



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 des frères mentouri

جامعة قسنطينة ١ الإخوة منتوري

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

*L'extraction des lectines à partir d'une champignons*

*Tricholoma sp*

Présenté et soutenu par : *MIHOUB Oumeima et BELKEBCHE Hadil*

*Le:04/06/2024*

Jury d'évaluation :

- |                      |                     |                               |
|----------------------|---------------------|-------------------------------|
| -Président du jury : | NOUADRI Tahar       | MCA –UFM Constantine 1        |
| -Encadreur:          | NECIB Youcef        | Professeur- UFM Constantine 1 |
| -Examineur:          | TOUMI Med Es-Seddik | MCB-UFM Constantine1          |

Année universitaire 2023 / 2024



## *Remerciement*

Tout d'abord, nous remercions Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur Monsieur le chef département de biochimie à Université des Frères Mentouri Constantine 1, Le Pr. NECIB Youcef, pour sa grande rigueur scientifique, ses conseils fructueux, pour l'accueil au sein de son équipe et pour sa patience afin d'aboutir à ce travail.

Un grand et respectueux merci à Mr. Toumi Mouhammed Esseddik, partagé avec nous son expérience, son aide et les précieuses informations qu'il nous a fournies, que Dieu le récompense de tout le meilleur.

Nous remercions Mr. NOUADRI Tahar d'avoir assisté aujourd'hui pour discuter notre mémoire nous sommes honorés de les avoir.

Nous remercions chaleureusement les personnes qui aident-nous directement ou indirectement à mener à bien ce travail.

Merci beaucoup à nos parents pour leur soutien et leur amour illimité tout au long de notre parcours académique.



## *Dédicace*

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie

A celui qui m'a fait une femme, ma source de vie ,d'amour , à mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, à mon père, et sa femme.

A mon paradis, à ma défunte fleur, qui a toujours souhaité me voir un jour comme celui-ci, à ma mère.

A mon soutien dans ce monde , à mon fiancé.

A mes chères frères et leurs femmes et enfants (Assil, Tasnim, yazen, mouhamed baraa).

A mes amies, ma famille et tous ceux qui m'ont soutenu , que dieu vous récompense .

A mon binôme oumeima qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail, je te dis merci.

***HADIL .***



## *Dédicace*

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU pour nous avoir donné la santé, la force, la patience et le courage pour accomplir ce travail.

Je dédie ce travail :

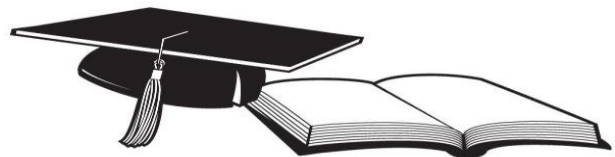
À mon cher papa mon soutien Boubaker, qui a été toujours ma source de bonheur, de force et de courage. Tu m'as donné ta vie pour ma réussite et mon bien être.

Tous mes remerciements et mon appréciation à ma mère, ma sœur et ma meilleure amie samia, qui ne m'a pas donné naissance, mais qui a plutôt donné naissance à la vie pour moi.

A ma famille et ma deuxième famille benguesmia et mes chères amis qui m'a aidé dans ce travail je te dit merci .

A Mon binôme Hadil qui a partagé ce travail avec moi, C'est un honneur pour moi et je lui souhaite plein succès .

***OUMEIMA .***



## Résumé :

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaire, d'origine non immunitaire. Elles sont souvent multivalentes et possèdent la capacité bien connue d'agglutiner les érythrocytes.

Dans ce travail on a choisi le champignon de *Tricholoma sp* comme source pour l'extraction des lectines après macération de la poudre fongique par un tampon PBS.

L'étude vise à identifier les lectines du champignon *Tricholoma Sp* en utilisant le test d'agglutination avec le sang de lapin (3%) qui est une étape essentielle qui indique la présence des lectines. Plusieurs tests sont utilisés comme les effets du pH, la température, des métaux et les interactions avec les sucres.

L'activité agglutinante de l'extrait de *Tricholoma sp* a montré une activité hémagglutinante avec les érythrocytes du lapin.

Le test d'inhibition par différents glucides a montré une affinité avec quatre sucres et avec un glycoprotéine.

Le traitement thermique de l'extrait de *Tricholoma sp* a stimulé l'activité agglutinante de l'extrait à (T=40°C), puis elle a disparu totalement à (60°C, 80°C, 100 °C).

La lectine de *Tricholoma sp* n'a aucune activité lectinique dans les milieux très acide et très basique. Mais elle est maximale dans pH 7 (pH optimal).

Après l'application d'effet des métaux ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) par test hémagglutination indique que la lectine est métalloprotéine.

L'utilisation de l'extraction par filtration sur colonne de DEAE-Séphacyl donne 4 pics.

**Mots clés :** Lectine, Hémagglutination, inhibition, sucres, protéines, Extraction, affinité.

## ملخص

اللكتين هي بروتينات موجودة في كل مكان او بروتينات سكرية ذات اصل غير مناعي، وهي غالبا ما تكون متعددة التكافؤ ولها قدرة معروفة على ترصص كريات الدم الحمراء.

في هذا العمل اخترنا *Tricholoma sp* كمصدر لاستخراج اللكتينات بعد نفع المسحوق الفطري باستخدام محلول PBS . تهدف الدراسة الى التعرف على لكتينات فطر *Tricholoma sp* باستخدام اختبار التراص مع دم الارانب (3%) وهي خطوة اساسية للدلالة على وجود لكتينات. وقد تم استخدام عدة اختبارات مثل تأثير الرقم الهيدروجيني. درجة الحرارة المعادن. والتفاعلات مع السكريات.

اظهر نشاط التراص لمستخلص *Tricholoma sp* نشاط التراص الدموي مع كريات الدم الحمراء في الارانب. اظهر اختبار التثبيط بواسطة كربوهيدرات مختلفة وجود تقارب مع اربعة سكريات و مع بروتين سكري. حفزت المعالجة الحرارية لمستخلص *Tricholoma sp* نشاط التراص للمستخلص عند (T=40°C) ثم اختلفت تماما عند (60,80,100°C)

ليس لدى لكتين *Tricholoma sp* اي نشاط منشط في الوسائط الحمضية جدا و الاساسية جدا و لكن الحد الاقصى في الرقم الهيدروجيني 7 (الرقم الهيدروجيني الامثل).

بعد تطبيق تأثير المعادن (Cu Cl<sub>2</sub>, Ca Cl<sub>2</sub> , Mn Cl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>) عن طريق اختبار التراص الدموي تبين ان اللكتين عبارة عن بروتين معدني.

استخدام الاستخراج عن طريق الترشيح على عمود DEAE-Séphacyl يعطي 4 ذروات.

**الكلمات المفتاحية:** لكتين، ترصص، تثبيط، سكريات، بروتينات، مستخلص، تقارب .

## **Abstract:**

Lectins are ubiquitous proteins or glycoproteins of non-immune origin. They are often multivalent and have the well-known capacity to agglutinate erythrocytes.

In this work we chose the *Tricholoma sp* fungus as a source for the extraction of lectins after maceration of the fungal powder with a PBS buffer.

The study aims to identify the lectins of the *Tricholoma Sp* fungus using the agglutination test with rabbit blood (4%) which is an essential step which indicates the presence of lectins. Several tests are used such as the effects of pH, the temperature, metals and interactions with sugars.

The agglutinating activity of the *Tricholoma sp* extract showed hemagglutinating activity with rabbit erythrocytes.

The inhibition test by different carbohydrates showed an affinity with four sugars and with a glycoprotein.

The heat treatment of the *Tricholoma sp* extract stimulated the agglutinative activity of the extract at (T=40°C), then it completely disappeared at (60°, 80°, 100°).

*Tricholoma sp* lectin has no lectinic activity in very acidic and very basic media. But it is maximum in pH 7 (optimal pH).

After applying the effect of metals (Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) by hemagglutination test indicates that the lectin is a metalloprotein.

The use of extraction by filtration on a DEAE-Sephacyl column gives 4 peaks.

**Keywords:** Lectine, Hemagglutination, Inhibition, sugars, proteins, Extract, affinity .



## Liste des abréviations

**PBS** : phosphate buffered saline

**GR** : Globule rouge

**pH** : potentiel Hydro isoélectrique

**HA** : hémagglutination

**AMS** : sulfate d'ammonium

**DEAE-Sephacyl** : Diethylaminoethyl-Sephacyl gel

**BSA**: Bovine serum albumin

**EDTA**: éthylénediaminetétraacétique

**ABS**: absorbance

**H**: heure

**µL**: microliter

**mM**: millimolaire

**Mg/ml**: Mlligramme/ Mililitre

**nm**: nanomètre

**UHA**: member d'unité hémagglutinante

**KDa** : kilo Dalton

**VIH** :Virus de l'immunodéficience humaine

**Ac**:Anticorp

**Rpm**:Rotation Per Minute

## Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
01	Histoire des lectines <b>(Renato et al., 1991).</b>	04
02	classification de champignons <i>Tricholoma sp.</i> <b>(Christensen M, Heilmann-Clausen J. 2013.)</b>	16
03	Résultat de test d'inhibition d'extrait de <i>Tricholoma sp</i> par des sucres et un glycoprotéine.	24
04	Résultats d'effet de température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait brut.	26
05	L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait <i>Tricholoma sp.</i>	27
06	L'effet des métaux sur l'activité agglutinante de l'extrait Traité par EDTA .	28
07	Résultats de la séparation des lectines du <i>Tricholoma Sp</i> obtenues après chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl.	28
08	Purification de la lectine a partir <i>Tricholoma sp.</i>	31

## Liste des figures

Figure	Légende	Page
<b>01</b>	Représentation graphique d'un monomère de concanavale A de <i>Canavalia ensiformis</i> en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN) <b>(Lenka et al., 2006).</b>	05
<b>02</b>	illustre un schéma représentant un trimère d'hémagglutinine du virus de la grippe en interaction avec l'acide sialique <b>(Lenka et al., 2006).</b>	06
<b>03</b>	schéma de différents types de fimbriae chez <i>Escherichia coli</i> <b>( Sharon N. et Lis H., 1998) .</b>	06
<b>04</b>	Structure tridimensionnelle de la concanavale A. Une lectine d'origine légumineuse de <i>Canavalia ensiformis</i> . Possède une structure simple qui comprend quatre S/U symétriques. Chaque monomère, comporte un site CDR spécifique du mannose ou du glucose et un site pour la fixation des oligoéléments manganèse et calcium <b>(source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., et al., 1999).</b>	07
<b>05</b>	Familles de lectines extracellulaires et membranaires impliquées dans l'interface avec les cellules chez les mammifères. Les CRDs des différentes familles sont représentés par CL pour les C-type lectines, GL pour les galectines et IL pour les I-type lectine <b>(Bulteau, 2020).</b>	08
<b>06</b>	Représentation graphique de Fucose dans le site de reconnaissance de la lectine de bactérie " <i>Pseudomonas aeruginosa</i> " <b>(CERMAV ,(janvier 2005).</b>	10
<b>07</b>	Représentation schématique de la formation d'un complexe agglutinat à partir d'interaction des lectines avec les antigènes spécifiques des cellules (hemagglutination des érythrocytes) <b>(Santos et al., 2014).</b>	11

<b>08</b>	champignons <i>Tricholoma sp</i> ( Djebel El Ouahch - constantine ).	18
<b>09</b>	Test d'HA des érythrocytes fixées, avant et après la centrifugation (photo personnelle prise le 13/02/2024 ).	19
<b>10</b>	test d'héماغglutination, en présence d'un témoin négatif(PBS) avant et après centrifugation ( photo personnelle prise le 13/02/2024).	23
<b>11</b>	Test d'inhibition de l'activité héماغglutinante par les sucres et les glycoprotéines (photo personnelle prise le 19/02/2024 ).	24
<b>12</b>	L'effet de la température sur l'activité héماغglutinante de l'extrait <i>Tricholoma sp</i> .	26
<b>13</b>	L'effet du pH sur l'activité héماغglutinante de l'extrait <i>Tricholoma</i> .	27
<b>14</b>	L'effet des métaux sur l'activité agglutinante d'extrait <i>Tricholoma sp</i> .	27
<b>15</b>	La courbe d'Absorbance de l'extrait du <i>Tricholoma sp</i> après leur passage à travers la colonne de DEAE-Sephacyl.	30

# Table de métiers

<i>Remerciement</i> .....	
<i>Dédicace</i> .....	
<i>Dédicace</i> .....	ه
<b>Résumé :</b> .....	و
<b>Liste des abréviations</b> .....	ط
<b>Liste des tableaux</b> .....	
<b>Liste des figures</b> .....	ك
<b>Table de métiers</b> .....	م
<b>Introduction :</b> .....	1
<b>1. généralités sur les lectines :</b> .....	3
<b>1.1. Définition des lectines :</b> .....	3
<b>1.2. Historique des lectines :</b> .....	3
<b>1.3. structure des lectines :</b> .....	5
<b>1.3.1. structure simple :</b> .....	5
<b>1.3.2. structure mosaïque :</b> .....	5
<b>1.3.3. Assemblages macromoléculaires :</b> .....	6
<b>1.4. La structure tridimensionnelle et Classification des lectines :</b> .....	7
<b>1.4.1. structure tridimensionnelle des lectines :</b> .....	7
<b>1.4.2. Classification des lectines :</b> .....	7
<b>1.4.2.1. Chez les animaux:</b> .....	8
<b>1.4.1.1.Les lectines extracellulaires :</b> .....	8
<b>1.5.1.2.Les lectines intracellulaires:</b> .....	8
<b>1.5.2.2. Chez les végétaux:</b> .....	8
<b>1.5.2.2.1.Les mérolectines :</b> .....	9
<b>1.5.2.2.2. Les hololectines:</b> .....	9
<b>1.5.2.2.3.Les chimérolectines:</b> .....	9
<b>1.5.2.2.4. Les superlectines:</b> .....	9
<b>1.5. Sites de reconnaissance des lectines :</b> .....	9
<b>1.6.Propriétés des lectines:</b> .....	10
<b>1.6.1. Interaction lectine-glucide:</b> .....	10
<b>1.6.2. Activité agglutinante :</b> .....	11
<b>1.6.3. Activité mitogène:</b> .....	11
<b>1.6.4. Propriété antibactérienne:</b> .....	12
<b>1.6.5. Propriété antivirale :</b> .....	12
<b>1.6.6. Propriété antifongique:</b> .....	12

1.7. Les fonctions biologique des lectines.....	13
1.7.1. chez les végétaux :.....	13
1.7.2. Chez l'homme :.....	13
1.8.3. Traitement et diagnostic de cancer .....	15
1. <i>Les Tricholoma sp</i> :.....	16
1. Définition .....	16
2. Historique et l'origine .....	16
3. Classification :.....	16
1. Matériel .....	18
1.1. Matériel fongique :.....	18
2. Méthodes :.....	18
2.1. Extraction et purification de la lectine du champignon <i>tricholoma sp</i> :.....	18
2.1.1. Extraction de protéines :.....	18
2.1.2. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA) :.....	19
2.1.3. Purification :.....	19
2.1.3.1. Test de précipitation :.....	19
2.1.3.2. Dialyse :.....	19
2.1.3.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl :.....	20
3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée :.....	20
3.1. Test d'HA et d'inhibition :.....	20
3.2. Dosage des protéines :.....	20
3.3. Evaluation de la stabilité protéique :.....	21
3.3.1. L'effet de la température sur l'activité agglutinante :.....	21
3.3.2. L'effet du pH sur l'activité agglutinante :.....	21
3.3.3. L'effet des métaux sur l'activité agglutinante :.....	21
1.Etude phytochimique:.....	23
1.1. Test d'hémagglutination:.....	23
2.Caractéristiques d'extrait de lectine du <i>Tricholoma sp</i> :.....	23
2.1. Test d'inhibition de l'activité hémagglutinate :.....	23
2.2. L'effet de la température: .....	25
2.3.L'effet du pH:.....	26
2.4.L'effet des métaux :.....	27
2.5. La séparation des lectines par la chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl:.....	27
2.6.Purification partielle de la lectine:.....	30
2.7.Dosage des protéines :.....	31

<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	
<b>Annexes</b> .....	



# **Introduction**



## Introduction

---

### Introduction :

Les lectines sont des protéines qui se fixent de manière spécifique et réversible à des glucides particuliers, jouant un rôle essentiel dans divers processus biologiques tels que la reconnaissance cellulaire, notamment dans les réponses immunitaires et les infections (**Amit, 2016**).

Les lectines ont été redéfinies par **Peumans et Van Damme** en **1995** comme étant des protéines possédant au moins un domaine non catalytique qui se lie de manière réversible à un mono- ou oligosaccharide spécifique. Cependant, selon **Cummings (1997)**, les protéines ayant une activité enzymatique liée aux hydrates de carbone ne peuvent pas être considérées comme des lectines. Grâce à leurs propriétés chimiques, les lectines sont devenues un outil précieux dans plusieurs domaines de la recherche biologique, notamment :

- Immunologie.
- Biologie cellulaire.
- Étude de la structure des membranes.
- Recherche sur le cancer Génie génétique. (**Lis et Sharon, 1994**).

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes (**Sharon and Lis, 2004**). Elles agissent comme des molécules de défense dans les plantes en reconnaissant des organismes pathogènes (**Hyun-Ju.H et al., 2020**).

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

Nous avons réalisé cette étude pour découvrir la présence de lectines dans la poudre fongique de *Tricholoma sp.*

Toutes les extractions de lectine sont réalisées en milieu aqueux (tampon PBS).

Notre travail se répartit en :

- Une étude bibliographique sur les lectines et les champignons de *Tricholoma sp.*
- Extraction des lectines.

## Introduction

---

- Des tests d'agglutination.
- Purification partielle.
- Résultat et Discussion.

Dans cette étude, notre objectif :

- Étude de la présence des lectines par le test d'hémagglutination avec le sang de lapin.
- Étude de l'effet de température ,du pH et des métaux sur l'activité de ces lectines.
- Étude de l'affinité de ces lectines vers les glucides par le test d'inhibiton.
- Purification par chromatographie échange d'anion sur la colonne DEAE-Séphacyl.



**Chapitre 01**  
**Généralité sur les lectines**

## 1. généralités sur les lectines :

### 1.1. Définition des lectines :

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines non immunitaires qui se lient spécifiquement aux glucides . (**Janand Vtislav, 1981**).

Les lectines ont la capacité de se lier de manière réversible à des sucres simples ou à des oligosaccharides sans altérer leur structure (**Ram Singh et al., 2019**).

Ces interactions sucre-lectine sont généralement établies par des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes ou par l'intermédiaire de cations. (**Kocourek and Horejsi, 1981**).

Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand (**Lis and Sharon 1998**).

Les lectines sont des molécules largement répandues, se retrouvant dans une variété d'organismes tels que les microorganismes (virus, bactéries), les plantes, les insectes et les animaux. Elles sont généralement constituées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques. (**Hopkins et al., 2003**).

Les lectines, également connues sous le nom d'agglutinines, ont la capacité d'agglutiner les cellules telles que les érythrocytes et les glycoconjugués. Cette caractéristique essentielle des lectines découle de leur nature multivalente, possédant au moins deux sites de reconnaissance par molécule. Cela explique leur capacité à précipiter les polysaccharides, les glycoprotéines ou les glycolipides, ainsi qu'à induire l'agglutination de diverses cellules (**Liener et al., 1986**).

### 1.2. Historique des lectines :

Les lectines, initialement découvertes dans les plantes, sont également présentes dans le monde animal (**Kamoun et al., 2003**).

En 1888, Hermann Stillmark a identifié une molécule présente dans l'extrait toxique des graines de ricine capable d'agglutiner les érythrocytes, qu'il a ensuite identifiée comme étant une protéine nommée la Ricine. Il a introduit le terme "phytoagglutinines" pour désigner toutes les protéines induisant l'agglutination. Cette avancée scientifique a marqué le début de l'évolution des sciences immunologiques et glycobiologiques (**Peumans W.J.,et Van Damme E.J., 1995**).

En 1954, Boyd a introduit le terme

"lectine" dérivé du mot latin

"lectus", participe passé du verbe

"légère" signifiant "sélectionner" ou "choisir" (**Liener et al., 1986**).

Ce choix de nom s'avère particulièrement pertinent pour désigner cette classe essentielle de protéines, également connues sous le nom d'hémagglutinines ou de phytoagglutinines, car elles ont été initialement identifiées dans des extraits de plantes (**Sharon et lis, 2004**)

Le généticien Goldstein a formulé une définition scientifique des lectines basée sur leurs propriétés biochimiques, incluant la spécificité cellulaire, le mécanisme d'agglutination, la spécificité et l'affinité aux ligands. Il les a décrites comme des protéines ou glycoprotéines d'origine non immune capables de se lier aux sucres, de précipiter les glycoconjugués solubles ou fixés, et d'agglutiner les cellules sans provoquer de modification catalytique sur les ligands (**Slifkin M. et Doyle R.J., 1994**).

**Tableau 1:** Histoire des lectines (**Renato et al., 1991**).

Année	Auteur	Découverte
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de Ricinus communis toxicité de la graine de Croton tiglium
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d'Abrus Precatorius
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hémagglutinine
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline A
1926-1927	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-1949	Boyd & Reguera / Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hémagglutinines
1949	Liener and Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de Phaseolus vulgaris
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectines
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de Phaseolus vulgaris

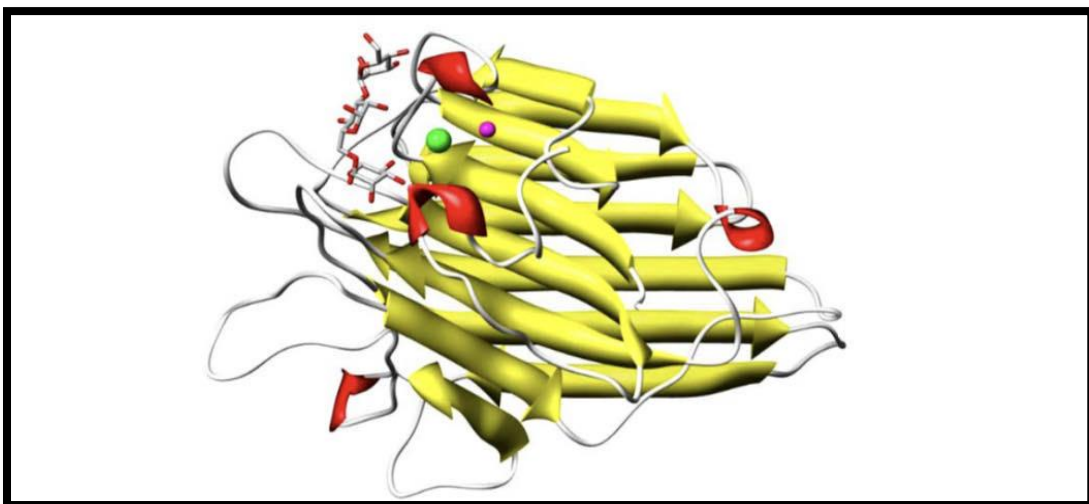
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

### 1.3. structure des lectines :

Les structures biochimiques des lectines présentent généralement des variations en raison de la polymérisation et du repliement de la chaîne polypeptidique. Selon **Sharon N. et Lis H. (1998)**, on peut distinguer trois catégories structurales de ces protéines.

#### 1.3.1. structure simple :

Les lectines se composent de multiples monomères, qu'ils soient identiques ou non, avec une masse moléculaire généralement inférieure à 40 kDa. Cette catégorie englobe la plupart des lectines végétales, des lectines bactériennes solubles et des galectines (une famille de lectines animales spécifiques au galactose) selon **Lenka (2006) (Figure 01)**.

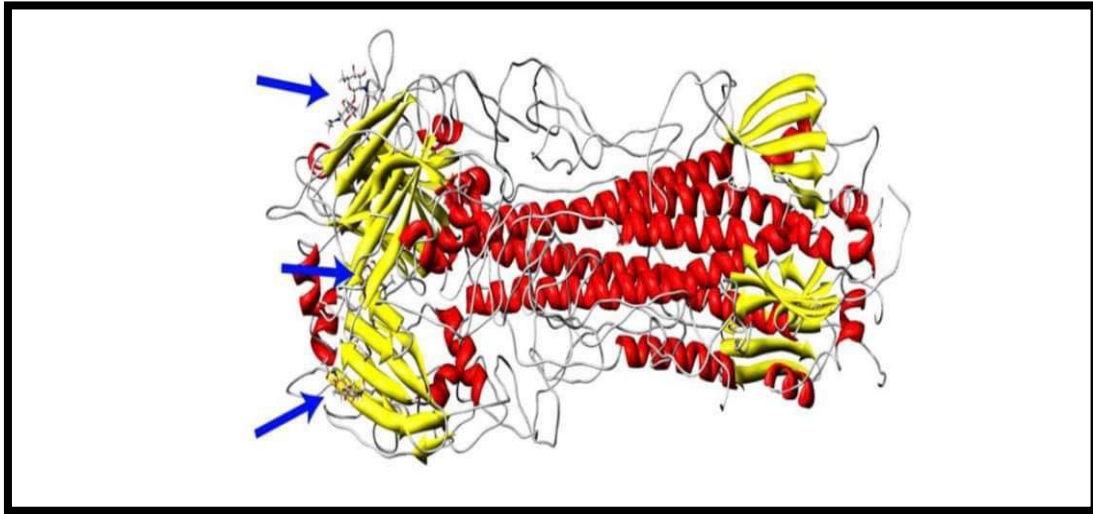


**Figure 1.** Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de *Canavalia ensiformis* complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN) (**Lenka et al., 2006**).

#### 1.3.2. structure mosaïque :

Les molécules complexes se composent de divers types de modules ou domaines, parmi lesquels un seul contient le site de liaison. Cette catégorie englobe une variété de protéines

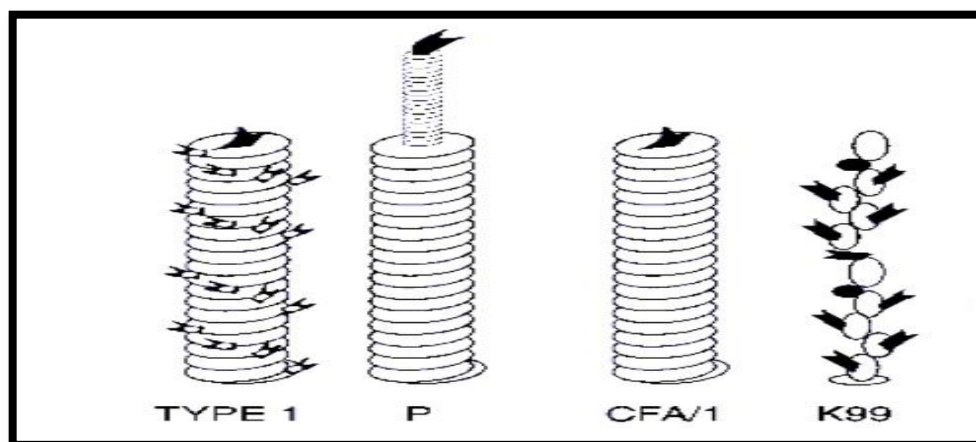
provenant de différentes sources telles que les virus et les animaux (Lenka et al., 2006) (figure 02).



**Figure 2.** illustre un schéma représentant un trimère d'hémagglutinine du virus de la grippe en interaction avec l'acide sialique (Lenka et al., 2006).

### 1.3.3. Assemblages macromoléculaires :

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries ; ou elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre, et jusqu'à 100 nm de longueurs ; appelées fimbriae. La majeure partie d'un filament fimbrial est constituée par la polymérisation d'une unité principale qui a un rôle purement structural. Seule une catégorie d'unités, généralement en minorité, possède le site de liaison aux glucides et est donc responsable de la capacité d'adhésion du fimbrial.ou pili (Lenka et al., 2006) (Figure 03).

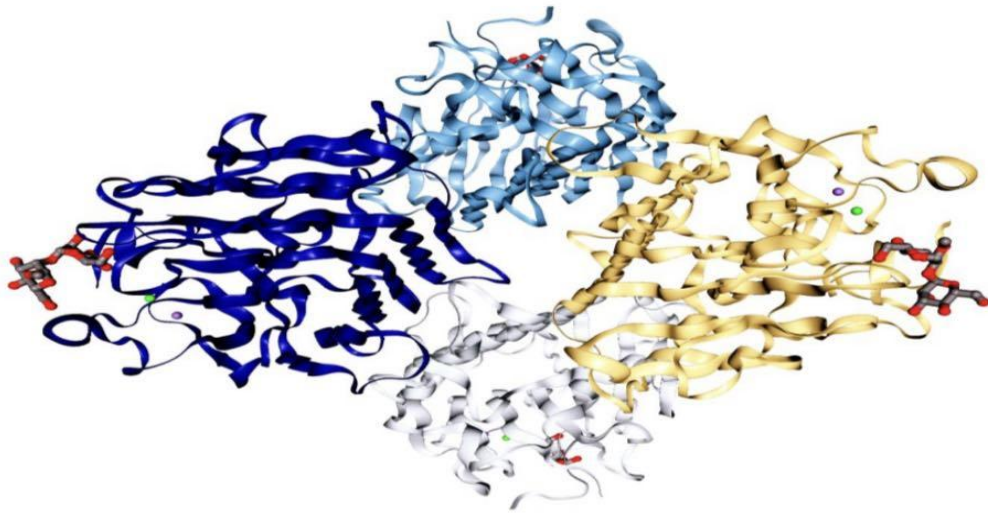


**Figure 03.** schéma de différents types de fimbriae chez Escherichia coli ( Sharon N. et Lis H., 1998) .

## 1.4. La structure tridimensionnelle et Classification des lectines :

### 1.4.1. structure tridimensionnelle des lectines :

La structure cristalline est composée des sous-unités ( **Figure 04**) et généralement caractérisée par une séquence peptidique stable ou hautement conservée qui constitue le domaine structural essentiel pour la liaison au ligand. La configuration quaternaire d'une lectine peut varier, allant d'un dimère à un pentamère formé par des associations non covalentes. Une deuxième catégorie présente une structure en hélice de type  $\beta$ , où le domaine de liaison se répète plusieurs fois. Enfin, une dernière catégorie montre deux domaines de reconnaissance distincts reliés par un domaine de jonction (**Gianluca, 2006**).



**Figure 4.** Structure tridimensionnelle de la concavalline A. Une lectine d'origine légumineuse de *Canavalia ensiformis*. Possède une structure simple qui comprend quatre S/U symétriques. Chaque monomère, comporte un site CDR spécifique du mannose ou du glucose et un site pour la fixation des oligoéléments manganèse et calcium (**source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., et al., 1999**).

### 1.4.2. Classification des lectines :

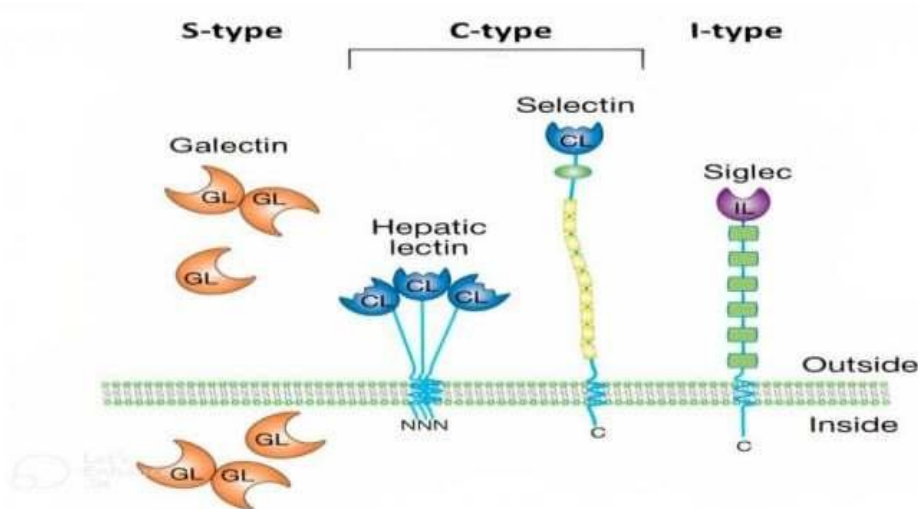
Les lectines sont des protéines qui possèdent la capacité de reconnaître les glucides. Elles sont regroupées en différentes familles en fonction de leur localisation cellulaire et de leur affinité pour diverses structures glucidiques, déterminée par les caractéristiques de leurs modules de domaine de reconnaissance des glucides (CRD) (**Liu Y, 2015**).



### 1.4.2.1. Chez les animaux:

#### 1.4.1.1. Les lectines extracellulaires :

Les lectines extracellulaires, comprenant diverses familles telles que les lectines de type C, de type R et les Galectines, jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, l'adhésion, le dégagement des glycoprotéines et même la détection des pathologies (**Chabrol, 2012**). Dans le règne animal, les lectines extracellulaires se regroupent en trois familles principales : les lectines de type S, de type I et de type C (**Bulteau, 2020**), comme illustré dans la **Figure 5**.



**Figure 5.** Familles de lectines extracellulaires et membranaires impliquées dans l'interface avec les cellules chez les mammifères. Les CRDs des différentes familles sont représentés par CL pour les C-type lectines, GL pour les galectines et IL pour les I-type lectine (**Bulteau, 2020**).

#### 1.5.1.2. Les lectines intracellulaires:

Les lectines intracellulaires se divisent en quatre groupes, les calnexines, les lectines de type M, P et L. Elles sont impliquées de manière cruciale dans divers processus cellulaires tels que le transport intracellulaire, le ciblage des glycoprotéines et leur dégradation, (**Chabrol et al. 2012**).

#### 1.5.2.2. Chez les végétaux:

En 1995, Peumans et Van Damme ont établi une catégorisation des lectines végétales en quatre groupes distincts : les mérolectines, les hololectines, les chimerolectines et les

superlectines. Cette classification se base sur les caractéristiques structurales et la réactivité de ces lectines, notamment en considérant le nombre de sites fonctionnels, (**Houles ,2001**)

#### **1.5.2.2.1. Les mérolectines :**

sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides, dit monovalentes (exemple : hévéineprotéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans et Van Damme, 1995**).

#### **1.5.2.2.2. Les hololectines:**

Les hololectines contiennent deux (ou plus) domaines de liaison aux glucides presque identiques, ou du moins très homologue. Ils peuvent précipiter des glycoconjugués ou agglutiner cellule. Les lectines végétales les plus connues sont les hololectines. (**Zitouni ET Necib 2017b**).

#### **1.5.2.2.3. Les chimérollectines:**

protéines chimérique consistant en une liaison glucidique et le domaine d'activité de stimulation. Selon les sites de liaison, ils travaillent à comme merolectine ou hololectine. (**kumar et al.,2022**).

#### **1.5.2.2.4. Les superlectines:**

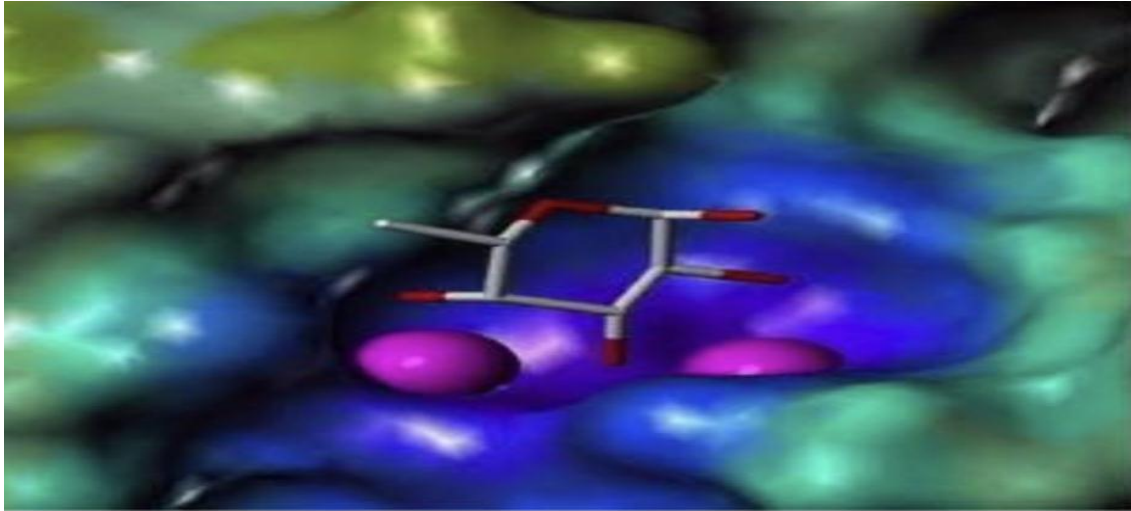
Elles sont constituées de molécules avec deux ou plusieurs domaines distincts de liaison aux glucides ( **Santos et al., 2014**).

### **1 .5. Sites de reconnaissance des lectines :**

Les lectines se lient généralement à un site spécifique sur leur surface, formé par un creux dont la structure reste stable même après la liaison au ligand. Leur interaction avec le ligand repose sur des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes (**Goldstein et Poretz, 1986**) , tandis que les interactions ioniques sont rarement impliquées, sauf pour des sucres chargés tels que l'acide sialique(**Pontet, 1996**) . Il est important de noter que les lectines n'altèrent pas biochimiquement les glucides auxquels elles se lient (**Gabius, 1985**).

L'étude des structures cristallographiques des complexes protéines/glucides révèle la diversité des propriétés et des mécanismes de reconnaissance des lectines vis-à-vis des glucides. Les sites de liaison des lectines présentent généralement des cavités peu profondes. La

reconnaissance des glucides par les lectines repose principalement sur des liaisons hydrogène et des forces de Van der Waals, constituant la majeure partie des interactions impliquées (Ashton A.W. et al., 1997) (Figure 06).



**Figure 06.** Représentation graphique de Fucose dans le site de reconnaissance de la lectine de bactérie "*Pseudomonas aeruginosa*" (CERMAV ,(janvier 2005)).

### 1.6. Propriétés des lectines:

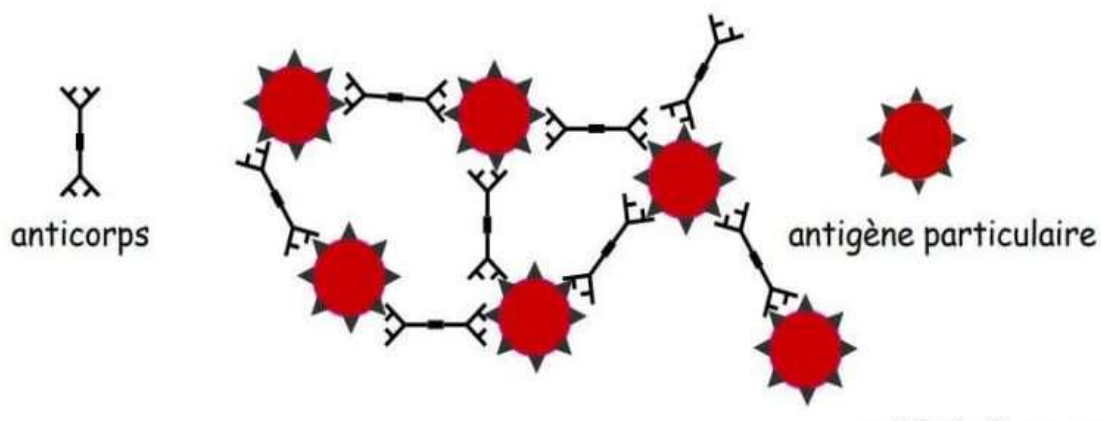
Les lectines jouent des rôles biologiques variés en fonction des organismes qui les contiennent. Dans le règne végétal, elles agissent comme agents de défense, contribuant à maintenir l'équilibre interne et favorisant la symbiose entre les plantes et les bactéries nitrifiantes. Quant aux animaux, leur fonction principale réside dans la reconnaissance cellulaire. Elles participent à divers processus biologiques tels que la cytotoxicité, l'adhésion cellulaire, les interactions entre cellules et matrice extracellulaire, la stimulation de l'apoptose ainsi que l'agglutination des cellules et des bactéries (Danguy A. et al., 2002).

#### 1.6.1. Interaction lectine-glucide:

Les lectines sont des protéines polyvalentes qui peuvent reconnaître et se lier à diverses structures glucidiques. Elles ciblent sélectivement les glucides et s'y attachent de manière réversible lorsque les ligands sont disposés de manière spécifique pour former une interaction lectine-glucide. Cette liaison est principalement due à des liaisons hydrogène et des forces hydrophobes avec la cavité de reconnaissance des sucres (Raposo et al., 2021; Tripathi, 2021) .

### 1.6.2. Activité agglutinante :

L'agglutination est un processus complexe influencé par divers facteurs internes, tels que les caractéristiques moléculaires de la lectine (comme sa taille, le nombre de sites de liaison aux glucides, son affinité, les propriétés de surface cellulaire, la disponibilité des lectines pour les ligands glucidiques et l'état métabolique cellulaire) (Wood, 1995). En outre, des facteurs externes tels que la température, le type cellulaire et la concentration cellulaire peuvent également impacter ce processus. Les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec les sucres à la surface des cellules animales ou d'autres organismes (bactéries, virus, mycoplasmes, champignons). Les lectines monovalentes, n'ayant qu'un seul site de reconnaissance, ne sont pas capables d'induire l'agglutination (Peumans et al., 1995 ; Wang et al., 1998).



**Figure 7** . Représentation schématique de la formation d'un complexe agglutinat à partir d'interaction des lectines avec les antigènes spécifiques des cellules (hemagglutination des érythrocytes) (Santos et al., 2014).

### 1.6.3. Activité mitogène:

Dans les années 1960, P.C. Nowel a identifié le potentiel mitogène de certaines lectines en démontrant leur capacité à provoquer la transformation des lymphocytes en lymphoblastes et à stimuler la division cellulaire ( Zentero 1986). Les lectines possèdent une capacité remarquable de convertir les lymphocytes sanguins en cellules blastiques, en particulier les lymphocytes T,

grâce à leur action mitogène. Cette transformation lymphoblastique, constitue l'une des caractéristiques les plus fascinantes de ces composés (**Ramata, 2010**).

#### **1.6.4. Propriété antibactérienne:**

Diverses lectines présentent des propriétés antibactériennes prometteuses, comme en témoignent les travaux de (**Jensen et al., 1997 ; Ottinger et al., 1999 ; Dong et al., 2004 ; Tasumi et al., 2004**). Une nouvelle lectine récemment découverte dans le venin du serpent *Bothrops leucurus* démontre une forte activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis* (**Nunes et al., 2011**). Les lectines extraites des graines d'arachides *Archidendron jiringa* ont montré une activité inhibitrice contre *B. subtilis* et *S. aureus*, mais n'ont pas eu d'effet sur *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Charungchitrak et al., 2011**). De nombreuses études ont mis en évidence que les lectines ayant une affinité pour les acides sialiques ont la capacité d'agglutiner les bactéries. Par exemple, la lectine SNA1 isolée de *Sorbus nigra* a démontré son pouvoir d'agglutination sur la souche *Streptococcus suis* (**Charland et al., 1995**). De même, la lectine extraite de *Penaus merguinsis* a montré sa capacité à agglutiner les souches de *Vibrio* (**Utarabhand et al., 2007**).

#### **1.6.5. Propriété antivirale :**

Les lectines jouent un rôle crucial dans la liaison aux virus et dans l'arrêt de leur multiplication lors d'infections virales (**Xu S. et al., 2014**). Elles sont également impliquées dans la détection des molécules pathogènes telles que les PAMPs associées aux virus (**Kawamura T. et al., 2014**). De plus, ces protéines ont la capacité d'inhiber l'enzyme rétro-transcriptase du VIH-1, ce qui permet de bloquer l'infection provoquée par ce virus (**Tanaka H. et al., 2009**). Les lectines peuvent présenter des propriétés antivirales similaires à celles des RIPs (Ribosomes Inactivating Proteins). Par exemple, les lectines spécifiques au mannose extraites des bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont montré une activité inhibitrice contre le VIH. L'espèce *Narcissus Tortifolious* s'est révélée être la plus efficace contre le VIH-1 (**Zitouni A., 2015**).

#### **1.6.6. Propriété antifongique:**

Seules quelques-unes des nombreuses lectines purifiées démontrent une activité antifongique, principalement celles possédant un domaine catalytique appartenant à la classe I des chitinases (Ang A.S.W. et al., 2014) . Par exemple, les lectines de *Phaseolus vulgaris cv* ont montré une activité fongicide contre *Valsa mali* (Lam S.K. et Ng T.B., 2010) , tandis que les lectines de *Tinospora tomentosa* ont une action inhibitrice sur la croissance du champignon *Aspergillus niger* (Saha R.K. et al., 2014).

## 1.7. Les fonctions biologique des lectines

### 1.7.1. chez les végétaux :

Les lectines jouent un rôle important dans divers processus biologiques tels que :

- ✓ l'élongation des parois cellulaires.
- ✓ en agissant comme cofacteurs enzymatiques aux côtés d'enzymes glycoprotéiques.
- ✓ Elles participent également au transport et au stockage des glucides dans les graines.
- ✓ régulent la division cellulaire et la germination.
- ✓ interviennent dans la reconnaissance cellulaire à cellule.(Etzler, 1986 ; Kaminski et al.,1987)

✓ Des recherches suggèrent que les lectines peuvent faciliter l'invasion des plantes par des pathogènes en agissant comme récepteurs de phytotoxines ou en se liant au pathogène en tant que molécules d'adhésion. Par exemple, l'infection de la canne à sucre par le champignon *Helminthosporium sacchari* illustre ce mécanisme de pathogenèse.(Etzler, 1986) .

### 1.7.2. Chez l'homme :

Les lectines chez l'être humain présentent diverses fonctions bénéfiques, telles que :

- ✓ Réduction des risques de maladies cardiovasculaires.(Boston and Ma , 2019).
- ✓ Contribution à la régulation de la digestion des glucides, entraînant une diminution du risque de diabète de type 2.(Rea, Thompson and Jenkins, 1985).
- ✓ Potentiel élevé en tant qu'anti-inflammatoire naturel, pouvant être exploré pour des applications pharmacologiques.(Campos et al., 2016).
- ✓ Capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses en tant que protéines végétales biologiquement actives.(Kenoth et al.,2001).

- ✓ Utilisation comme outil essentiel dans l'identification des différents groupes sanguins en tant que déterminants antigéniques.(**F et al., 2002**).
- ✓ Possibilité d'être utilisées pour cibler et transporter des médicaments vers leur site d'action (**Bies, Lehr and Woodley, 2004**).
- ✓ Activité inhibitrice de la transcription inverse du VIH-1.
- ✓ Utilisation de leur activité antioxydante pour traiter diverses maladies liées aux radicaux libres (**Singh, Walia and Kennedy, 2020**).

## 1.8. L'utilisation thérapeutiques des lectines

Les lectines ont de nombreuses applications aux avantages thérapeutiques significatifs, notamment dans le domaine du greffage de la moelle osseuse, du diagnostic médical de la glycémie, du traitement antiviral contre le VIH et l'Influenza H2N1, ainsi que dans des applications nutritionnelles telles que la lutte contre l'obésité avec la lectine de *Pleurotus ostreatus* (**Kawagishi H., et al., 2000 ; Necib Y., et al., 2014**).

### 1.8.1. Application immunologique

En cas de déficit immunitaire affectant la mitogenèse et la multiplication des lymphocytes (**Van Kooyk Y. et Rabinovich G.A., 2008**), les lectines peuvent être utilisées pour stimuler la division cellulaire. Par exemple, la lectine extraite des graines d'*Artocarpus lingnanensis* favorise la prolifération des lymphocytes T en activant la voie de signalisation de la tyrosine kinase/phosphorylase via le récepteur CD45 (**Cui B., et al., 2017**).

### 1.8.2. Agglutination et groupage sanguin

Le groupage sanguin, connu sous le nom de système ABO ou ABH, repose sur la présence d'antigènes qui sont des sucres variés ou des protéines liées aux différentes parties de la membrane des globules rouges. Ces antigènes sont distingués par des résidus sucrés spécifiques à l'extrémité de la chaîne d'oligosaccharides commune. La classification du système ABO est facilitée par la spécificité des lectines pour les sucres, qui peuvent également être utilisées pour identifier d'autres types cellulaires et pour la taxonomie de certains microorganismes. De plus, les lectines sont utiles dans le traitement des syndromes de polyagglutination induits par des

enzymes telles que les sialidases, qui sont impliquées dans diverses pathologies telles que le cancer, les maladies génétiques, ainsi que les infections bactériennes et virales. Ces enzymes agissent en hydrolysant des antigènes naturels tels que l'Ac Si, présents en grande quantité sur la membrane des globules rouges dans ces conditions pathologiques (**Sharon N. et Lis 2003**).

### **1.8.3. Traitement et diagnostic de cancer**

Les lectines induisent l'apoptose, également connu sous le nom de Programme de Mort Cellulaire, en interagissant avec les glycanes présents sur ces cellules. Cette interaction déclenche une cascade de signaux qui activent les voies des caspases 8 et 3, et elles se lient au récepteur membranaire de la mort cellulaire, le «FasR» (**Lichtenstein R.G. et Rabinovich G.A., 2013**). En raison de la forte présence de glycoprotéines à la surface des cellules cancéreuses et de leur affinité d'interaction plus élevée par rapport aux cellules normales, les lectines peuvent être utilisées dans des kits médicaux pour la détection du cancer (**Dan X., et al., 2015**).



# **Chapitre 02**

**Généralité sur champignons *Tricholoma sp***

### 1. *Tricholoma sp* :

#### 1. Définition

Tricholoma est un genre de champignons. Il appartient à la famille des Tricholomatacées et comprend de nombreuses espèces différentes . le genre Tricholoma est caractérisé par des corps fongique à calotte bleuâtre ou brune et à pétioles blancs ou jaunes . leur forme et leur couleur varient en fonction de chaque espèces (Noordeloos & Christensen 1999).

#### 2. Historique et l'origine

Il est difficile de déterminer une histoire précise du genre Tricholoma et de son origine, en raison de la diversité des espèces et de leur présence dans différentes zones géographiques. Cependant , certaines espèces ont été documentées dans les archives scientifiques depuis le Moyen Age ( Heilmann-Clausen 2003).

Les espèces de Tricholoma sp sont répandues dans le monde entier et se trouvent dans les forêts , les prairies et les zones humides . certaines espèces sont importantes sur le plan nutritionnel et utilisées en cuisine , tandis que d'autre peuvent être toxiques ou impropres à la consommation (Sánchez-Clausen 2013) .

#### 3. Classification :

Tableau 02 : classification des champignons *Tricholoma sp* (Christensen M et al.,2013).

<i>Règne</i>	<i>Fungi</i>
<i>Division</i>	<i>Basidiomycota</i>
<i>Classe</i>	<i>Agaricomycetes</i>
<i>Sous-classe</i>	<i>Agaricomycetidae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Agaricales</i>
<i>Clade</i>	<i>Tricholomatoide</i>
<i>Famille</i>	<i>Tricholomataceae</i>

### 4 . Utilisation thérapeutique des *Tricholoma sp* :

Les champignons du genre *Tricholoma* sont utilisés à des fins thérapeutiques dans la médecine traditionnelle dans certaines parties du monde. Par exemple, il est utilisé en médecine chinoise traditionnelle pour ses propriétés anti-oxydantes , anti-inflammatoires et anticancéreux. Il est également considéré comme un tonique pour renforcer le système immunitaire (**Wasser et al., 1999 ; wang et al.,2016**).

Les tricholomes sont des champignons comestibles qui sont souvent utilisés dans la cuisine traditionnelle de nombreuses cultures à travers le monde. Ils peuvent être préparés de différentes manières, notamment en sauté, en soupe, en sauce ou en conserve. En Europe, certaines espèces de tricholomes sont considérées comme des délices culinaires prisés dans la gastronomie traditionnelle. Il est important de noter que certaines espèces de tricholomes peuvent être toxiques, et il est donc recommandé de faire preuve de prudence lors de la cueillette et de la consommation de ces champignons. Il est également conseillé de consulter un mycologue ou un expert en champignons avant de consommer des tricholomes sauvages (**Bernard ., 2013**).



**Matériels  
et  
Méthodes**

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel fongique :

*Tricholoma sp* (figure 8) a été collectée(en 2019), au niveau de la zone du Djebel El Ouahch wilaya de Constantine .



**Figure 8** : champignons *Tricholoma sp* ( Djebel El Ouahch - constantine ).

### 2. Méthodes :

#### 2.1. Extraction et purification de la lectine du champignon *Tricholoma sp* :

##### 2.1.1. Extraction de protéines :

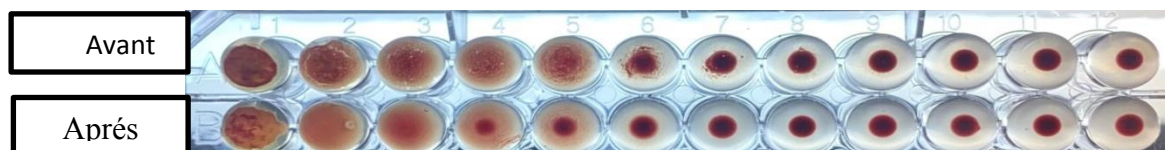
- 10 g de poudre fongique ont été ajoutés dans 100 mL du tampon PBS pH 7,4 (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 2,7 mM KCl ; 137 mM NaCl ; 2 mM EDTA) .
- Le mélange a été agité pendant 24h (poudre –PBS).
- Une Centrifugation (4 tubes de 15 mL ) pendant 20 min 6000 rpm à 4°C .
- Le surnageant obtenu a été utilisé pour détecter la présence de lectine par le test d'agglutination (HA) et pour mesurer la quantité de protéine totale et rejeter le culot .

### 2.1.2. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA) :

Une méthode rapide pour détecter les lectines et leur accumulation dans les extraits protéiques est utilisée, mais elle n'est pas toujours précise (Sharon N. et Lis H., 1998).

- Dans une microplaque, dans chaque puits on mis 50  $\mu$ L de tampon PBS (10 mM pH 7,4) .
- Pour les doubles dilutions, un volume équivalent de la solution protéique a été ajouté dans le premier puits en mélangeant avec le PBS .
- Un volume de 50  $\mu$ L a été prélevé puis dilué avec puit suivant pour obtenir une dilution au demi (1/2).
- La même procédure se répète avec les autres puits et au dernier puit , 50  $\mu$ L on été jeté.
- Ont été ajouter 50  $\mu$ L des hématies fixées du lapin à 3 % à tout les puits.
- L'activité agglutinante a été observées après 30 min.

1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 1/1024 1/2048 1/4096



**Figure 9:** Test d'HA des érythrocytes fixées, avant et après la centrifugation (photo personnelle prise le 13/02/2024 ).

### 2.1.3. Purification :

#### 2.1.3.1. Test de précipitation :

Les protéines de l'extrait brut sont fractionnées en utilisant le sel de sulfate d'ammonium (AMS) selon Dawson R.M.C. et al. (1969) (voir tableau de précipitation à 0°C ). Après la solubilisation du sel dans l'extrait protéique. La procédure consiste à ajouter suffisamment 25,8g d'AMS dans 50 mL de l'extrait initial, puis à le dissoudre sous agitation à froid dans un bain de glace pendant 10 minutes. Les protéines précipitées sont récupérées après une centrifugation de 10 minutes, 6000 rpm à 4°C. Le surnageant rejet et récupérées le culot , enfin ajout 5mL de PBS sur le culot .(Annexe 01)

#### 2.1.3.2. Dialyse :

La fraction 80% sont solubilisées dans un volume de 5mL de tampon PBS 10mM, pH 7,4 et mettre dans un boudin de dialyse , puis dialysées dans l'eau distillée pendant 24 h après dans le PBS (pH 7,4) pendant 24 h .

### **2.1.3.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Séphacyl :**

Un volume de 3 mL de fraction 80% ont été injecté dans la colonne . Les parties non retenues par la résine ont été éliminées en rinçant avec un tampon d'équilibration. Ensuite, les fractions retenues ont été éluées en utilisant trois tampons PBS 10 mM à pH 8,4 contenant des concentrations croissantes en NaCl (0,5 M , 1 M ), avec un débit de 0,7 mL/min grâce à une pompe péristaltique LONGER PUMP. Chaque fraction, collectée avec un volume de 3 mL par un collecteur de fraction GILSON FC80. Le spectre chromatographique a été réalisé après la mesure des absorbances à 280 nm dans un spectrophotomètre JENWAY 7035 UV -Visible, Puis on a tracé la courbe d'absorbance en fonction des tubes. L'extrait récupéré ont été testé sur les hématies du lapin pour détecter la fraction active.(Annexe 02)

## **3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée :**

### **3.1. Test d'HA et d'inhibition :**

Le test d'inhibition de l'agglutination héminthique (HA) avec les glucides et les glycoprotéines se fait de la même manière que le test HA ( **Sano K. et Ogawa H., 2014**).

Dans une microplaque de 96 puits (8 lignes et 12 colonnes), ont été ajouté 25 µL de PBS 10 mM pH 7,4 à tous les puits, ainsi qu'un volume équivalent de sucre (400 mM pour les mono ou oligosaccharides et 1 mg/mL pour les glycoprotéines préparées dans du PBS (pH 7,4) uniquement dans le premier puits.

À partir de ce premier puits contenant le mélange (25 µL de sucre + 25 µL PBS), un volume de 25 µL de sucre a été prélevé puis dilué avec 25 µL de PBS pour obtenir une dilution à moitié (1/2). Les dilutions géométriques ont été effectuées pour l'ensemble des puits de la microplaque, suivies de l'ajout d'un volume équivalent de lectine dans tous les puits, mixé à l'aide d'une micropipette.

Les plaques ont été incubées pendant 1 heure à 37°C, puis un volume de 50 µL d'érythrocytes (3%) de lapin fixés a été ajouté dans tous les puits.

La lecture des résultats a été réalisée après une 30 min d'incubation à 37 °C.

### **3.2. Dosage des protéines :**

La quantification des protéines obtenues à chaque étape de purification a été effectuée en utilisant la méthode de Bradford (1976). Le sérum albumine bovine (BSA) a été utilisé comme standard et les absorbances ont été mesurées à 595 nm à l'aide du spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible (Annexe 03).

### **3.3. Evaluation de la stabilité protéique :**

#### **3.3.1. L'effet de la température sur l'activité agglutinante :**

dans un tube en verre ont été ajouté 10 ml de L'extrait brut, puis incubée à des températures différentes (40, 60, 80 et 100 °C) dans un bain-marie pendant 1h.

Après avoir été refroidis à la température ambiante, ont été testés l'activité agglutinante (chacune des températures dans une ligne).

Dans chaque ligne, ont été ajoutés 50 µL de tampon PBS 10 mM, pH 7.4 dans tous les puits.

Après, ont été ajouté un volume de 50 µL d'extrait brut au premier puits. Ensuite, nous avons effectuées des dilutions successives.

Enfin, nous avons ajouté 50 µL des hématies fixées du lapin à 3% dans tous les puits.

L'activité agglutinante a été observée après 30 minutes d'incubation à la température ambiante.

#### **3.3.2. L'effet du pH sur l'activité agglutinante :**

L'extrait chromatographie a été dialysé pendant 2h dans différents tampons à des pH croissants : 2,5 (20 mM Glycine-HCl) ; 6 (20 mM sodium acétate) ; 9 (20 mM Glycine-NAOH) ; 10 (20 mM glycine-NAOH) (annexe 01)

#### **3.3.3. L'effet des métaux sur l'activité agglutinante :**

##### **A/ L'effet des métaux avant EDTA**

Ont été réalisé le test d'HA pour évaluer l'effet de chaque métaux (CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>) Sur l'activité protéique. Nous avons ajouté 25 µL de PBS 10 mM, pH 7,4 dans tous les puits, après ont été ajoutés 25 µL des métaux uniquement dans le première puits (ont utilisé la méthode double dilution).

Nous mettons un volume 25 µL de l'extrait dans tous les puits de la microplaque.

Enfin, 50 µl d'hématies du lapin sont rajoutées à tous les puits. La lecture a été effectuée à l'œil nu après 30 min d'incubation.

##### **B/ L'effet des métaux après EDTA**



## Matériels et méthodes

---

Nous avons testés l'effet des métaux sur activité agglutinante de l'extrait traité par EDTA sur quatre métaux (  $\text{Cu cl}_2$  ,  $\text{Ca cl}_2$  ,  $\text{Mn cl}_2$  ,  $\text{Fe cl}_3$  ) . après avoir appliqué la technique de la ultracentrifugation pour augmenter la concentration de l'extrait. Nous suivons les mêmes étapes mentionnées précédemment de test d'HA .

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



# **Résultats et discussion**

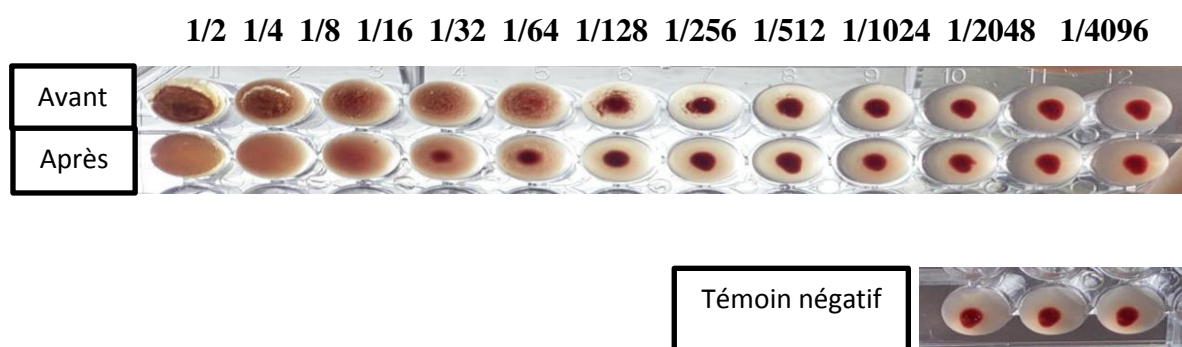
## Résultats et discussion

### 1. Etude phytochimique:

#### 1.1. Test d'hémagglutination:

La plupart des lectines possèdent des caractéristiques d'agglutinations avec les hématies . Les globules rouges se manifestent par la formation d'une interaction entre ces cellules et les lectines. Après incubation entre les globules rouges et l'extrait de lectine pour connaissance entre les sucres des globules rouges et des lectines , on observe les agglutinations.

Pour évaluer l'activité lectinique de *Tricholoma sp*, des tests d'hémagglutination ont été réalisés en utilisant des érythrocytes de lapin.



**Figure 10:** test d'hémagglutination, en présence d'un témoin négatif(PBS) avant et après centrifugation ( photo personnelle prise le 13/02/2024) .

Nos résultats montrent une activité hémagglutinante forte de l'extrait du *Tricholoma sp* (**Figure 10**) au niveau des trois premiers puits .

Le pouvoir hémagglutinant de notre lectine commence à diminuer progressivement dans les trois puits suivants allant jusqu'à la dilution (1/64), alors que dans le reste des dilutions et jusqu'au douzième puits (1/4096) l'activité agglutinante a disparu complètement.

L'observation visuelle de cette agglutination démontre la présence de lectines dans notre champignon *Tricholoma sp*. En règle générale, l'interaction entre les lectines et les globules rouges se produit lors du dépôt des lectines dans un puits contenant ces globules. Les globules rouges se regroupent et forment un amas homogène sous forme d'une phase gélatineuse, phénomène connu sous le nom d'agglutination.

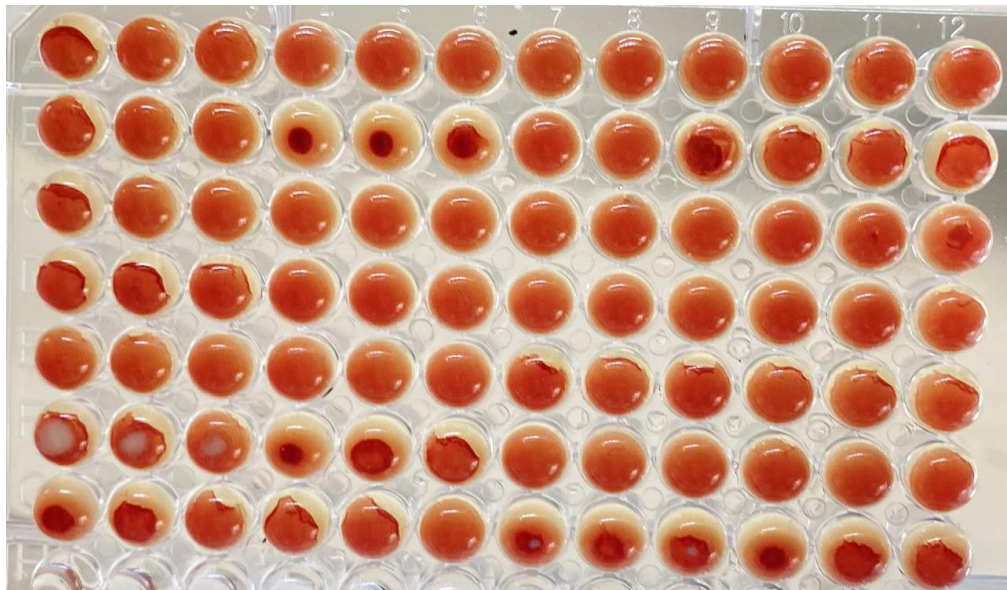
### 2. Caractéristiques d'extrait de lectine du *Tricholoma sp*:

#### 2.1. Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante :

Pour évaluer les tests d'inhibition, les lectines peuvent se lier avec des structures glucidiques spécifiques. Le test d'inhibition de l'activité d'hémagglutination, a été effectué en

## Résultats et discussion

utilisant une gamme des sucres. Les résultats sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.



**Figure 11:** Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante par les sucres et un glycoprotéine (photo personnelle prise le 19/02/2024 ).

Cellobiose ---	Glucose ---	Glc Nac ---	Methyl $\alpha$ -D-Glyco pyranoside ---
Mannitol ---	Mucine +++	Chitosonie ---	Lactose +++
M. $\alpha$ .L.Furo- pyranoside ---	M. $\alpha$ . D.manno- Pyranoside ---	$\alpha$ .M.XO manno pyranoside ---	Mannitol ---
Mélibiose ---	Inositol ---	L(+).Arabinose ---	D(-) Sorbitol ---
Sorbitol ---	D(+) Saccharose ---	D(+).Galactose ---	Xylose ---

## Résultats et discussion

Cellulose ---	Lactose +++	Mannose ---	4-Nitrophenyl-β-D- Glucopyranoside ---
4-Nitrophenyl-α -D- Glucopyranoside +++	4-Nitrophenyl -α -D- Galactopyranoside ---	4-Nitrophenyl-β - Galactopyranoside +++	2-Nitrophenyl-β-D Galactopyranoside +++

+: Inhibition d'agglutination.

\_: Absence d'inhibition d'agglutination.

**Tableau 3:** Résultat de test d'inhibition d'extrait de *Tricholoma sp* par des sucres et un glycoprotéine.

La principale caractéristique des lectines est leur capacité à agglutiner les globules rouges, facilitant ainsi la détection de ces protéines dans les extraits protéiques. Cependant, bien que ce test puisse être simple, il n'est pas toujours fiable pour identifier les lectines. Par conséquent, d'autres tests basés sur la spécificité biochimique des lectines, tels que l'inhibition de l'agglutination par des glycoprotéines, sont souvent nécessaires pour une détection plus précise.

Nous avons utilisé 25 sucres et un glycoprotéine (Mucine) dans notre travail.

Le test d'inhibition d'hémagglutination nous a permis de montrer que notre extrait de *Tricholoma sp* présente une spécificité pour les quatre sucres (Lactose, 4-Nitrophenyl-α -D Glucopyranoside, 4-Nitrophenyl-β -Galactopyranoside, 2-Nitrophenyl-β-Galactopyranoside) et un glycoprotéine (Mucine) et aucune affinité par les autres sucres.

Dans notre situation, l'inhibition avec Mucine est plus forte que celle des sucres.

Le test d'inhibition d'HA par les sucres (soit mono ou oligo ou polysaccharides) est le plus fréquemment effectué pour confirmer la nature d'agglutination et l'affinité protéique, (**Toumi Mohamed, E : 2021**).

### 2.2. L'effet de la température:

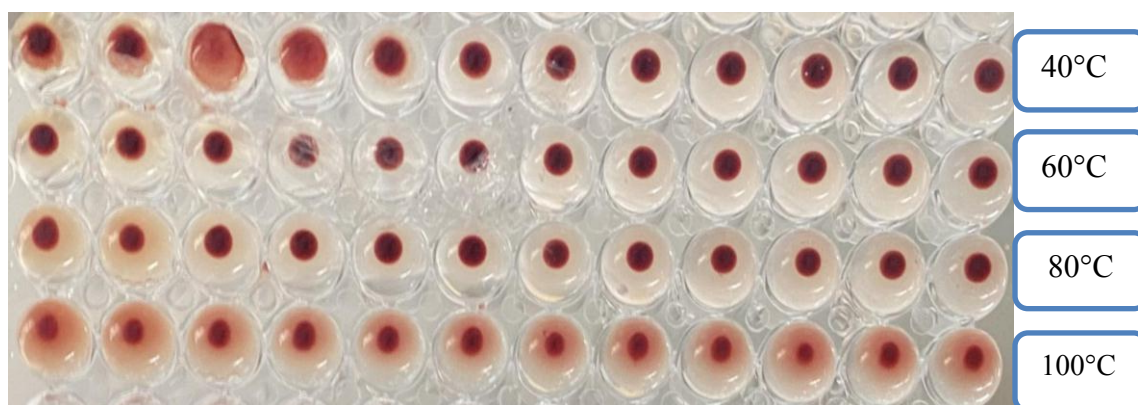
Les résultats obtenus après l'exposition de nos extraits à différentes températures (40°C, 60°C, 80°C, 100°C) pendant 1h sont présentés dans le tableau suivant :

Température	40°C	60°C	80°	100°C
<i>Tricholoma sp</i>	+++	---	---	---

**Tableau4:** Résultats d'effet de température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait brut.

+++ : Présence d'agglutination.

--- : Absence d'agglutination.



**Figure12:** L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *Tricholoma sp.*

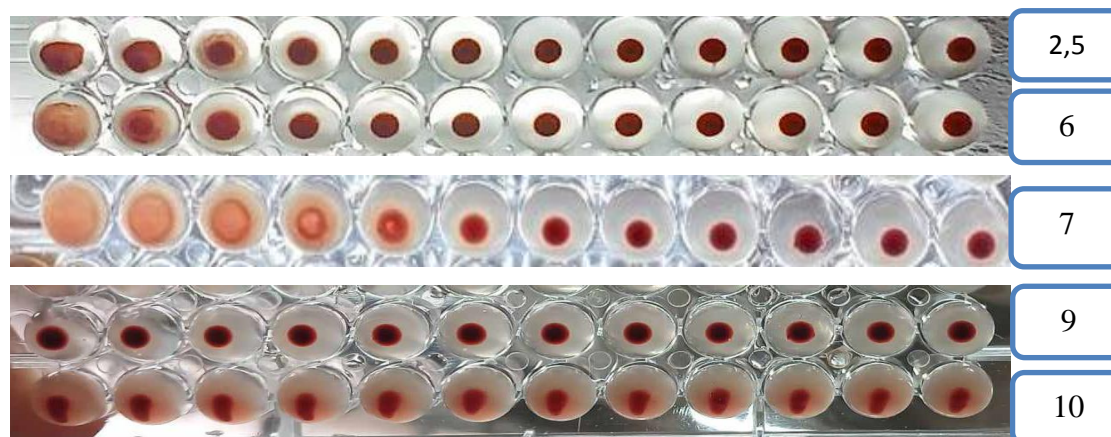
En incubant nos extrait à différente température 40°,60°,80°,100°C Après le traitement thermique de l'extrait brut du *Tricholoma sp* pendant 1h.

notre lectine garde son pouvoir agglutinant aux 40°C où son activité à 40°C se maintien jusqu'au quateriemme puits (1/16), avec une perte totale d'activité à 60°,80°,100°C (pas thermorésistante), notre lectine perd son pouvoir agglutinant.

Par contre les lectine extraites à partir de *Ocimum basilicum* qui résistant a haut température (80et 100 C°) (Sakhri et Labiod.,2023 )

### 2.3.L'effet du pH:

L'activité hémagglutinante de l'extrait du *Tricholoma sp* a été testée à différents pH.



**Figure 13:**L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *Tricholoma sp.*

pH	2,5	6	7	9	10
<i>Tricholoma sp</i>	+++	+++	+++	---	---

+++ : Présence d'agglutination      --- : Absence d'agglutination

**Tableau 5:** L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante de l'extrait *Tricholoma sp.*

## Résultats et discussion

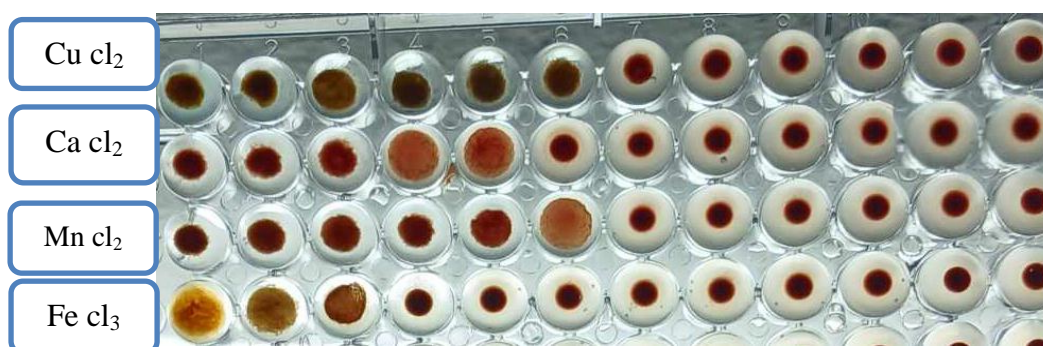
Nos résultats ont montré que l'activité d'agglutination de lectine de *Tricholoma sp* est forte avec un pH optimal (pH=7). alors qu'elle plus faible avec pH=2,5 et pH=6 . par contre avec pH=9 et pH=10 l'activité agglutinante est disparait totalement .

La lectine purifiée de champignons *Tricholoma sp* présenté une activité maximale a pH=7  
Ce qui montre que le pH acide et basique influence sur l'activité hémagglutinant.

Donc nos lectine hémagglutine mieux les globules rouges à milieu neutre que acide et basique.

### 2.4.L'effet des métaux :

Pour déterminer l'effet des métaux sur l'extrait traité par EDTA, on à réaliser un test de l'hémagglutination par une gamme des métaux (Cu cl<sub>2</sub>, Ca cl<sub>2</sub>, Mn cl<sub>2</sub>, Fe cl<sub>3</sub>).



**Figure 14:**L'effet des métaux sur l'activité agglutinante d'extrait *Tricholoma sp*.

Métaux	Cu cl <sub>2</sub>	Ca cl <sub>2</sub>	Mn cl <sub>2</sub>	Fe cl <sub>3</sub>
<i>Tricholoma sp</i>	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

**Tableau 6:** L'effet des métaux sur l'activité agglutinante de l'extrait Traité par EDTA .

La lectine de *Tricholoma sp* présenté une activité avec les métaux (Cu cl<sub>2</sub>, Ca cl<sub>2</sub>, Mn cl<sub>2</sub>, Fe cl<sub>3</sub>) ce qui montre que la lectine est métalloprotéine.

Contrairement à la lectine de *Amanita virosa* qui une lectine non métalloprotéine.  
(BENTAFAR et BOUARIOUA.,2023)

### 2.5. La séparation des lectines par la chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl:

## Résultats et discussion

**Tableau 7:** Résultats de la séparation des lectines du *Tricholoma Sp* obtenues après chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl.

Fraction	Absorbance	Fraction	Absorbance
1	0,001	41	0,619
2	0,011	42	0
3	0,108	43	0,576
4	0,298	44	0,609
5	0,182	45	0,522
6	0,106	46	0,465
7	0,067	47	0,356
8	0,042	48	0,392
9	0,036	49	0,323
10	0,035	50	0,294
11	0,026	51	0,290
12	0,020	52	0,289
13	0,012	53	0,274
14	0,012	54	0,394
15	0,015	55	0,443
16	0,011	56	0,394
17	0,011	57	0,366
18	0,063	58	0,668
19	0,007	59	0,705
20	0,007	60	0,678
21	0,211	61	0,229
22	0,003	62	0,376
23	0,004	63	0,347
24	0,021	64	0,300
25	0,002	65	0,267
26	0,006	66	0,286
27	0,007	67	0,286
28	0,035	68	0,246



## Résultats et discussion

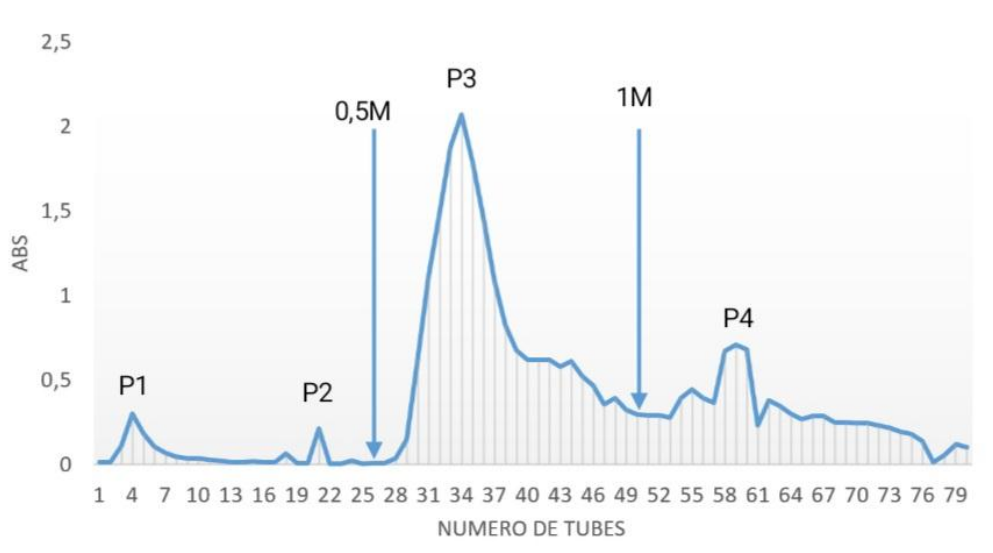
29	0,145	69	0,250
30	0,621	70	0,245
31	1,116	71	0,244
32	1,484	72	0,231
33	1,878	73	0,218
34	2,072	74	0,193
35	1,793	75	0,181
36	1,459	76	0,135
37	1,085	77	0,010
38	0,823	78	0,054
39	0,673	79	0,120
40	0,619	80	0,100

Pour interpréter les résultats présentés dans le (**Tableau 7**) ,on a tracé la courbe qui illustrant le profil d'élution : Absorbance à 280 nm en fonction de nombre des tubes.

Eluant : PBS (pH=8,4)

Absorbance : 280 nm

Volume de rétention : 3 mL



**Figure 15:**La courbe d'Absorbance de l'extrait du *Tricholoma sp* après leur passage à travers la colonne de DEAE-Sephacyl.

## Résultats et discussion

Le profil d'élution de la figure explique qu' il y'a quatre pics mesurés à 280nm.

**1er et 2eme pics :** Pics faibles dans les tubes 4 (Abs:0,298) et 21 (Abs:0,211) dans l'ordre .

**3eme pic:** Pic fort dans le tube 34 (Abs:2,072).

**4eme pic:** Pic moyenne dans le tube 59 (Abs:0,705).

Les résultats de séparation on montrés un bon fractionnement des extraits ( pics séparées).

Un test d'hémagglutination a été effectuées sur tous les tubes pour déterminer la présence de lectine.

Nos résultat montrée l'activité hémagglutinante a été présenté dans les tubes 4.21.34.59, qui indique la présence de lectine dans les quatre tubes.

L'activité hémagglutination des extraits est améliorée par la chromatographie échangeuse d'anions.

### 2.6.Purification partiel de la lectine:

La chromatographie échangeuse d'anion sur la colonne DEAE-Sephacyl (**figure 15** ) de la fraction de titre d'HA élevé de saturation 80% avec AMS après lavage et l'élution par différentes concentrations de NaCl (0,5M . 1M )dans PBS pH 8,4 indique 4 pics. Les résultats du test d'activité hémagglutinante (HA) indiquent que fraction du pic P3 présentent une activité HA élevée .Le tableau 8 détaille les différentes étapes du purification.

L'activité hémagglutinante de chaque fraction est mentionnée avec l'indice de purification.

Après la précipitation d'extrait brut par le sel de sulfate d'ammonium (AMS),elle a une activité spécifique (Sac) de 0,34 UH/mg, L'élution avec une solution de NaCl à 0,5M dans le PBS (10Mm- pH 8,4) a permis d'obtenir une activité spécifique (SAC) de 3,77 UH/mg de protéines , ce qui correspond à un indice de purification de 11,08 et un rendement de 13%.

**Tableau 8:**Purification de la lectine a partir *Tricholoma sp.*

Fraction	Protéines (mg)	UHA	Sac (UHA/mg)	Indice de purification	Rendement (%)
AMS (80%)	704,4	240	0,34	1	100
Pic 0,5M NaCl	84,8	320	3,77	11,08	13

❖ UHA(Activité hémagglutinante totale) = le titre multiplié × volume de fraction.

❖ Avtivité spécifique (SAC) =  $\frac{\text{activité HA totale d'une fraction}}{\text{la quantité totale de protéines (mg)}}$

## Résultats et discussion

- ❖ L'index de purification =  $\frac{SAC \text{ de l'extrait brut après l'élution}}{SAC \text{ de la fraction purifiée}}$ .
- ❖ Rendement ou le pourcentage de l'activité HA totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.

La fraction 80% de saturation présente une activité spécifique de 0,34 UHA/ mg de protéines, après l'élution(0,5M) l'activité spécifique est augmenté par rapport la fraction 80% (SAC=3,77 UHA/mg), Cela signifie que l'augmentation de SAC liée a la présence de lectine, donc on choisit SAC d'extrait le plus important .

### 2.7.Dosage des protéines :

Le calcul de la concentration après la précipitation par AMS et l'élution d'extrait brut a partir de la courbe d'étalonnage.

#### 1\_ Calcul de la concentration de l'extrait brut après le fractionnement par (AMS)

La D.O de notre échantillon brut est 0,811.

- $y = a x + b$
- $y = 0,0092x + 0,5949$
- $x = (0,811 - 0,5949) / 0,0092$
- $x = 23,48 \times 30$
- $x = 704,4 \mu\text{g/mL}$
- $x = 0,7044 \text{ mg/mL}$ .

#### 2\_ Calcul de la concentration de l'extrait brut après l'élution (0,5M)

La D.O de notre échantillon brut est 0,673.

- $x = (0,673 - 0,5949) / 0,0092$
- $x = 8,48 \times 10$
- $x = 84,8 \mu\text{g/mL}$
- $x = 0,0848 \text{ mg/mL}$ .



## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives:

Dans la présente étude, nous avons étudié les lectines d'origine fongique de *Tricholoma sp*. ont été isolées par différentes techniques utilisées dans les études biochimiques et protéomiques.

-Les extraits bruts de la tricholoma sp affiche une activité hémagglutinine moyenne.

-Notre extrait présente une spécificité pour les sucres (Lactose, 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D Glucopyranoside, 4-Nitrophenyl- $\beta$ -Galactopyranoside, 2-Nitrophenyl- $\beta$ -Galactopyranoside) et le glycoprotéine (Mucine) donc aucune affinité par les autres sucres.

-Les lectines de notre champignons sont thermorésistants à la température 40°C ils perdent totalement leur activité hémagglutinante à 60°C, 80°C, 100°C.

-L'extrait de *Tricholoma Sp* montre que l'activité d'agglutination est forte avec un pH optimal pH=7, plus faible avec pH=2,5 et pH=6 et disparu totalement avec pH=9 et pH=10.

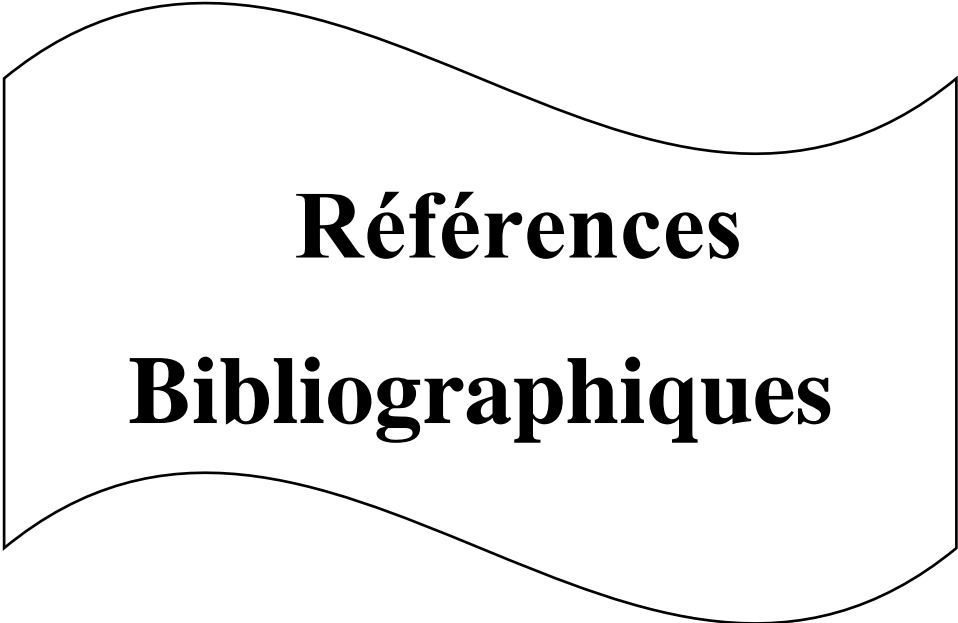
-L'extraction des lectines par la chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl a montré quatre pics pour l'extrait de *Tricholoma Sp*.

### Perspective:

Les résultats de ces travaux sont nombreux obtenus par des tests biologiques :

-La purification des lectines.

-Des tests biologiques: Immunologiques, Anti-cancer, antioxydant .....



**Références**  
**Bibliographiques**

## Références Bibliographiques

### A

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

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

### B

**BENTAFAR A., BOUARIOUA A (2023).** Caractérisation et l'immunomodulation des lectines extraites à partir de Morus alba L et Amanita virosa. Mémoire Master. Biochimie. Algérie. Université constantine 1 des frères mentouri. 38.

**Bies, C., Lehr, C.-M. and Woodley, J.F. (2004)** 'Lectin-mediated drug targeting: history and applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(4), pp. 425–435. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.030>

**Boston**, 677 Huntington Avenue and Ma 02115 +1495-1000 (2019) Lectins, The Nutrition Source. Available at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/antinutrients/lectins/> (Accessed: 4 April 2023).

**Bulteau, F. (2020)** Ciblage in vivo des tumeurs via l'antigène Tn: Développement d'un cluster de Macrophage Galactose Lectine. PhD Thesis. Université Grenoble Alpes [2020-....]

### C

**Campos, J.K.L. et al. (2016)** 'Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin', *Biochimie Open*, 2, pp. 62–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2016.03.001>

## Références Bibliographiques

---

**Chabrol, E. (2012)** Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de Langerhans : La Langérine. These de doctorat. Grenoble. Available at: <https://www.theses.fr/2012GRENV022> (Accessed: 18 May 2023).

**Charland, N., Kellens, J. T., Caya, F., & Gottschalk, M. (1995).** Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2220–1

**Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., & Karnchanatat, A. (2011).** Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chemistry*, 126(3), 1025–1032.

**Christensen M, Heilmann-Clausen J. 2013.** The genus *Tricholoma*. *Fungi of Northern Europe*, vol. 4 Svampetryk, Denmark.

**Christensen M, Noordeloos ME. 1999.** *Notulae ad floram agaricinam neerlandicam – Tricholoma*. *Persoonia* 17: 295–317.

**Courtecuisse, R. & Duhem, B. (1994).** *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachaux et Niestle.

**Cui, B., Li, L., Zeng, Q., Lin, F., Yin, L., Liao, L.,... & Wang, J. (2017).** A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *Journal of natural medicines*, 71(2): 409-421.

### D

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

**Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., & Jones, K.M. (2002).** *Data For biochemical research*, 3. Clarendon Press.



## Références Bibliographiques

---

**Dong, C.-H., Yang, S.-T., Yang, Z.-A., Zhang, L., & Gui, J.-F. (2004).** A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*, 265(2), 341–54.

### E

**Etzler .M.E. (1986).** Distribution and function of plant lectins in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Orlando (USA) : Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ. Academic Press. Inc. pp 371-437.

### F

**F, K. et al. (2002)** ‘Lectins as markers for blood grouping’, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 8(12). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12503049/> (Accessed: 4 April 2023)

### G

**Gabius. H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985).** Receptor for the cellbinding site of discoidinI. *Cell*.(42),449-456.

**Gianluca, C. (2006).** Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. *Biologie structurale et fonctionnelle (thèse de doctorat)*. Université grenoble I – joseph fourier école doctorale chimie et sciences du vivant

**Goldstein I. J, Poretz R.D. (1986).** Isolation physico-chimical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins In Liener I. *The lectin: properties, function and applications in biologie and médecine*. ELSEVIER. INC, 49-50.

### H

**Hopkins, W.G., Evrard, C.-M. and Rambour, S. (2003)** *Physiologie végétale*. 1er édition. Bruxelles: DE BOECK SUP.

**Houles, C. (2001).** Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes à la jacaline. L’institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp : 11-35

### J

## Références Bibliographiques

---

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

**Jensen, L. E., Hiney, M. P., Shields, D. C., Uhlar, C. M., Lindsay, A. J., & Whitehead, A. S. (1997).** Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 158(1), 384–92.

*Journal du CNRS-N°180-janvier 2005.*

### K

**Kaminski P.A , Buffard D et Strosberg A D. (1987).** The pea lectin genefamily contains only one functional gene. Plant molec. Biol. Vol. 9.N°5, pp 497-507.

**Kamoun P., Lavoigne A., darmon M., Demotes-Mainard J. (2003).** biochimie et biologie moléculaire. flammarion, Paris, France,

**Kawagishi H ., Suzuki H., Watanabe H., Nakamura H., Sekiguchi T., Murata T., et al. (2000).** A lectin from an edible mushroom Pleurotus ostreatus as a food intake-suppressing substance. Biochim Biophys Acta. 1474(3):299-308.

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

**KENOTH.R.** Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to Trichsanthes cucumerina seed lectin . Eur .J.Biochem, **2001**.268:554-5549.

**Kocourek, J., & Horejsi, V. (1981).** Defining a lectin. Nature, 290, 188.

### L

**LABIOD W., SAKHRI M (2023).** L'extraction des lectine à partir des plantes médicinales ocimum basilicum et les tests biologique. Mémoire master. Biochimie. Algérie. Université Constantine 1 frères Mentouri. 29

## Références Bibliographiques

---

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

**Lenka S, Imberty A, Jaroslave K. (2006).**modélisation moléculaire deslectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire*. Université de Grenoble I. France. pp 56- 58.

**Lichtenstein, R. G., & Rabinovich, G. A. (2013).** Glycobiology of cell death: when glycan and lectins govern cell fate. *Cell Death & Differentiation*, 20(8): 976-986.

**Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986).** The lectins Properties. Functions andApplications in biologieand medicine. Academic Press INC. London LID. pp 13-24.

**Lis, H., & Sharon, N. (1998).** Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews*, 98(2): 637-674.

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

**LiuY, Liu J, Pang X, Liu T, Ning Z et ChengG. (2015).** The Roles of Direct Recognition by Animal Lectins in Antiviral Immunity and Viral Pathogenesis. *Molécules*. 20(2), 2272–2295

### M

**Moothoo, D. N., Canan, B., Field, R. A., & Naismith, J. H. (1999).** Man  $\alpha$ 1-2 Man  $\alpha$ -OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. *Glycobiology*, 9(6): 539-545.

### N

**NAIK S. KUMAR S. (2022).** Plant lectins application in biotechnology and treatment : Pant lectins application. *Journal of food science*, 11(4),e4224.<https://doi.org/10.55251/jmbfs.4224>

## Références Bibliographiques

**Necib, Y., Bahi, A., Merouane, F., Bouadi, H., & Boulahrouf, K. (2014).** Comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*. *World journal of pharmaceutical research*, 4(1), 1720-1733.

**Nunes, E. dos S., de Souza, M. A. A., Vaz, A. F. de M., Santana, G. M. de S., Gomes, F. S., Coelho, L. C. B. B., ... Correia, M. T. dos S. (2011).** Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 159(1), 57–63.

### O

**Ottinger, C. A., Johnson, S. C., Ewart, K. V, Brown, L. L., & Ross, N. W. (1999).** Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 123(1), 53–9

### P

**Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995).** Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109(2): 347.

**Peumans.W.J , Vandamme.J.M. (1995).**lectine as plant defense proteins.*Plant Physiol.*109,347-352.

*PharmacolToxicol.* 35, 655-677.

Pierre.M,Iys.M,Secrets des plantes pour se soigner naturellement Relié – 14 mars 2007, 978-2844165862.

Plant Lectin - an overview | ScienceDirect Topics (no date). Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/plant-lectin> (Accessed: 27 March 2023)

**Pontet M. (1996).** Structure et activité biologique d'une nouvelle famille delectines  
aniPrix

### R

**Ramata, N. (2010).** Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des grains d'*Abrus precatorius* L. Université de Bamako. Mali.Pp :8-24.

**Raposo, C.D., Canelas, A.B. and Barros, M.T. (2021)** 'Human Lectins, Their

## Références Bibliographiques

---

Carbohydrate Affinities and Where to Find Them', *Biomolecules*, 11(2), p. 188.

URL: <https://doi.org/10.3390/biom11020188>.

**Rea, R.L., Thompson, L.U. and Jenkins, D.J.A. (1985)** 'Lectins in foods and their relation to starch digestibility', *Nutrition Research*, 5(9), pp. 919–929.

URL: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(85\)80105-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(85)80105-6)

Régis Courtecuisse, Bernard Duhem. Guide des champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé, 2013

**Renato, D., Moreira, A. (1991).** "Plant lectins, chemical and biological aspects". The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Vol. 86. Suppl. II, 211-218.

### S

**Saha R.K., Acharya S., Jamiruddin M., Roy P., Islam M.M.S. et Shovon S.S.H. (2014).**

Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *J. Phyto.* 3: 44-51.

**Sánchez-García M, Matheny PB, Palfner G, et al. 2014.** Deconstructing the Tricholomataceae (Agaricales) and introduction of the new genera *Albomagister*, *Corneriella*, *Pogonoloma* and *Pseudotricholoma*. *Taxon* 63: 993–1007.

**Sano, K., Ogawa, H. (2014).** Hemagglutination (inhibition) assay. In *Lectins* (pp: 47-52). Humana Press, New York, NY

**Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014).** "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.

**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*, Vol. 14. Pp. 53-62.

## Références Bibliographiques

---

**Singh, R. S., Walia, A. K., & Kennedy, J. F. (2019).** Purification and characterization of a heterodimeric mycelial lectin from *Penicillium proteolyticum* with potent mitogenic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*.

**Singh, R.S., Walia, A.K. and Kennedy, J.F. (2020)** ‘Mushroom lectins in biomedical research and development’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, pp. 1340–1350. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.180>.

### T

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

**Tasumi, S., Yang, W.-J., Usami, T., Tsutsui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., ... Suzuki, Y. (2004).** Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(4), 325–35.

**TOUMI Mohammed Esseddik , ( 2021 )** , Purification et caractérisation des lectines à partir des champignons : *Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus* avec des tests biologiques .

**Tripathi, M. (2021)** ‘Carbohydrate Binding Proteins: Lectins’, 10(160).

### U

**Utarabhand, P., Rittidach, W., & Pajit, N. (2007).** Bacterial agglutination by sialic acid specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. *ScienceAsia*, 33, 41–46.

### V

**Van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. (2008).** Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 9(6): 593.

### W

**Wang, X., Zhang, J., Wu, J., Lim, Y.P. (2016).** Antioxidant and antiproliferative activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves. *Journal of Functional Foods*, 24, 32-45.

## Références Bibliographiques

---

**wangh .N.G .T.G. (1998).**Ribosome inactivating protein and lectin from bittermelon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparaisn with related protein. *Biochemical and biophysical research communication.*253, 143- 146.

**Wasser, S.P., & Weis, A.L. (1999).** Therapeutic effects of substances occuring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19(1), 65-96.

**Wood, S. D. (1995).** Crystallographic Studies of Molecules of Biological and Chemical Interest. Liverpool John Moores University, England.

### X

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

### Y

**Yau T, Dan X., Ng C.C.W., Ng T.B. (2015).** Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*, 20(3):3791-810.

### Z

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

**Zitouni, A. and Necib, Y. (2017b)** ‘Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur Des lectines fongiques de *Terfèzia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara)’



# **Annexes**



## Annexes

### Annexe 01

\_ préparation des tampons

Composition	PM (g/mol)	Molarité mM	PBS-EDTA Disodique PH 7,4 10X	PBS1X (10Mm) PH 8 ,4 (NaCl 0,5M)	PBS 1X (10 Mm) PH 8,4 (NaCl 1M)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141 .96	10	14.196 g	1.4196 g	1.4196 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.086	2	2.7 g	0.27 g	0.27 g
KCl		2.7	2g	0.2 g	0.2 g
NaCl	58.44	137	80 g	29.22 g	58.44 g
EDTA-Na2	372.24	2	7.44 g	/	/
Eau distillée	/	/	1000 mL	1000 mL	1000 mL

- Préparation des solution tampons à pH ( 2.5 – 6 ) :

Tampon	PH	Molarité	Composition	Qantité	Volume
glycine-HCl	2.5	20 mM	Glycine	1.5 g	1000mL
			HCl	Quelques gouttes	
Sodium acétate- Acide acétique	6		Sodium acétate	2.72 g	
			Acide acétique	Quelques gouttes	

## Annexes

**Tableau** : précipitation avec sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  des protéines.

% 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

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

### Annexe 02 : chromatographie échange d'anion



### Annexe 03

- Dosage des protéines (méthode du Bradford , 1976) :

A- Pour préparer le réactif de Bradford :

1. commencez par dissoudre 100 mg de Bleu de coomassie R-250 dans 50 mL d'éthanol à 96° ou absolu.
2. Ensuite, ajoutez 100 mL d'acide ortho-phosphorique ou phosphorique à 85%. Sous agitation constante, complétez avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume final de 1 L.
3. Après agitation, filtrez le mélange trois fois à travers du papier Whatman N° 3 ou 1 pour éliminer les excès et les particules non solubilisées 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:

Pour préparer la gamme d'étalonnage de BSA, conservez le réactif au réfrigérateur à 4 °C, à l'abri de la lumière. Utilisez une solution mère de BSA (sigma) à une concentration de 1 mg/mL préparée dans un tampon PBS 10 mM à pH 7,4.

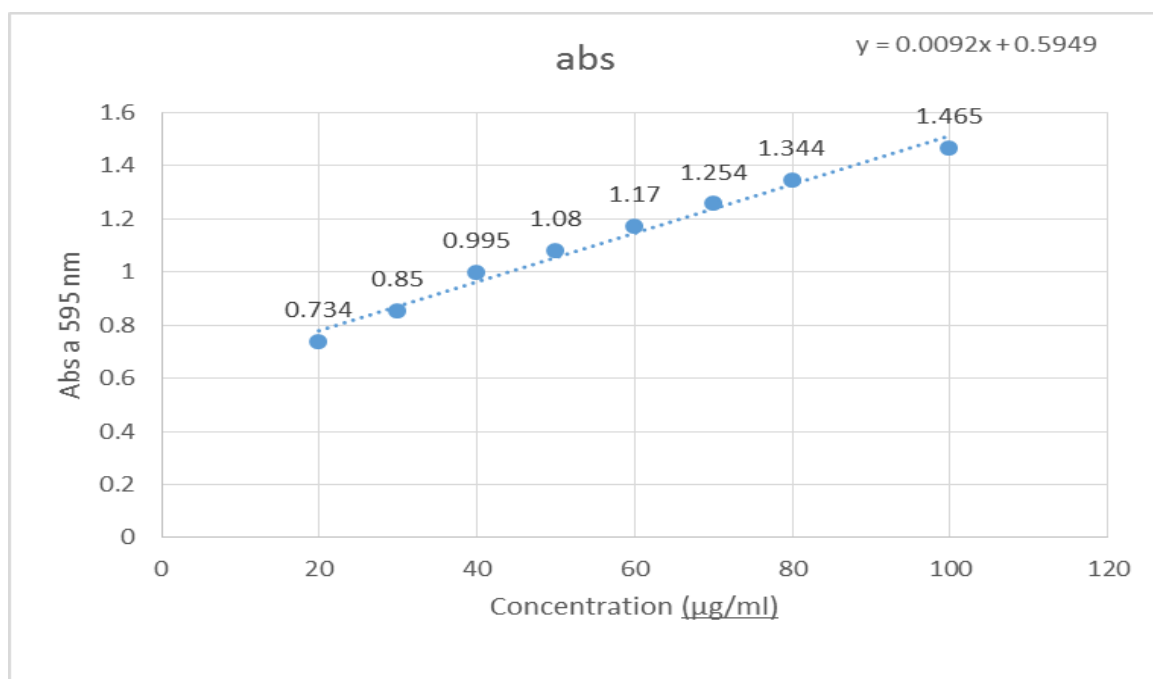
Les dilutions : 20 , 30, 40 , 50, 60, 70 , 80 et 100 ug /mL chaque dilution se répète trois fois.

Dilution ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	200	300	400	500	600	700	800	1000
BSA (1mg/ml)( $\mu\text{L}$ )	20	30	40	50	60	70	80	100
E. Distillée ( $\mu\text{L}$ )	80	70	60	50	40	30	20	0
Réactif de Bradford (mL)	4							

Les densités optiques mesurées à 595 nm correspondent à la gamme

## Annexes

Concentration de BSA (1mg/ml)( $\mu$ L)	20	30	40	50	60	70	80	100
DO 1	0,718	0,838	0,987	1,079	1,189	1,241	1,329	1,471
DO 2	0,749	0,837	1	1,111	1,198	1,232	1,352	1,471
DO 3	0,735	0,880	1	1,078	1,134	1,290	1,352	1,455



$$y=0,0092x +0,5949$$

**La gamme d'étalonnage de BSA.**

**Intitulé : L'extraction des lectines à partir d'un champignon *Tricholoma sp*****Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master****Spécialité : Biochimie****Résumé :**

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, d'origine non immunitaire. Elles sont souvent multivalentes et possèdent la capacité bien connue d'agglutiner les érythrocytes.

Dans ce travail on a choisi le champignon de *Tricholoma sp* comme source pour l'extraction des lectines après macération de la poudre fongique par un tampon PBS.

L'étude vise à identifier les lectines du champignon *Tricholoma Sp* en utilisant le test d'agglutination avec le sang de lapin (3%) qui est une étape essentielle qui indique la présence des lectines. Plusieurs tests sont utilisés comme les effets du pH, la température, des métaux et les interactions avec les sucres.

L'activité agglutinante de l'extrait de *Tricholoma sp* a montré une activité hémagglutinante avec les érythrocytes du lapin.

Le test d'inhibition par différents glucides a montré une affinité avec quatre sucres et avec un glycoprotéine.

Le traitement thermique de l'extrait de *Tricholoma sp* a stimulé l'activité agglutinante de l'extrait à (T=40°C), puis elle a disparu totalement à (60°C, 80°C, 100°C).

La lectine de *Tricholoma sp* n'a aucune activité lectinique dans les milieux très acide et très basique. Mais elle est maximale dans pH 7 (pH optimal).

Après l'application d'effet des métaux (CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>) par test hémagglutination indique que la lectine est métalloprotéine.

L'utilisation de l'extraction par filtration sur colonne de DEAE-Séphacyl donne 4 pics.

Mot clés : Lectine, Hémagglutination, inhibition, sucres, protéines, Extraction, affinité.

**Laboratoire de recherche :**

Laboratoire de Génie microbiologique et applications (LGMA-U Constantine 1 Frères Mentouri).

**-Président du jury :** NOUADRI Tahar MCA –UFM Constantine 1

**-Rapporteur :** NECIB Youcef (Professeur - UFM Constantine 1)

**-Examineur :** TOUMI Med Es-Seddik MCB-UFM Constantine 1