans un tampon de 5 mL de PBS (10 mM à pH 7,4) et on les insère dans un boudin de dialyse cellulosique avec une force de rétention de 12 kDa (Spectra/Por® Membrane Dialysis Products). Ensuite, on les dialyse pendant 24 heures dans de l'eau distillée puis du PBS (10 mM à pH 7,4).

Les dialysats ont été collectés et un test d'HA a été réalisé pour distinguer la fraction de titre d'activité la plus élevée.

2.4.3. Chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose 2B

Le Sepharose 2B pour la chromatographie a été préparée et stockée dans de l'éthanol à 50 %, selon les conditions du fabricant Pharmacia Biotech. Après dégazage avec pompe à vide Labtech à haut débit pendant 30 minutes, il sera coulé dans une colonne de 2 cm×10 cm, puis lavé 3 fois et équilibré avec du PBS 10 mM pH 8,4 (dégazé et filtré sur membrane de 0,45 µm).

Un volume de 3 mL de la fraction 80% a été injecté dans la colonne. Les fractions qui ne se fixent pas sur le sepharose 2B (non adsorbées) ont été éliminées par un lavage par le tampon d'équilibration. L'élution des fractions adsorbées est effectué par le tampon PBS 10 mM pH 8,4 contient le Galactose à 0,4 M (annexe 1).

Les fractions ont été collectées un débit de 0,5 mL/min dans un volume total de 2 mL par un collecteur de fractions GILSON FC80, le spectre chromatographique a été tracé après la lecture des absorbances (Abs) à 280 nm dans un spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible. Un test d'HA a été appliqué pour détecter la fraction active après dialyse de différentes fractions collectées.

2.4.4. Lyophilisation

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer l'eau d'un produit congelé. L'opération a été effectuée dans un lyophilisateur Labconco Freezone® au niveau de laboratoire 15 de la faculté des sciences de la nature et de la vie- UFMCI.

3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée

3.1. Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) est une méthode colorimétrique qui permet de doser la concentration protéique d'un échantillon récupérées de chaque étape de la purification. En utilise généralement le sérum albumine bovin à 1 mg/ml (BSA) comme une protéine standard, les Abs ont été lues à 595 nm avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible (annexe2).

3.2. Détermination du poids moléculaire

3.2.1. Electrophorèse dénaturante SDS-PAGE

Dans une cuve d'électrophorèse verticale Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra au Laboratoire de cristallographie biologique et de nanostructure (Vérone, Italie), l'analyse électrophorétique des composants actifs a été effectuée selon la méthode de Laemmli UK (1970). En présence de SDS, un gel de polyacrylamide discontinu à 1,5 mm d'épaisseur a été utilisé pour le gel de stacking et le gel de séparation, dans des conditions dénaturantes. Combiner la fraction à examiner avec le tampon dénaturant (Annexe 3) à une proportion de 1/4 (v/v) et laisser incubé à une température de 95°C pendant 10 minutes. Par la suite, les fractions sont placées dans les puits. Vous pouvez utiliser le kit d'étiquetage de taille 11-180 KDa (BlueRay Prestained Protein Label-PS-103).

La migration a été effectuée sous un champ électrique à 180V et une tension de 50 mA pendant 1h. Le gel a été retiré puis traité par la solution de coloration contenant l'éthanol, l'acide acétique glacial et le bleu de Coomassie solubilisé dans la MilliQ. Après 20 min sous agitation, la solution a été éliminée et substituée par une solution de décoloration composée d'éthanol et d'acide acétique glacial mélangé dans la MilliQ (annexe 3).

Nous avons retiré le gel, puis nous avons utilisé une solution de coloration à base d'éthanol, d'acide acétique glacial et de bleu de Coomassie solubilisé dans la MilliQ. La solution a été retirée après 20 minutes d'agitation et remplacée par une solution de décoloration à base d'éthanol et d'acide acétique glacial mélangé dans la MilliQ (annexe 3). À la fin de l'opération, La lecture des bandes est réalisée.

Matériels et Méthodes

3.2.2. Conditions natives PAGE

Selon Laemmli U.K. (1970) les conditions de PAGE étaient les mêmes que celles utilisées pour préparer les gels SDS-PAGE, à l'exception de l'ajout de SDS lors de la préparation de gels à une concentration de 5 % à 12 % et de la dénaturation des échantillons par chauffage (annexe 3). La lecture est effectuée après les étapes de coloration et de décoloration.

3.3. Test limite d'HA et d'inhibition

La même méthode utilisée par Sano et Ogawa, 2014, pour déterminer la dilution maximale qui induit l'hémagglutination, aura appliqué pour mesurer : le titre d'agrégation représente l'activité spécifique (AS), qui est l'inverse de la dilution maximale en activité. Cela correspond au rapport du nombre d'unités hémagglutinantes (UHA) à la concentration de protéines totales dans chaque fraction (mg).

Le test d'inhibition d'HA avec des glucides (400 mM) et des glycoprotéines (1 mg/mL) suit la même méthode que le test d'hémagglutination. Sur une microplaque comprenant 96 puits (8 lignes et 12 colonnes), on déposera 25 μ L de PBS 10 Mm à un pH de 7,4 dans tous les puits, tandis qu'un même volume de sucre sera ajouté uniquement dans le premier puits Sano et Ogawa, 2014.

Une fois que nous avons prélevé un volume de 25 μ L à partir de ce premier puits, nous avons ensuite dilué ce volume avec 25 μ L de PBS pour obtenir une dilution de l'ordre de la moitié (1/2). Tous les puits de la microplaque ont été soumis à des dilutions géométriques. L'étape qui suit est le dépôt d'un autre volume égal de la lectine a été ajouté à chaque puits.

Les plaques sont mises en incubation pendant une heure à une température de 37°C. Par la suite, on incorpore 50 μ L des érythrocytes fixés du lapin (4% dans le PBS 10 mM pH 7,4) dans chaque puits. Les résultats ont été consultés après une incubation de 1 heure à une température de 37°C.

3.4. Evaluation de la stabilité protéique

❖ La lectine partiellement purifiée (CCL) a été incubée dans le bain marie pendant 1h sous une variation de température (40, 60, 80,100 °C). Après chaque température on fait le teste HA.

❖ L'évaluation l'effet du pH sur l'HA: La CCL a été dialysé 24 h dans différents Tampons à des pH croissants: 2 (20 mM glycine-HCl) ; 4, 6 (20 mM citrate phosphate) ; 9 (20 mM Tris-HCl), et 10 (20 mM glycine-hydroxyde de sodium) (annexe 1).

❖ La solution de lectine a été incubée (v/v) dans un tampon PBS contenant d'EDTA 10mM pendant 2h et des tampons PBS avec différents cations CaCl₂, CuCl₂, FeCl₃ et MnCl₂ à 10mM de concentration.

4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

❖ Protocole expérimental

Le protocole expérimental a été réalisé au niveau de l'animalerie de l'université Frères Mentouri Constantine -1- sur un nombre de 25 souris mâles (Wister blanc) du poids entre 25 et 35 g, qui sont été divisés en 4 groupes homogènes. La lectine lyophilisée CCL a été solubilisée dans l'eau physiologique stérile avec une dose de 30 mg/kg correspondent au groupe traité par la CCL (G2) les 2 groupes témoin G1 et toxique G 3 recevant l'eau physiologique par l'injection d'un volume par poids corporel de 0,1 mL/10 g et un G 4 de référence reçoit un dose de 5 mg/kg Rutine par voie intrapéritonéale (I.P).

Les animaux ont prétraité pendant 7 jours par les différentes traitements, au soir du 6^{ème} jour, ils ont mis à jeun de 16h, dans la matinée du septième jour, ils ont reçu une injection par chaque traitement qui correspond à chaque groupe, après 30 min, une injection d'un volume 0,1 mL de carraghénane (1% dans l'eau physiologique) dans les groupes suivants G2, G3 et G4 respectivement par voie sous cutané sur la patte.

La mesure d'œdème est effectuée après 1, 3 et 6 h d'injection de la carraghénane, à l'aide d'un pied à coulisse.

Matériels et Méthodes

Le calcul du pourcentage d'œdème est réalisé par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition d'œdème} = \frac{T_{\text{carraghénane}} - T_0 \text{ (traité)}}{T_{\text{carraghénane}}} \times 100$$

$$\% \text{ d'œdème} = 100\% - \% \text{ inhibition d'œdème.}$$

Sachant que :

$T_{\text{carraghénane}}$: l'épaisseur de la patte pris après 1, 3 et 6 h d'injection du lot toxique (carraghénane).

T_0 (traité) : l'épaisseur de la patte pris après 1, 3 et 6 h d'injection des groupes traités.

5. Analyse statistique

L'analyse des résultats des tests a été réalisée sur la base du traitement statistique en utilisant le logiciel Graph Prism version 8. La comparaison des pourcentages moyens d'augmentation du volume de la patte de la souris et d'inhibition de l'œdème a été faite avec le test ANOVA à deux facteurs à $p < 0,05$.

Résultat

Résultats

1. Purification de la lectine

Le test d'HA et le dosage des protéines de l'extrait protéique de *Cyclocybe cylindracea* souche TMES42 montrent qu'il a induit une activité à un titre de 61400 UHA et une teneur protéique de 400 mg. Après la précipitation par AMS, l'HA reste conservée à un titre de 61440 UHA, nous avons observé une augmentation de Sac 2612,24 UHA/mg et un indice de purification de 3,65 fois supérieur à celui de l'extrait brut.

Ces mesures ont augmenté supérieurement après la chromatographie d'affinité, où l'SAc atteint 23836,12 UHA/mg, un degré de pureté de 9,12 ; mais le rendement a diminué. Les étapes de purification ont été présentées dans le tableau 6, et le profil de purification par la FPLC a été présenté dans la figure 12 et l'annexe 5.

Tableau 6 : Purification de la lectine à partir *Cyclocybe cylindracea*

Fractions	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité totale (UH) ^a	SAc (U/mg) ^b	Indice de Purification	Rendement (%)
Extrait brut	400	71,6	51200	715,08	1	100
AMS [80%]	120	23,52	61440	2612,24	3,65	12
Gal élution	25	13.42	12800	23836,12	9,12	25

(a) Activité hémagglutinante totale représentant le titre multiplié par le volume de la fraction.

(b) L'activité spécifique (SAc) correspondant à l'activité HA totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines (mg). (c) L'index de purification est défini comme étant le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines. (d) le rendement ou le % de l'activité HA totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.

Résultats

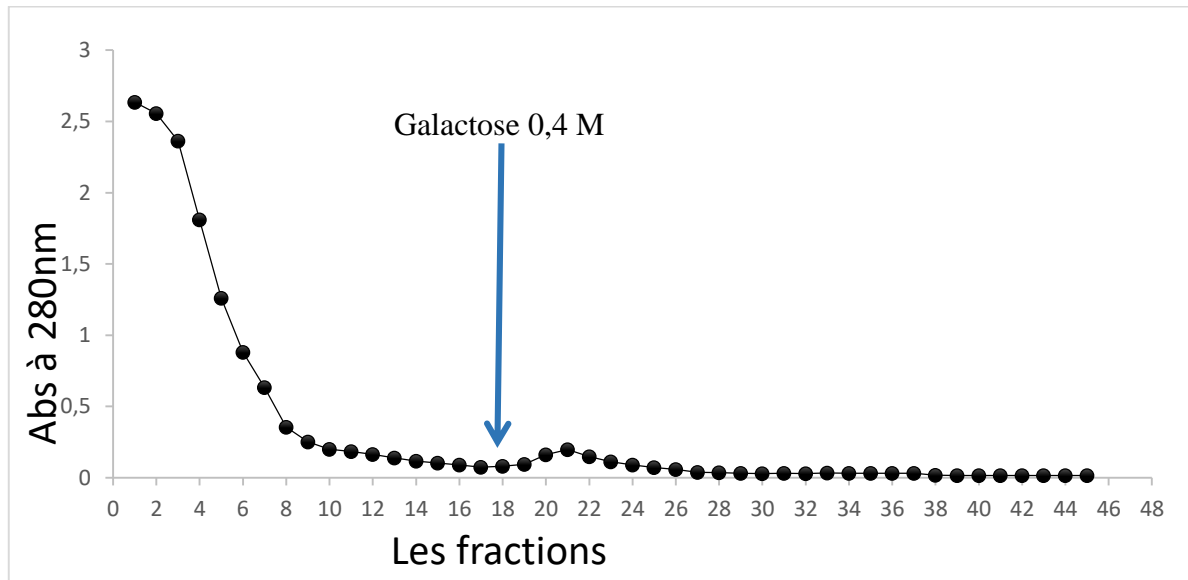


Figure 12. Le profil chromatographique de la fraction AMS 80%: a- le spectre d'absorption UV des fractions séparées sur le Sepharose 2B obtenu par l'FPLC ; b- le spectre des fractions éluées par le Galactose 0,4 M, après la mesure des densités optiques.

2. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée

2.1. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et PAGE

L'analyse électrophorétique de la lectine (fraction active) purifiée dans les conditions de dénaturation révèle qu'elle possède une structure dimérique par l'association de ponts disulfure d'une S/U de poids moléculaire supérieur à 17 kDa (figure 13, a) et une seule bande de PM supérieur à 35 kDa révélé par PAGE (figure 13, b).

Résultats

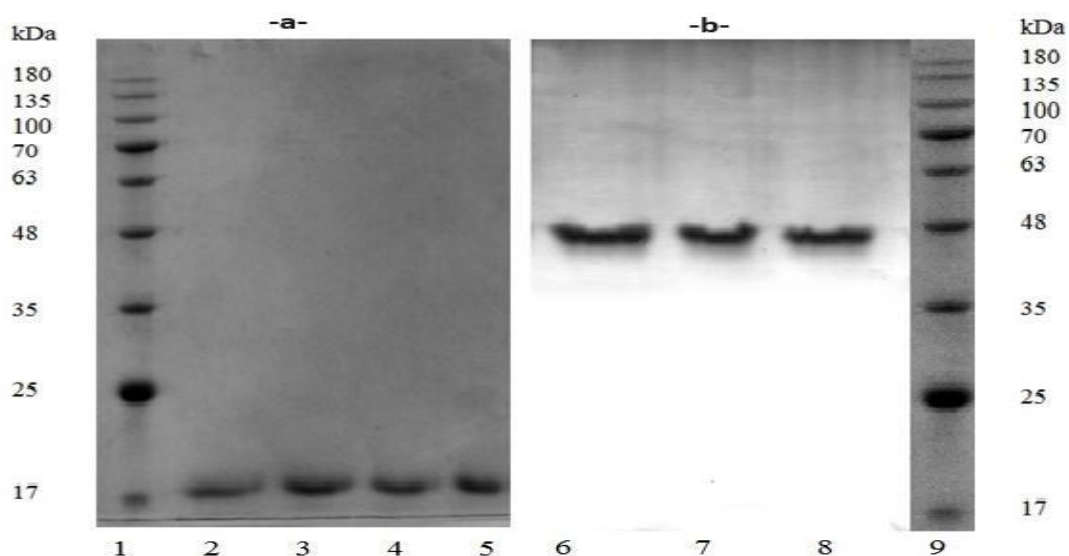


Figure 13. Résultats du poids moléculaire de la lectine CCL : a- Electrophorèse SDSPAGE, les puits 2 jusqu'à 5 représentent la bande obtenue après la dénaturation de la lectine CCL de PM approximative 18 kDa, le puits 1 correspond au marqueur PS-103 ; b- Electrophorèse PAGE, le puits 9 représente le marqueur de taille protéique PS-103, les puits 6 jusqu'à 8 représentent la bande protéique de la lectine CCL de PM > 35 kDa.

2.2.Effet de la variation de la température et le pH sur l'activité protéique

La CCL a été incubée dans différentes température (40-100 °C), conditions de pH (2-10) et d'EDTA (10 mM). Nous remarquons que l'activité HA reste stable dans l'intervalle de température entre 40 et 60 °C ; au-delà l'activité s'est annulée (tableau 7, figure 14).

Cependant dans le milieu à un pH neutre 7, la stabilité de l'activité agglutinante de la protéine reste maximale mais dans les milieux fortement basiques ou acides, elle diminue pour s'annuler (tableau 8, figure 15).

Tableau 7 : Effet de la variation de la température sur le titre d'hémagglutination (UHA).

Température	40	60	80	100
UHA	128	4	0	0

Résultats

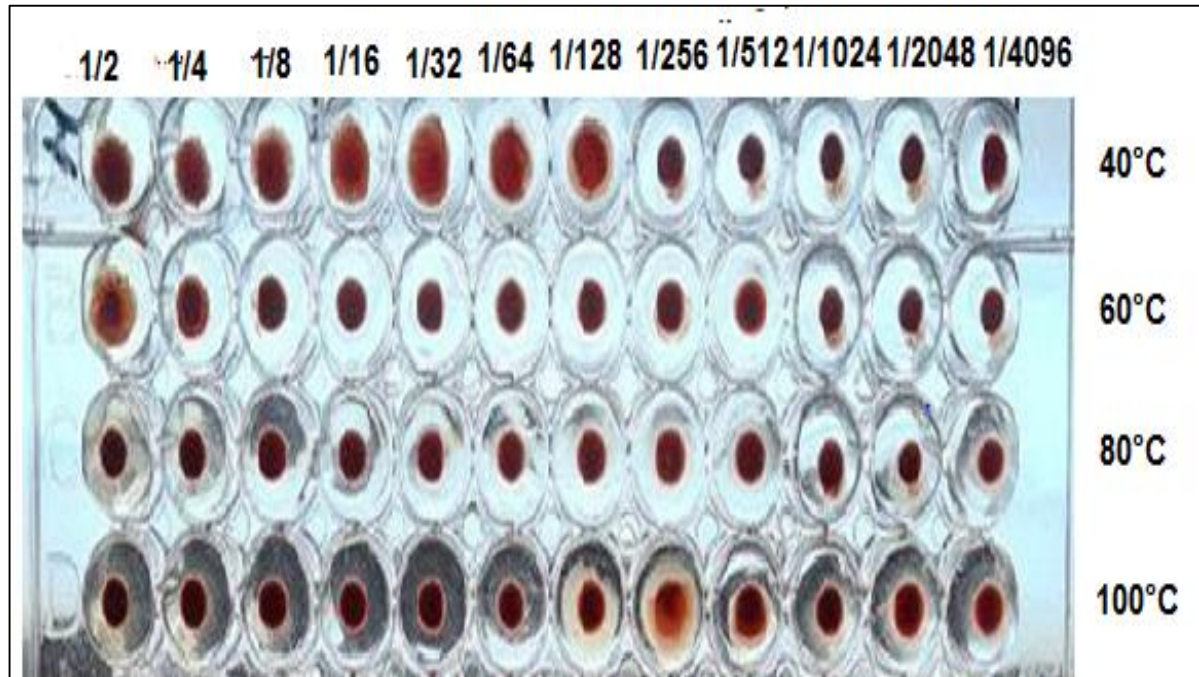


Figure 14: Effet de la variation de la température sur le titre d'hémagglutination (UHA).

Tableau 8 : Effet de la variation de pH du milieu sur le titre d'hémagglutination (UHA).

pH	2	4	6	7	9	10
UHA	8	8	8	128	4	4

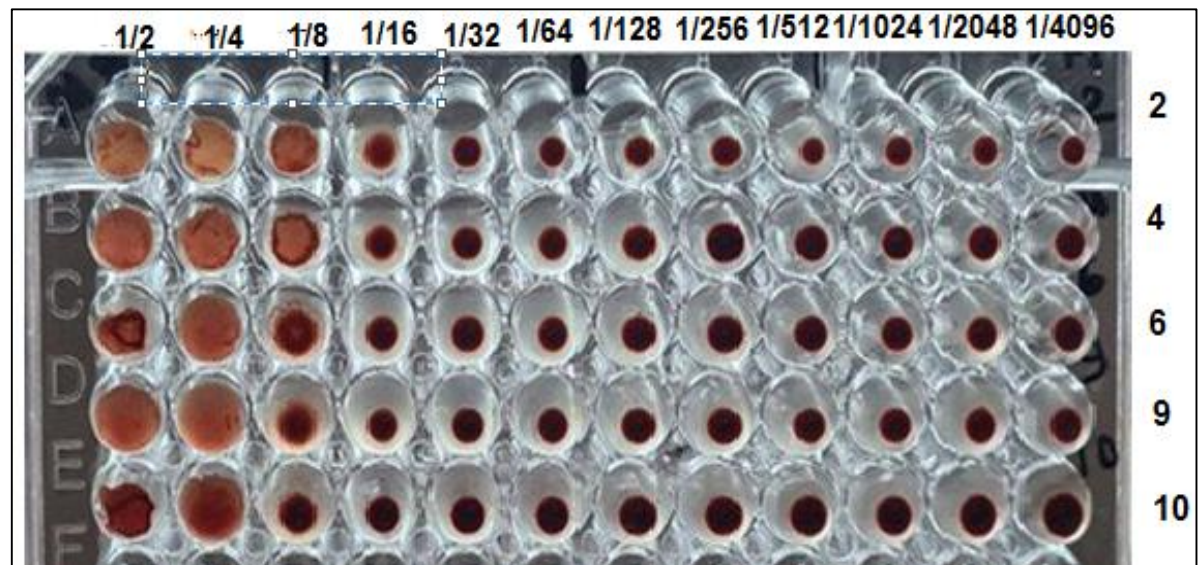


Figure 15. Effet de la variation de pH du milieu sur la stabilité de la lectine CCL.

Résultats

2.3. Inhibition de l'activité hémagglutinante

Les résultats obtenus montrent que l'inhibition d'HA a été effectuée soit par des sucres ou des glycoprotéines (tableaux 8, figure 16) et que la lectine CCL a une affinité pour le lactose affichant une concentration minimale inhibitrice (MIC) d'environ 0,019 mM et une faible affinité pour le Gal 0,625 mM.

Tableau 9: Résultats de test d'inhibition d'HA.

Sucre/Glycoprotéine	Inhibition	MIC (mM)	Sucre/Glycoprotéine	Inhibition	MIC (mM)	
Inositol	A	/	Sorbitol	A		
Saccharose			GlcNAc			
Cellobiose			Chitosane			
Méthyl - α L- Fucopyranoside			Lactose	I		0,019
L Melibiose			Glucose	A		
Galactose	Mucine					
L- Rhamnose	A		Lactose	I	0,019	
Mannose			Cellulose	A		
2-Nitrophenyl β D-Galactopyranoside			4-Nitrophenyl α -D Glucopyranoside			
4-Nitrophenyl β Galactopyranoside			4-Nitrophenyl α - D Galactopyranoside			
Mannitol			L-Arabinose			
DH- Sorbitol			α -D Mannopyranoside			
4-Nitrophenyl β D- Glucopyranoside			Xylose			

I : présence d'Inhibition d'HA; **A** : Absence d'inhibition

Résultats

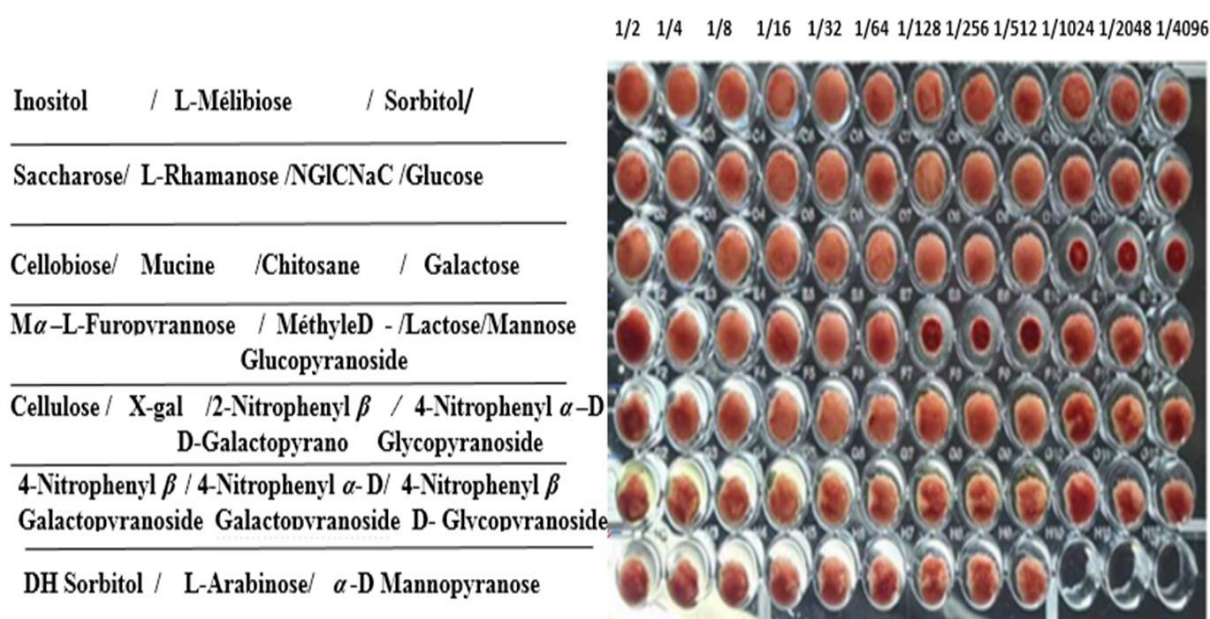


Figure 16. Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante par les sucres et les glycoprotéines

3. Evaluation d'activité anti-inflammatoire *in-vivo*

La mesure de l'inhibition d'œdème, nous a montré l'absence d'un effet inhibiteur de la carraghénane chez les souris traitées par la lectine CCL purifiée, et aucune diminution significative du volume d'œdème de la patte ne sera enregistrée plus lors de différentes phases de l'inflammation (1, 3 et 6h après l'induction). Les résultats sont présentés dans le tableau 10 et la figure 17.

Temps (h)	Carraghénane	Lectine 30 mg/kg
1	54,5857±8,78074	80,4771±1,2624
3	63,2714±12,5323	89,2257±8,4545
6	69,88±3,85718	86,8057±8,99854

Résultats

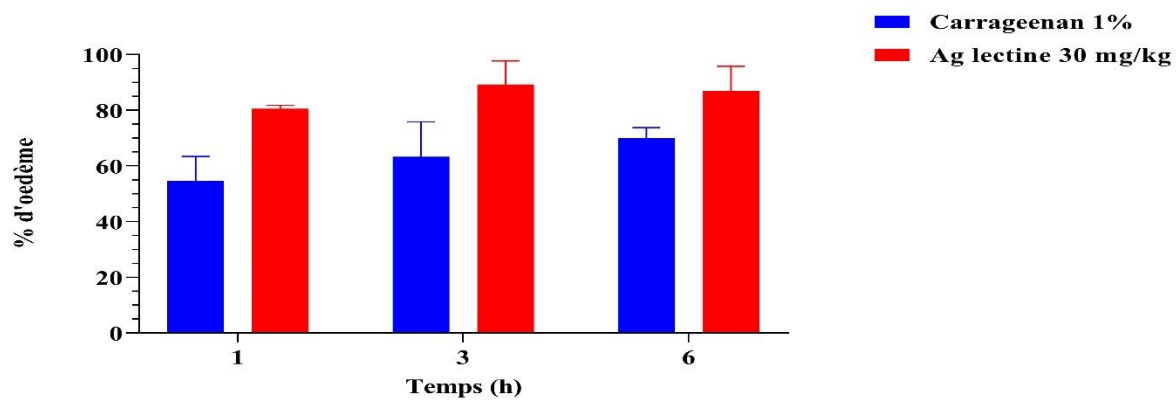


Figure 17. Variation de pourcentage d'œdème pendant le temps chez les souris traitées par la lectine CCL.

Discussion générale

Discussion générale

La caractérisation électrophorétique de la lectine purifiée de la souche MEST42 de *Cyclocybe cylindracea* a donné un poids moléculaire supérieur à 35 kDa pour la protéine native à structure dimère, où des sous-unités de 18 kDa ont été trouvées dans des conditions dénaturantes.

Ces résultats ont confirmé que le CCL était un complexe protéique ayant une structure homodémérique et que les deux sous-unités étaient combinées par des liaisons non covalentes et sans liaison SS.

Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Zhao *et al*, (2003). où la lectine purifiée (AAL) possédait une structure homodimère avec un poids moléculaire approximatif de 15,8 kDa pour chaque sous-unité, avec une affinité pour le galactose et le lactose.

De plus, Liu *et al*, (2008) ont purifié une lectine liant le lactose provenant d'*A. cylindracea* cultivée en Chine, avec un poids moléculaire de 31,5 kDa et une structure hétérodimère. Jiang et coll. (2012) ont isolé de ce champignon une nouvelle lectine dépendante des cations avec une affinité pour la N-acétyl-glucosamine. Cet AAL-2 pouvait se lier à la surface des cellules d'hépatome, induire l'apoptose cellulaire *in vitro* et *in vivo*, il était stable dans la plage de pH 6,00-11,0, avec une activité dépendante du calcium.

Dans la présente étude, la lectine purifiée à une affinité pour le lactose et le galactose, et son activité d'hémagglutination était stable entre 40 et 60 °C et dans des milieux peu acides et alcalins.

Nos résultats montrent que l'activité d'hémagglutination du CCL est sensible à l'agent chélateur de métaux EDTA. Cela pourrait suggérer que cette lectine soit dépendante des cations pour exercer sa fonction. Il a été évalué que certaines lectines fongiques sont des protéines métal-dépendantes ; comme la lectine de *Polyporus adusta* qui pourrait être affectée par 10 mM de FeCl₃. Son activité de liaison aux érythrocytes était augmentée par ce métal, alors que d'autres cations n'affectaient pas son activité (Wang *et al*, 2003).

Discussion générale

De plus, la lectine de *Xerocomus spadiceus* dépendait du métal, son activité d'hémagglutination étant doublée en présence de 5 mM d' AlCl_3 ou de 10 mM de ZnCl_2 et quadruplée en présence de 10 mM d' AlCl_3 (Luis *et al*, 2003). Certaines lectines de basidiomycètes ne sont pas affectées par les sels chélateurs de métaux (EDTA) ou les cations divalents, ce qui indique que toutes les lectines fongiques ne sont pas des protéines dépendantes des métaux, comme c'est le cas pour la lectine liant le mannose (HLR) d'*Hygrophorus russula* (Suzuki *et al*, 2012).

La lectine de *Boletus edulis* purifiée par trois types différents chromatographiques exerce une hémagglutination en présence d' AlCl_3 et de FeCl_3 avec une concentration variant entre 1 et 10 mM.

Zhang *et al*, 2024, ont observé que le EDTA induit une diminution de l'activité HA de la lectine de champignon *Stropharia rugosoannulata*, cette activité sera augmentée en présence des cations Cd^{2+} et Hg^{2+} avec des concentrations de 1,25-10 mM, les autres cations induisent une faible diminution d'HA à une dose de 10 mM, cette diminution est réversible avec la diminution de la concentration des cations divalents et trivalents.

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons étudié les lectines d'origine fongique, en particulier les basidiomycètes de la flore algérienne en raison de leur richesse et de l'absence des travaux sur ces lectines au niveau algérien. La lectine a été isolée et caractérisées par différentes techniques utilisées dans les études biochimiques.

Elle possède une structure dimérique présente une spécificité pour le Gal ou ses dérivés, une affinité pour le lactose, cette lectine est dénommée CCL et est purifiée à partir de la souche TMES42 (récoltée au niveau dans la ville d'Oued Athmania-Mila).

L'électrophorèse PAGE a révélé que son poids moléculaire supérieur à 35 kDa, et l'SDS-PAGE a montré qu'elle était constituée d'une structure dimérique à un PM supérieur à 17 kDa.

Cette lectine exerce une activité hémagglutinante et une autre hémolytique inhibées par le lactose. Elle a une stabilité à pH alcalin et aux basses températures. C'est une métallo-dépendante qui nécessite la présence des cations métalliques CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 et MnCl_2 .

Nous avons évalué le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait, on a constaté une activité non remarquable par le teste utilisée dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Boyd W. C. & Shapleigh. E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. 119(3091). 419-419.

Cao Z. Aharonian, F. An Q. Axikegu Y. X. Bao Y. W. & Pei Z. Y. (2023). Measurement of ultra-high-energy diffuse gamma-ray emission of the Galactic plane from 10 TeV to 1 PeV with LHAASO-KM2A. *Physical Review Letters*. 131(15). 151001.

Dan X. U. Ruilin. H. U. Wei. G. A. O. & Jiaguo X. I. A. (2015). Effects of laminated structure on hydraulic fracture propagation in shale. *Petroleum Exploration and Development*. 42(4). 573-579.

Fujimoto Z. Tateno. H. & Hirabayashi J. (2014). Lectin structures: classification based on the 3-D structures. *Lectins: Methods and Protocols*. 579-606.

Gargano M. L. van Griensven, L. J. Isikhuemhen O. S. Lindequist U. Venturella G. Wasser S. P. & Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* .151(3). 548-565.

Goldstein I. J. Winter H. C. & Poretz, R. D. (1997). Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. In *New comprehensive biochemistry* (Vol. 29. pp. 403-474). Elsevier.

Gorelik E. Galili, U. & Raz A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 20, 245-277.

Halos L. Jamal T. Maillard R. Girard B. Guillot J. Chomel B. & Boulouis H. J. (2004). Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of Bartonella spp. infecting wild and domestic ruminants. *Applied and environmental microbiology*. 70(10). 6302-6305.

Hassan M. A. A. Rouf R. Tiralongo E. May T. W. & Tiralongo J. (2015). Mushroom lectins: specificity. Structure and bioactivity relevant to human disease. *International journal of molecular sciences* .16(4). 7802-7838.

Hassan M. Shahzadi S. Ransom R. F. & Kloczkowski A. (2023). Nature's own pharmacy: mushroom-based chemical scaffolds and their therapeutic implications. *International journal of molecular sciences* 24(21). 15596.

Références bibliographiques

- Kebaili F.F. & Nouadri T. (2022). *Bioévaluation du champignon sauvage Ganoderma lucidum d'Algérie* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- Kobayashi Y. & Kawagishi H. (2014). Fungal lectins: a growing family. *Lectins: Methods and Protocols*. 15-38.
- Konska G. Guerry M. Caldefie-Chezet F. De Latour M. & Guillot J. (2006). Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin. *Oncology reports*. 15(2). 305-310.
- Kour H. Kour D. Kour S. Singh S. Hashmi S. A. J. Yadav A. N. & Ahluwalia A. S. (2022). Bioactive compounds from mushrooms: Emerging bioresources of food and nutraceuticals. *Food Bioscience*. 50. 102124.
- Lam S. K. & Ng T. B. (2011). First report of an anti-tumor, anti-fungal, anti-yeast and anti-bacterial hemolysin from Albizia lebeck seeds. *Phytomedicine* . 18(7). 601-608.
- Le Quéré C. Andrew R. M. Canadell J. G. Sitch, S. Korsbakken, J. I. Peters G. P. & Zaehle S. (2016). Global carbon budget 2016. *Earth System Science Data*. 8(2) .605-649
- Lichtenstein R. G. & Rabinovich, G. A. (2013). Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death & Differentiation*. 20(8).976-986.
- Liu Y. H. D'Ambrosio M. Liao T. D. Peng H. Rhaleb N. E. Sharma, U. & Carretero O. A. (2009). N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* .296(2). H404-H412.
- Liuzzi G. Villanueva G. L. Viscardy S. Mège D. Crismani M. M. Aoki S. & Vandaele A. C. (2021). Probing the atmospheric Cl isotopic ratio on Mars: Implications for planetary evolution and atmospheric chemistry. *Geophysical Research Letters*. 48(9). e2021GL092650.
- Mallick I. Bhattacharyya C. Mukherji S. Dey D. Sarkar S. C. Mukhopadhyay U. K. & Ghosh A. (2018). Effective rhizoinoculation and biofilm formation by arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: a step towards arsenic rhizoremediation. *Science of the Total Environment*. 610. 1239-1250.

Références bibliographiques

- Onifade O. Shamsuddin N. Teck Ching Lai D. Jamil H. & Gödeke S. H. (2023). Importance of baseline assessments: monitoring of Brunei River's water quality. *H2Open Journal*. 6(4). 518-534.
- Petrović J. Serpico P. D. & Zaharijas G. (2015). Millisecond pulsars and the Galactic Center gamma-ray excess: the importance of luminosity function and secondary emission. *Journal of Cosmology and Astroparticle Physics*. 2015(02). 023.
- Ripert M. Farre C. & Chaix C. (2013). Selective functionalization of Au electrodes by electrochemical activation of the “click” reaction catalyst. *Electrochimica Acta*, 91 82-89.
- Sagar L. Singh S. Sharma A. Maitra S. Attri M. Sahoo R. K. & Roy S. (2023). Role of soil microbes against abiotic stresses induced oxidative stresses in plants. In *Microbial Symbionts and Plant Health: Trends and Applications for Changing Climate* (pp. 149-177). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Sano K. & Ogawa H. (2014). Hemagglutination (inhibition) assay. *Lectins: Methods and protocols* 47-52.
- Santos D. A. F. (2018). *Meloidogyne luci: characterization of a tropical root-knot nematode species in Portugal* (Master's thesis).
- Sharon N. & Lis H. (2003). *Lectins*. Springer Science & Business Media.
- Sharon N. & Lis H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14(11), 53R-62R.
- Singh A. P. Tintelott. M. Moussavi E. Ingebrandt S. Leupers R. Vu X. T. & Pachauri V. (2023). Logic operations in fluidics as foundation for embedded biohybrid computation. *Device* 1(6).
- Song R. Q. Wang F. Ji R. Q. & Qi J. Y. (2007). Effect of ectomycorrhizal fungi on the seedlings growth of Korea spruce. *Wei Sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*, 47(6) 1091-1094.
- Sychrová H. Tichà M. & Kocourek J. (1985). Studies on lectins. LIX. Isolation and properties of lectins from fruiting bodies of *Xerocomus chrysenteron* and *Lactarius lignyotus*. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 63(7) 700-704.

Références bibliographiques

- Tung E. K. K. Mak C. K. M. Fatima S. Lo R. C. L. Zhao H. Zhang C. & Ng I. O. L. (2011). Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels in human hepatocellular carcinoma. *Liver international* .31(10).1494-1504 .
- Uhart M. Sirand-Pugnet P. & Labarère J. (2007). Evolution of mitochondrial SSU-rDNA variable domain sequences and rRNA secondary structures, and phylogeny of the *Agrocybe aegerita* multispecies complex. *Research in Microbiology*. 158(3) .203-212.
- Uhart M. Sirand-Pugnet P. & Labarère J. (2007). Evolution of mitochondrial SSU-rDNA variable domain sequences and rRNA secondary structures, and phylogeny of the *Agrocybe aegerita* multispecies complex. *Research in Microbiology*. 158(3). 203-212.
- Valkenburg P. M. Schouten A. P. & Peter J. (2005). Adolescents' identity experiments on the Internet. *New media & society*. 7(3). 383-402.
- Varki A. (2009). Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconjugate journal*. 26. 231-245.
- Vizzini A. Angelini C. & Ercole E. (2014). Le sezioni *Velatae* e *Aporus* di *Agrocybe* sottogenere *Aporus*: Rivalutazione del genere *Cyclocybe* Velen. ed un nuova specie. *Bollettino della associazione micologica ed ecologica Romana*. 92. 21-38.
- Zhou Y. Zhang Y. Lian X. Li F. Wang C. Zhu F. & Chen Y. (2022). Therapeutic target database update 2022: facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents. *Nucleic acids research* 50(D1) D1398-D1407.

Annexes

Annexes

Annexe 1

- Préparation des tampons

Composition	PM (g/mol)	Molarité mM	PBS-EDTA Disodique pH 7,4 10X	PBS 1X (10 mM) pH 8,4		
				Galactose 0,4 M	NaCl 1 M	
Na ₂ HPO ₄	141.96	10	14,196 g.	1,4196 g		
KH ₂ PO ₄	136.086	2	2,7 g	0,27 g		
KCl		2,7	2 g	29,22 g		
NaCl	58.44	137	80 g	29,22 g	58,44 g	/
EDTA-Na ₂	372.24	2	7.44	/	/	/
MilliQ	/	/	1000 ml			

- Préparation des solutions tampons à différents pH (2-10) avec 20 mM de concentration par la titration

Tampon	PH	Molarité	Composition	Quantité	Volume
Glycine- HCl	2	20 mM	Glycine	1.5014 g	1000 mL
			HCL	Quelques gouttes	
Citrate- phosphate	4-6		Acide citrique	3.842 g	
			Phosphate disodique	2.8388 g	
Tris- HCl	9		Tris	2,422 g	
			HCL	Quelques gouttes	
Glycine- NaOH	10		Glycine	1.5014 g	
			NaOH	0.8 g	

Annexes

Tableau : précipitation avec sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ des protéines à 0 °C (Dawson, *et al*, 1969).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

L'activation de la membrane de dialyse

Généralement, il est nécessaire de préparer les membranes de dialyse avant leur utilisation afin d'assurer une dialyse efficace. Veuillez vérifier auprès du fabricant les protocoles spécifiques pour cette membrane C1. Ce qui suit présente une méthode générale de préparation des membranes, dont la plupart sont Cellulose

-Préparation des solutions tampons à différents pH (2-9) avec 20 mM de concentration par titration

Matériaux

Membrane de dialyse de coupure moléculaire désirée 12 kDa

- Bicarbonate de sodium (NaCO_3) de 10 mM.
- Une solution de 10 mM d'EDTA disodique (Na_2EDTA), pH 8.0.
- Ethanol 20% à 50% (v/v).

Annexes

- La membrane de dialyse doit être retournée et coupée en longueurs utilisables en portant des gants afin de pouvoir la manipuler, car elle est sensible à des microorganismes cellulolytiques. On peut trouver la membrane sous la forme de feuilles ou de tubes préformés.

Faire bouillir plusieurs minutes en 10 mM Na₂EDTA. Répéter. (L'ébullition accélère le processus de traitement, mais n'est pas nécessaire. Un trempage de 30 minutes avec une certaine agitation peut remplacer l'étape d'ébullition). 4- Laver plusieurs fois dans de l'eau distillée. 5- Conserver à 4 °C dans 20% à 50% d'éthanol pour prévenir la croissance des micro-organismes cellulolytiques. Alternativement, des agents bactériostatiques (p. ex., azide de sodium ou cacodylate de sodium) peuvent être utilisés pour l'entreposage ; cependant, l'éthanol est préféré pour la facilité et la commodité.

Annexes

Annexe 2

A- Préparation du réactif de Bradford :

1- Dissoudre 100 mg de Bleu de Coomassie R-250 dans 50 mL d'éthanol 96 ° ou Absolu ensuite rajoute 100 mL d'acide ortho-phosphorique ou phosphorique 85%.

2- Mets sous agitation après complète avec de l'eau distillée jusqu'à ou le volume final à atteindre 1 L.

3- Après l'agitation, filtre le mélange 3 fois par papier Whatman N° 3 ou 1 pour éliminer les l'excès et les partis non solubiliser de bleu de Coomassie.

4- Conserve le réactif dans le frigo sous obscurité à 4 °C.

B- Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA

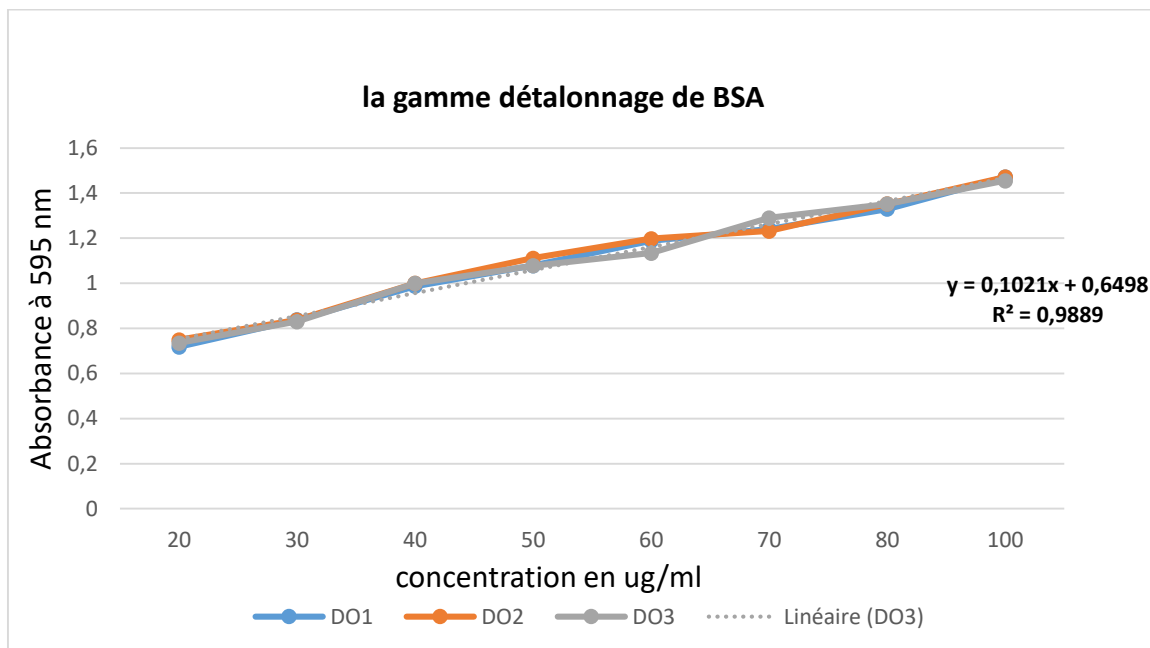
Utiliser une solution mère de BSA (sigma) à une concentration de 1 mg/mL dans Tampon PBS 10 mM pH 7,4

Les dilutions : 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 100 µg/mL chaque dilution se répète trois fois

Dilution (µg/mL)	20	30	40	50	60	70	80	100
BSA (1 mg/mL) (µL)	20	30	40	50	60	70	80	100
E. Distillée (µL)	80	70	60	50	40	30	20	0
Réactif de Bradford (mL)	4							

Il est nécessaire de traiter chaque cent microlitre des échantillons avec un volume de 4 mL du réactif de Bradford conformément aux instructions du protocole. Après une incubation de 5 à 10 minutes dans l'obscurité, les tubes contenant les mélanges réactionnels ont été analysés avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-visible à une longueur d'onde de λ 595 nm.

Annexes



Annexes

Annexe 3 : Electrophorèse

-Préparation de Tris-HCl

Molarité	PH	Quantité
1,5M	6,8	18,12g
0,5M		6,657g

- Electrophorèse SDS-PAGE et PAGE

-Laemmli buffer ou Tampon de dénaturation 4X SDS PAGE	-Tampon de Laemmli 4X pour électrophorèse PAGE
<ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 1M ou 0,5M pH 6,8: 500 µL - SDS 10%: 800 µL - Bleu de bromophenol 0.15% : 800 µL - B- mercaptoethanol : 200 µL - Glycérol 100% : 400 µL - MilliQ : 300 µL 	<ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 1M ou 0,5M pH 6,8: 500 µL - B- mercaptoethanol : 200 µL - Glycérol 100%: 400 µL - MilliQ : 300 µL
<ul style="list-style-type: none"> -Tampon de migration Tris-Glycine 5X pH 8,3 pour SDS-PAGE - 25 mM Tris: 7,5 g - 250 mM Glycine: 47 g - SDS 0,1%: 10 g - MilliQ 1L 	<ul style="list-style-type: none"> -Tampon de migration Tris-Glycine 5X pH 8.3 pour PAGE - 25 mM Tris: 7,5g - 250 mM Glycine: 47g - MilliQ: 1L
<ul style="list-style-type: none"> -La Solution de coloration 1L - Ethanol ou Méthanol : 250 mL - Bleu de Coomassie R 250: 1,5 g - Acide acétique glacial 100 mL - MilliQ : 650 mL 	<ul style="list-style-type: none"> La solution de décoloration : - Ethanol ou Méthanol : 250 mL - Acide acétique glacial : 100 mL - MilliQ : 650 mL - TEMED : 5 µL

Annexes

-Profils de la chromatographie d'affinité sur le sepharose 2B

Etape	Fraction	Volume (ml)	Abs 280 nm
Fractions non absorbées	1	2	0,634
	2	4	0,555
	3	6	0,364
	4	8	1,81
	5	10	1,26
	6	12	0,88
	7	14	0,633
	8	16	0,354
	9	18	0,251
	10	20	0,2
Fractions éluées par PBSE 1X (pH 8,4 0,4 M Galactose)	11	22	0,184
	12	24	0,164
	13	26	1,139
	14	28	1,116
	15	30	0,103
	16	32	0,289
	17	34	0,144
	18	36	0,093
	19	38	0,069
	20	40	0,065
	21	42	0,05
	22	44	0,045
	23	46	0,03

Résumé

Dans la présente étude, une nouvelle galectine appelée *Cyclocybe cylindracea* lectin (CCL) a été extraite des corps fruitiers du champignon populaire noir sauvage *C. cylindracea* d'Algérie. La protéine a été isolée en utilisant la sepharose 2B comme matrice de chromatographie d'affinité et le galactose comme éluant. La galectine purifiée était composée de deux sous-unités de poids moléculaire supérieur à 17 kDa, et une structure homodémique caractérisée par un PM supérieur à 35 kDa.

Leur activité agglutinante HA a été inhibée par le galactose et ses dérivés. Le lactose a montré la plus grande affinité, avec une concentration inhibitrice minimale de 0.019 mM. Le CCL était sensible aux conditions de pH extrêmes, et sa fonction de liaison diminuait lorsqu'il était incubé avec 10 mM d'EDTA, et il pouvait être restauré par des cations métalliques tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , et Zn^{2+} .

Nous avons évalué le potentiel antiinflammatoire de l'extrait, on a constaté une activité non remarquable par le teste utilisée dans l'évaluation de l'activité antiinflammatoire in vivo contre l'œdème induite par la caraghénane.

Mots clés : *Cyclocybe cylindracea* lectine, activité agglutinante, le potentiel antiinflammatoire, caraghénane, œdème.

Abstract

In the present study, a novel galectin called *Cyclocybe cylindracea* lectin (CCL) has extracted from the fruit bodies of the popular wild black fungus *C. cylindracea* from Algeria. The protein was isolated using Sepharose 2B as the affinity chromatography matrix and galactose as the eluent. The purified galectin was composed of two subunits with a molecular weight greater than 17 kDa, and a homodimeric structure characterized by a MW greater than 35 kDa.

Its agglutinant activity has impeded by galactose and its derivatives. Lactose showed the highest affinity, with a minimal inhibitory concentration of 0.019 mM. CCL was sensitive to extreme pH conditions, and its binding function decreased when incubated with 10 mM EDTA, and it could be restored by metallic cations such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Zn^{2+} , which is considered as metalloprotein.

We evaluated the anti-inflammatory potential of the extracts, not a remarkable activity has observed by the test used in the evaluation of anti-inflammatory activity *in vivo* against carrageenan-induced oedma.

Key words: Mushrooms *Cyclocybe cylindracea*, *Cyclocybe cylindracea* lectin, agglutinating activity, anti-inflammatory potential, carrageenan.

المخلص

في هذه الدراسة، تم استخلاص جاليكتين جديد يسمى (CCL) *Cyclocybe cylindracea lectin* من أجسام الفاكهة للفطر الأسود البري *C. cylindracea* من الجزائر. تم عزل البروتين باستخدام Sepharose 2B كمصفوفة كروماتوغرافيا الجذب *Affinité* والغالكتوز باعتباره فاصل للبروتين. يتكون الجاليكتين المنقى من وحدتين فرعيتين بوزن جزيئي أكبر من 17 كيلو دالتون لكل تحت وحدة، وبنية ثنائية متجانسة تتميز بوزن جزيئي أكبر من 35 كيلو دالتون.

تم إعاقة نشاطه المتراس بواسطة الغالكتوز ومشتقاته. أظهر اللاكتوز أعلى درجة تثبيط وجذب *Affinité*، مع تركيز مثبت أدنى قدره 0.019 ملي مولار. كان CCL حساساً لظروف الأس الهيدروجيني القوي، وتناقصت وظيفة الارتباط عند احتضانه بـ 10 ملي مولار من ملح EDTA، ويمكن استعادته بواسطة الكاتيونات المعدنية مثل Ca^{2+} ، و Mg^{2+} ، و Zn^{2+} ، ويعتبر بروتيناً متطلب للمعادن من أجل تأمين نشاطه.

قمنا بتقييم القدرة المضادة للالتهابات للمستخلصات، ولم يلاحظ أي نشاط ملحوظ في الاختبار المستخدم في تقييم النشاط المضاد للالتهابات في الجسم الحي ضد الودمة الناجمة عن الكاراجينين.

كلمات مفتاحية: الفطر *Cyclocybe cylindracea lectin*، *Cyclocybe cylindracea*، نشاط ترانس، قدرة مضادة للالتهابات، كاراجينين، انتفاخ.

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BOUAFIA Meissa BOUZIDI Zineb
Extraction et purification d'un lectine du champignon <i>Agrocybe cylindracea</i> et évaluation de leur activité anti-inflammatoire	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie appliquée	
<p>Dans la présente étude, une nouvelle galectine appelée <i>Cyclocybe cylindracea</i> lectin (CCL) a été extraite des corps fruitiers du champignon populaire noir sauvage <i>C. cylindracea</i> d'Algérie. La protéine a été isolée en utilisant la sepharose 2B comme matrice de chromatographie d'affinité et le galactose comme éluant. La galectine purifiée était composée de deux sous-unités de poids moléculaire supérieur à 17 kDa, et une structure homodémérique caractérise par un PM supérieur à 35 kDa.</p> <p>Leur activité agglutinante HA a été inhibée par le galactose et ses dérivés. Le lactose a montré la plus grande affinité, avec une concentration inhibitrice minimale de 0.019 mM. La CCL était sensible aux conditions de pH extrêmes, et sa fonction de liaison diminuait lorsqu'il était incubé avec 10 mM d'EDTA, et elle pouvait être restaurée par des cations métalliques tels que Ca²⁺, Mg²⁺ et Zn²⁺.</p> <p>Nous avons évalué le potentiel antiinflammatoire de l'extraits, on a constaté une activité non remarquable par le teste utilisée dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> contre l'œdème induite par la caraghénane.</p> <p>Mots clés : <i>Cyclocybe cylindracea</i> lectine, activité agglutinante, le potentiel anti-inflammatoire, caraghénane, œdème</p>	
Mots-clefs : Champignon <i>Cyclocybe cylindracea</i> , lectin CCL, activité agglutinante, potentiel anti-inflammatoire, carraghénane.	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Génie microbiologique et applications (LGMA-U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<p>Président du jury : KLIBET F. (MCB) - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p>Encadrant : TOUMI M.E.S. (MCB) - UFM Constantine 1).</p> <p>Examinatrice : AYECHÉ A. (MAB) - UFM Constantine 1).</p>	

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BOUAFIA Meissa BOUZIDI Zineb
Extraction et purification d'un lectine du champignon <i>Agrocybe cylindracea</i> et évaluation de leur activité anti-inflammatoire	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie appliquée	
<p>Dans la présente étude, une nouvelle galectine appelée <i>Cyclocybe cylindracea</i> lectin (CCL) a été extraite des corps fruitiers du champignon populaire noir sauvage <i>C. cylindracea</i> d'Algérie. La protéine a été isolée en utilisant la sepharose 2B comme matrice de chromatographie d'affinité et le galactose comme éluant. La galectine purifiée était composée de deux sous-unités de poids moléculaire supérieur à 17 kDa, et une structure homodémérique caractérise par un PM supérieur à 35 kDa.</p> <p>Leur activité agglutinante HA a été inhibée par le galactose et ses dérivés. Le lactose a montré la plus grande affinité, avec une concentration inhibitrice minimale de 0.019 mM. La CCL était sensible aux conditions de pH extrêmes, et sa fonction de liaison diminuait lorsqu'il était incubé avec 10 mM d'EDTA, et il pouvait être restauré par des cations métalliques tels que Ca²⁺, Mg²⁺ et Zn²⁺.</p> <p>Nous avons évalué le potentiel antiinflammatoire de l'extraits, on a constaté une activité non remarquable par le teste utilisée dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> contre l'œdème induite par la caraghénane.</p> <p>Mots clés : <i>Cyclocybe cylindracea</i> lectine, activité agglutinante, le potentiel antiinflammatoire, caraghénane, œdème</p>	
Mots-clefs : Champignon <i>Cyclocybe cylindracea</i> , lectin CCL, activité agglutinante, potentiel anti-inflammatoire, carraghénane.	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Génie microbiologique et applications (LGMA-U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<p>Président du jury : KLIBET F. (MCB) - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p>Encadrant : TOUMI M.E.S. (MCB) - UFM Constantine 1).</p> <p>Examinatrice: AYECHÉ A. (MAB) - UFM Constantine 1).</p>	