



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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

Caractérisation partielle des lectines de psallote jaunissante : *Agaricus xanthodermus*

Présenté et soutenu par : Bouzergui Dalel

Le : 02/07/2017

Hamames Houda

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr **Khelifi D** Professeur-UFM Constantine

Rapporteur : Mr **Zitouni A** Maître de conférence-UFM Constantine

Examineurs : Mme **BAHI A** Maître de conférence-UFM Constantine

Année universitaire

2016/2017

Remerciements

Avant tout, Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre dieu de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail et nous mener vert le chemin du savoir.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont soutenues pour la réalisation de ce projet.

Nous adressons nos premiers remerciements à notre encadreur Mr Zitouni Abdelbaki maitre de conférence à l'université des frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils et ses remarques qui nous ont été d'une aide précieuse.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail.

Un grand merci pour le docteur Toumi Sadik Eddine par son aide et ses conseils.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme Djemai Zoughlache S, pour toute l'aide qu'elle nous a prodigué.

Nous tenons particulièrement à témoigner nos sincères remerciements à Monsieur le professeur Khelifi Douadi de nous avoir accueilli avec

bienveillance au sein de son laboratoire, et bien sur d'avoir accepté de présider notre jury.

Nous tenons aussi à remercier Mr Belbahri Laid pour son accueil au niveau de laboratoire d'animalerie et sa patience.

Nos remerciements s'adressent également aux ingénieurs des laboratoires de Biochimie, d'Enzymologie et de Biochimie-moléculaire pour leur soutien matériel et courtoisie: Houcine, Leila, Sadek, Nabil et Amar.

Sans oublier notre camarade Abdi Nesrine avec laquelle on a travaillé et qui a pris une part active aux opérations. Tous les moments que nous avons passés ensemble au travail et en dehors resteront à jamais gravés dans nos pensées.

A tous les enseignants du département Biochimie, faculté des sciences de la nature et de la vie.

Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dalel et Houda



Dédicace

L'idée de l'avenir est plus féconde que l'avenir lui-même.

Henri Bergson

*Je dédie ce travail qui est le fruit des années d'études qui sont pleines de réussite, d'amour, de joie et de bonheur, qui m'ont aidé dans toutes les phases de ma vie. À celle qui s'est sacrifiée pour mon éducation et pour mon bien être **ma chère mère.***

À mon cher père pour son soutien et son encouragement.

*À Ma grande sœur **Loubna**, ma deuxième mère : Pour son amour, son encouragement et ses prières.*

À tous mes chers(es) frères et sœurs.

*À mon binôme : **Hamames Houda***

*À mes amis (es) : **Hanène, Nesrine, Soumia, Yasmine, Amina, Lamis, Iméne, Aymen, Mohsen, Younes, Saad Eddine, Haithem et Sajed.***

À tous mes camarades de promotion 2016-2017.

À toute ma famille et à tous ceux que j'aime

Dalel

Dédicace

Au terme de ce travail, on tient à remercier en premier lieu 'ALLAH' le bon dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné force, volonté, et patience qui nous ont permis d'achever cette modeste étude.

Je remercie mes très chers parents, Mokhtar et Nabih, d'avoir cru en moi et d'avoir été toujours là pour moi.

Un grand merci également à ma grand-mère qui serait sûrement fière de moi.

Sans oublier ma sœur Fairouze et mes frères pour leur soutien sans failles et leur encouragement.

Je remercie mes oncles et mes tantes, Rabeh, Ahmed et Kadour, Hayat, Sasia et Salima

Je remercie également mon fiancé pour son soutien et son aide inconditionnel.

Ainsi que ma cousine Wafa

Je remercie mon binôme « Dalel » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail

Et enfin je remercie mes amis pour leurs amours et respect tout au long de mon cycle universitaire : Soumia et Yasmine, Nesrine, Amina, Fadila, Roumaissa, Sajed, Haithem.

Houda

Résumé :

Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires, polyvalentes d'origine non-immunitaire, elles reconnaissent spécifiquement certaines structures oligosaccharidiques.

Le but de ce travail est de détecter la présence de lectines dans les extraits du champignon toxique « *Agaricus Xanthodermus* » communément appelé psalliote jaunissante.

Dans notre étude, nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines tout en mettant en évidence leur activité hémagglutinante, cette dernière est stable dans un intervalle de pH allant de 2 jusqu'à 12.

Le traitement thermique de ces lectines révèle une thermo-résistance pouvant atteindre 100°C. Un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et une glycoprotéine et a montré que nos lectines présentent une affinité pour le glucose, le lactose et le saccharose.

La purification de nos protéines est faite par chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose, et à révéler l'existence probable de trois (3) sous-unités dans la SDS-PAGE, la première est un monomère dont la masse moléculaire est de 150 KDa et l'autre est un dimère de 100 KDa dont la masse moléculaire de chaque sous-unité est de 50 KDa.

Mots clés : Lectines, glycoprotéines, *Agaricus Xanthodermus*, activité hémagglutinante, monosaccharides, inhibition, affinité, purification.



Abstract :

Lectins are ubiquitous, polyvalent glycoproteins of non-immune origin, and specifically recognize certain oligosaccharide structures.

The aim of this work is to detect the presence of lectins in the extracts of the toxic fungus "*Agaricus Xanthodermus*" commonly called yellowing psalliote.

In our study, we started firstly by extracting the lectins and demonstrating their haemagglutinating activity in the same time, their pH is stable into an interval from 2 to 12.

The thermal treatment of these lectins reveals a thermo-resistance of up to 100 ° C.

An inhibition test was subsequently carried out with different monosaccharides and a glycoprotein and showed that our lectins have an affinity with glucose, lactose and sucrose.

The purification of our proteins is performed by DEAE-Cellulose gel anion exchange chromatography.

After purification, our lectin revealed three (3) subunits in SDS-PAGE, the first is a monomer which molecular mass is 150 KDa and the second is a dimer of 100 KDA which molecular mass of each sub -units is 50 KDa.

Keywords :Lectins, glycoproteins, *Agaricus Xanthodermus*, haemagglutinating activity, monosaccharides, inhibition, affinity, purification.



ملخص:

اللكتينات هي بروتينات سكرية أو جليكوبروتينات متعددة المصادر والتكافؤ ذات مصدر غير مناعي، يتعرفون بشكل معين وخاص على بعض هياكل السكريات المركبة.

الهدف من هذا العمل هو الكشف عن وجود اللكتينات في مستخلصات من الفطر السام « *Agaricus Xanthodermus* » عادة يطلق عليه اصفرار Psallote.

في دراستنا بدأنا أولاً باستخلاص اللكتينات مع تسليط الضوء على نشاط التراص هذا الأخير مستقر في مجال درجة حموضة من 1 حتى 12.

المعالجة الحرارية لهذه اللكتينات كشفت عن المقاومة للحرارة تصل الى 100°م.

تم تطبيق اختبار التثبيط مع مختلف السكريات الأحادية والجليكوبروتينات حيث أظهرت أن اللكتينات لها خصوصية لل: الجلوكوز، اللاكتوز والسكروز.

تتم تنقية هذه البروتينات بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على هلام سيليلوز-DEAE .

بعد التنقية كشف لنا اللكتين ثلاث (3) وحدات فرعية في SDS-PAGE ، الأول Monomère وزنه الجزيئي 150 كيلو دالتون والآخر Dimère ذو 100 كيلو دالتون حيث أن الوزن الجزيئي لكل وحدة فرعية 50 كيلو دالتون.

الكلمات المفتاحية : اللكتينات، الجليكوبروتينات، *Agaricus Xanthodermus* ، نشاط التراص، السكريات الأحادية، التثبيط، الخصوصية، التنقية.



Sommaire

Sommaire :

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

❖ Introduction générale

Etude bibliographique : Revues Bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les lectines

I. Définition des lectines :.....	01
II. Historique :.....	03
III. La structure des lectines :.....	06
III.1. Les lectines simple :.....	06
III.2. Les lectines en mosaïques :.....	06
III.3. Les assemblages macromoléculaires :.....	07
IV. Les sites de liaisons des lectines :.....	08
V. La spécificité et l'affinité des lectines :.....	09
VI. La Classification des lectines :.....	10
VI.1. Chez les animaux :.....	10
VI.2. Chez les plantes :.....	11
VII. Distribution des lectines dans le monde de vivant :.....	12
VII.1. Les lectines animales.....	12
VII.2. Les lectines des plantes.....	14
VII.3. Lectines des microorganismes.....	15
VIII. Rôle des lectines dans les organismes vivants :.....	20
IX. Propriétés des lectines :.....	22
X. L'intérêt des lectines :.....	23
XI. Le rôle des lectines dans l'immunité :.....	25

Chapitre II : Généralités sur la psallote jaunissante

I. Classification scientifique d'Agaricus xanthodermus :.....	27
II. Guide d'identification :.....	28

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériels :.....	30
I.1. Matériel fongique.....	30
I.2. Matériel animal.....	30
I.3. Protocole expérimental suivi.....	31
II. Méthode :.....	34
II .1. Préparation de l'extrait brut.....	34
II.2. Dosage des protéines.....	34
II.3. Le test d'héماغglutination.....	35
II .4. Effet du pH sur l'héماغglutination.....	36
II .5. L'effet de température sur l'héماغglutination.....	36
II .6. Test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides et une glycoprotéine.....	37
II.7. Le test des métaux (oligoéléments).....	37
II .8. La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions	37
II .9. Séparation des proteines sur gel de polyacrylamide dénaturant : SDS-PAGE	39

Chapitre IV : résultats et discussions

I. Dosage des protéines :.....	41
II. Test d'héماغglutination :.....	42
III. Test de la limite d'héماغglutination :.....	44
IV. Effet de pH sur l'héماغglutination :.....	46
V. Test de la limite de l'effet de pH sur l'héماغglutination :.....	49
VII. Test de la limite de l'effet de température sur l'héماغglutination :.....	50
VIII. Test d'inhibition d'héماغglutination par des saccharides et une glycoprotéine :.....	51
IX. Test de la limite d'inhibition d'héماغglutination par les saccharides :.....	53
X. Test des métaux (oligoélément) :.....	55
XI. La Chromatographie sur colonne DEAE-cellulose :.....	56
XII. SDS-PAGE :.....	59

Chapitre V : conclusion et perspectives

❖ Conclusion

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ACA : *Amaranthus caudatus* lectine.

BSM : mucine submaxillaire bovine.

CMI : concentration minimale d'inhibition d'hémagglutination.

Con A : Concanavaline A lectin.

ConBr: *Canavalia brasiliensis*.

ConM : *Canavalia maritima*.

CRD : site de liaison aux hydrates de carbones (*Carbohydrate Recognition Domain*).

DEAE: Di-Ethyl-Amino-Ethyl.

DO: absorbance.

E.coli : *Escherichia coli*.

EDTA : l'acide éthylènediaminetétraacétique.

Fuc: L-fucose.

Gal: D- galactose.

GalNAc: N- acetylgalactosamine.

GlcNAc: N-acetylglucosamine.

Glc: glucose.

hGal-7: galectin-7.

GNA:*Galanthusnivalis*agglutinine.

Ig: immunoglobuline.

KDa: kilo Dalton.

Man: mannose.

MASPS: MBL-Associated Serine Protéase.

MBL: mannose-binding lectin.

Moringa G: Moringaguilandina.

MoringaM: Moriongamoringa.

NeuAc : acide N-acétylneuraminique.

nm : nanomètre.

N.B : note à bénéf.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

Rip : ribosominactivatingproteine.

RIPs : Ribosomes inactivant les protéines.

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

Tris : 2-amino-[hydroxyméthyl].

WGA: *Wheatgermagglutin.*

VIH: virus de l'immunodéficience humaine.

λ : longueur d'onde.

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 01 : les lectines et leurs applications (Bothan and weil, 2011)	02
Tableau 02 : historique de la découverte des lectines (Renato and moreira, 1991)	04
Tableau 03 : la spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato and moreira, 1991)	09
Tableau 04 : Lectines bactériennes solubles (Kostlanova et al., 2005)	18
Tableau 05 : Lectines de champignons connues (Pemberton, 1994)	19
Tableau 06 : Classification et rôles des lectines dans les organismes vivants (Cioci et al., 2006)	20
Tableau 07 : absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques	41
Tableau 08 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines	41
Tableau 09 : Concentration des protéines	42
Tableau 10 : Agglutination des hématies de lapin avec les quatre surnageants	43
Tableau 11 : Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration	44
Tableau 12 : Test de limite d'hémagglutination de l'homogénat	44
Tableau 13 : Dilution des lectines	45
Tableau 14 : Effet de pH sur l'activité hémagglutinante	46
Tableau 15 : La limite d'hémagglutiation en fonction du pH	47
Tableau 16 : Effet de la température sur l'activité hémagglutinante	49
Tableau 17 : La limite de l'effet de température sur l'hémagglutination	50
Tableau 18 : Test d'inhibition des lectines de l'homogénat avec les saccharides	51
Tableau 19 : Les concentrations minimales provoquant l'inhibition d'hémagglutination	53
Tableau 20 : Test des métaux avec l'homogénat	55
Tableau 21 : l'absorbance en fonction de volume d'élution	56
Tableau 22 : Représentation d'agglutination des fractions	58

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de canavalia ensiformis en complexe avec le tri mannoside (Lenka et al., 2006).....	06
Figure 02 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka et al., 2006)	07
Figure 03 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'Escherichia coli	07
Figure 04 : Role de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Lis and Sharon et al., 1986)	08
Figure 05 : la classification structurale des lectines des plantes (Van Damme et al., 1988)	12
Figure 06 : représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDF 1G1T) (Somers et al., 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets	13
Figure 07 : Tétramère de la protéine ConM de canavalia maritima complexée avec le ttréhalose (Code PDB 2CY6) (Delatorre et al., 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Clacium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets	14
Figure 08 : Récepteur PAPG en complexe avec le tétra-saccharide GBO4 (gauche, PDB 1J8R) et lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (droit, PDB 109W)	16
Figure 09 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt and Hol, 1995)	17
Figure 10 : Représentation d'agaricus xanthodermus	27
Figure 11 : les différentes formes de chapeau d'agaric jaunissant	28
Figure 12 : Représentation de la forme des lamelles	28
Figure 13 : Représentation de la couleur jaune de la tige lors de la coupure	29
Figure 14 : schéma récapitulatif de la procédure expérimentale	33
Figure 15 : diagramme représentant les concentrations de chaque surnageant	43
Figure 16 : courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction du volume d'éluion de différentes fractions	57

Figure 17 : Profil électrophorétique des différentes fractions59

Introduction générale :

❖ Introduction générale :

Les lectines sont définies comme étant des protéines / glycoprotéines possédant au moins un domaine non catalytique qui se lie de manière réversible à un mono- ou oligosaccharide spécifique (**Van Damme et al., 2003**) et ne sont pas impliquées dans la réponse immunitaire classique. La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte de l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Ce phénomène, qui est appelé hémagglutination lorsqu'on utilise des globules rouges, est une caractéristique typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation (**Rüdiger, 1993 ; Goldstein et al., 1980**).

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les branches du règne vivant, chez les animaux, les plantes, les insectes et les microorganismes (virus, bactéries et même les champignons) (**Goldstein, 1978**).

Depuis des décennies, la plupart des études concernant les propriétés biologiques des lectines étaient axées sur les lectines végétales. Mais ces dernières années, les lectines fongiques sont devenues un sujet d'intérêt pour un grand nombre de chercheurs en raison de leurs propriétés biologiques potentiellement exploitables, y compris les anti-tumoraux (**Ye XY et al., 2001**), immuno-modulateurs et anti-insectes (Rubinstein, 2004), antifongiques (**Barrientos et Gronenborn, 2005**), antibactériens (**Pusztai, 1993**), les activités anti-VIH (**Ye XY et al., 2001**) et mitogènes (**Wimer, 1990**).

Le nombre de travaux publiés sur les lectines a vu une grande croissance principalement grâce à l'abondance des lectines dans tous les organismes vivants, accompagné d'une certaine facilité de purification. Dans les derniers temps, on a aussi commencé à considérer les lectines comme des molécules bioactives et on s'est de plus en plus intéressé aux rôles biologiques de ces molécules (**Cioci et al., 2006**).

L'objectif de cette étude consiste en l'extraction, l'identification et une partielle purification d'une nouvelle source de lectine à partir d'une espèce fongique d'agaric jaunissant (*Agaricus xanthodermus*).

Le protocole choisi et suivi est résumé comme suit :

- Extraire les lectines selon une procédure que nous décrirons par la suite.
- Réaliser des tests d'hémagglutination sur l'extrait afin de confirmer leur activité et leur présence.
- Déterminer la limite d'hémagglutination.
- Purifier des lectines par une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.
- Réaliser une SDS-PAGE en conditions dénaturantes pour contrôler la pureté de notre échantillon purifiée.

Toute cette démarche qui a fait appel à autant de méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation de cette lectine sera appuyée de données bibliographiques qui sont représentées dans le premier volet de ce mémoire, avec une présentation générale sur les lectines, leurs structures et les différents rôles qu'on leur attribue. Le second volet décrit des généralités sur le champignon étudié. Le troisième volet décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées. Les deux dernières sections, traiteront des résultats et discussions ainsi qu'une conclusion générale et ses perspectives.

Revue Bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur les lectines

I. Définition des lectines :

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne végétales ou animale, dépourvues d'activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand et non synthétisées par un système immunitaire (**Goldstein *et al.*, 1980**). L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire.

Elles sont capables de reconnaître des glucides simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier de manière spécifique et réversible. (**Lis and Sharon, 1998**).

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (**Rüdiger, 1993**) et leur caractérisation (**Goldstein *et al.*, 1980**).

La liaison entre la lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène (**Kokourek and Horejsi, 1981**).

Les lectines sont dénommées par Boyd en 1954, sous le nom «lectine» dérivée du mot latin «lectus» qui est le participe passé du verbe «légère», qui veut dire «sélectionner» ou «choisir» (**Liener *et al.*, 1986**). Les lectines sont relativement petites, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KDa. Elles sont habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins and Evrard, 2003**).

Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les Cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes, car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses. (**Liener *et al.*, 1986**). Lorsque certains glucides sont

ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spécificité (**Van Damme *et al.*, 1998**).

Lorsqu'il fut découvert qu'elles avaient la capacité de distinguer les divers groupes sanguins humains. Pour un certain nombre d'auteurs, la notion de lectine n'est plus basée sur le pouvoir agglutinant, mais seulement sur la reconnaissance spécifique par la protéine d'un motif saccharidique porté par la membrane d'une cellule (sanguine ou non).

Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés (principalement) par leur traitement thermique dont l'efficacité est fonction de la température et de la durée de traitement (**Meite *et al.*, 2006**). Bien qu'il existe des lectines thermorésistants (**Guillaume, 1993**).

Elles peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon, 1998**).

Quelques lectines importantes sont énumérées dans le tableau 1.

Tableau 1: les lectines et leurs applications (Bothan and Weil, 2011).

Lectines	Exemple et commentaire
Lectine de légumes	ConcanavalineA, lectine de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces ou membranaires de cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricine
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d' <i>E.coli</i> et toxine du cholérae

Hémagglutinine de virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectines animales se lient le B-galactose, elles ont des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

II. Historique :

L'étude des lectines a été introduite par P.H. Stillmark en 1888 .Celui-ci a dans un premier temps mis en évidence l'existence de molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes (**Sharon and Lis, 2004**).Ces molécules ont ainsi été nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines (**Aragao, 2009 ; Poiroux, 2011**).

La première de ces molécules a été extraite du ricin (*Ricinus communis*) et a été appelée Ricine.la même activité a ensuite été découverte dans les extraits du pois rouge (*Abrus precatorius*) par P. Ehrlich : cette molécule a été nommée Abrine (**Poiroux, 2011**).

En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isola à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concavaline A (**Sumner, 1919**). Il fallut patienter presque vingt ans et les travaux de Sumner et Howell en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'hémagglutination de la concavaline A par des saccharoses (**Sumner and Howell, 1936**).

En 1954, Boyd & Shapleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytaires humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and Shapleigh, 1954**).

L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes.

Tableau 2: Historique de la découverte des lectines (Renato and Moreira, 1991).

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

1926-7	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à Hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de <i>PhaseolusVulgaris</i>
1949	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>PhaseolusVulgaris</i>
1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectines
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>PhaseolusVulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse

1990	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules <i>d'E.coli</i>
------	-----------------------	---

III. La structure des lectines :

D'un point de vue structural, les lectines sont classées en trois grandes classes :

III.1. Les lectines simple :

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

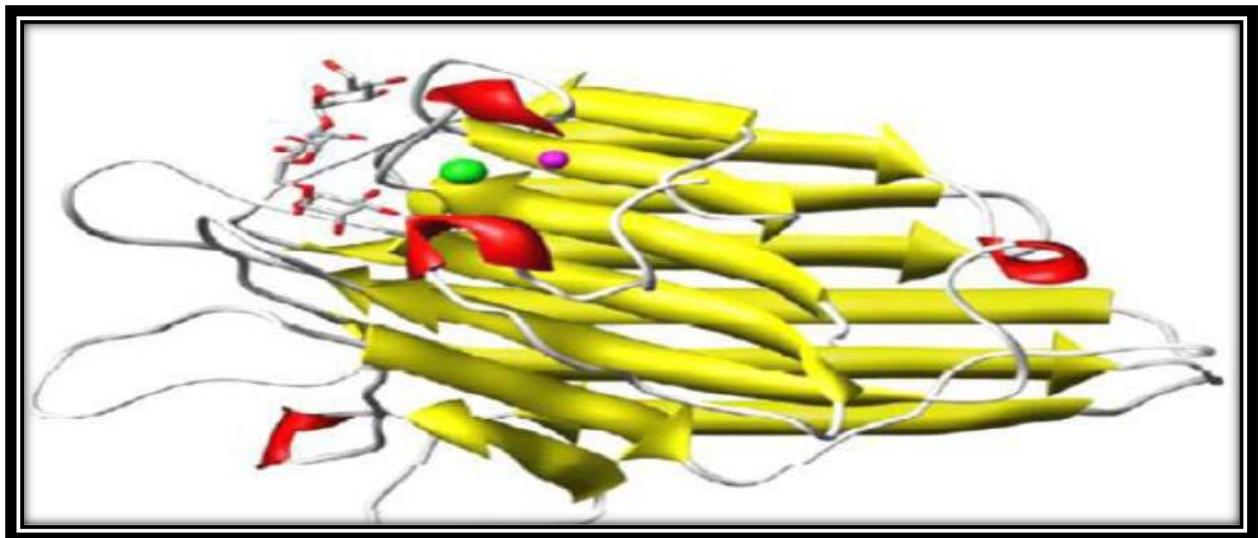


Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le tri mannoside (Lenka *et al.*, 2006).

La protéine est représenté par un ruban rouge pour les hélices α , un ruban jaune pour les brins β et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Lenka *et al.*, 2006).

III.2. Les lectines en mosaïques :

Cette classe regroupe diverses lectines de différentes sources (animale, virus) il s'agit de molécules complexe composée de plusieurs types de domaines ou modules, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al.*, 2006) (figure02).

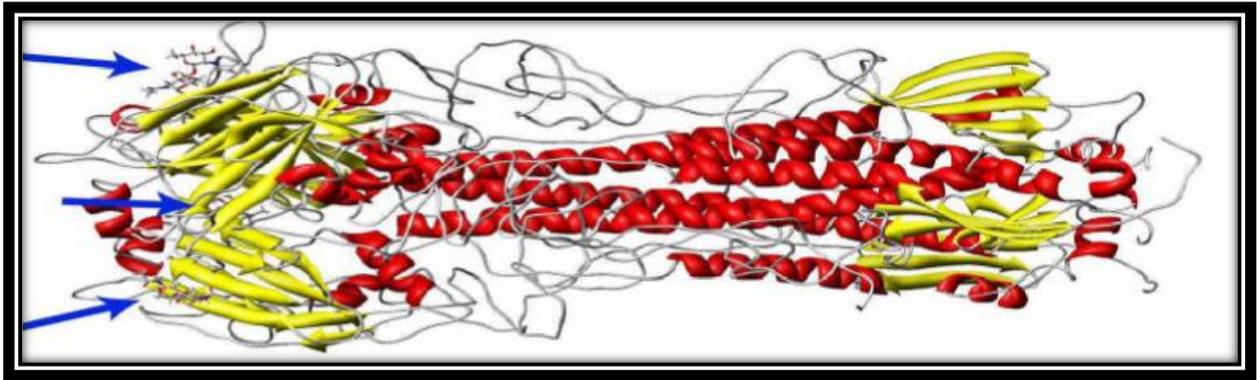


Figure 2: Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

III.3. Les assemblages macromoléculaires :

Les lectines de ce type sont fréquemment trouvées chez les bactéries, où elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, appelées fimbriae ou pili. La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka *et al.*, 2006) (Figure03).

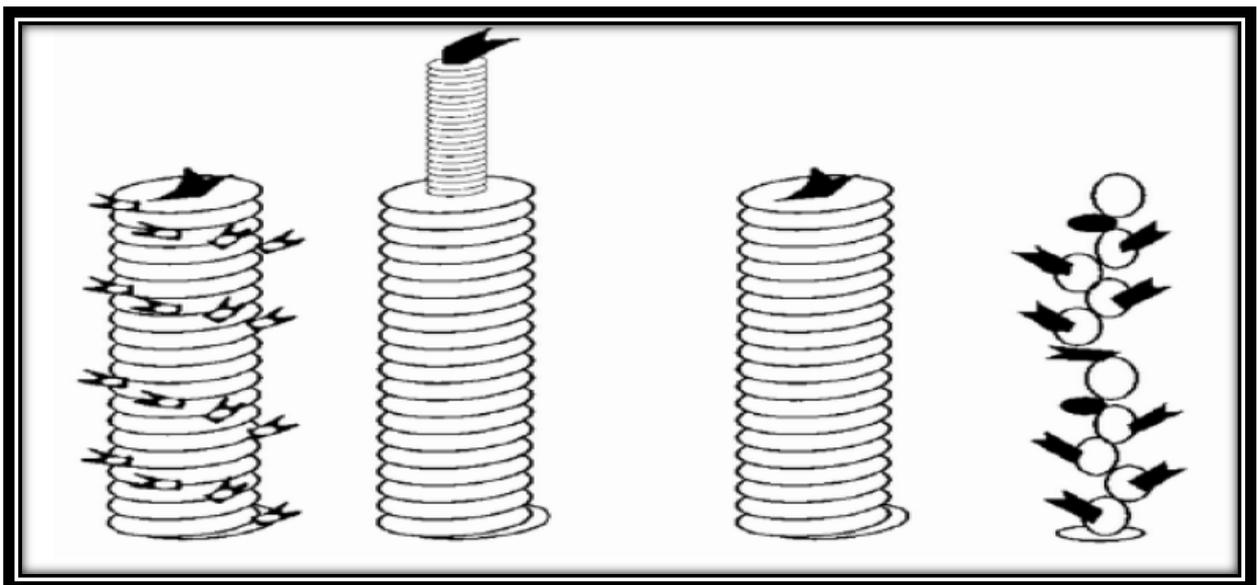


Figure 3: Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia coli*.

IV. Les sites de liaisons des lectines :

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux (des dépressions peu profondes) sur la surface de la protéine dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes (Vyas, 1991).

La forme de site ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand c'est-à-dire que Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lie (Gabiuset *al.*, 1985).. La lectine interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (Goldstein and Poretz, 1986). Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (Pontet, 1996).

Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires et La figure suivante illustre le rôle des glycoconjugués sur la surface cellulaire.

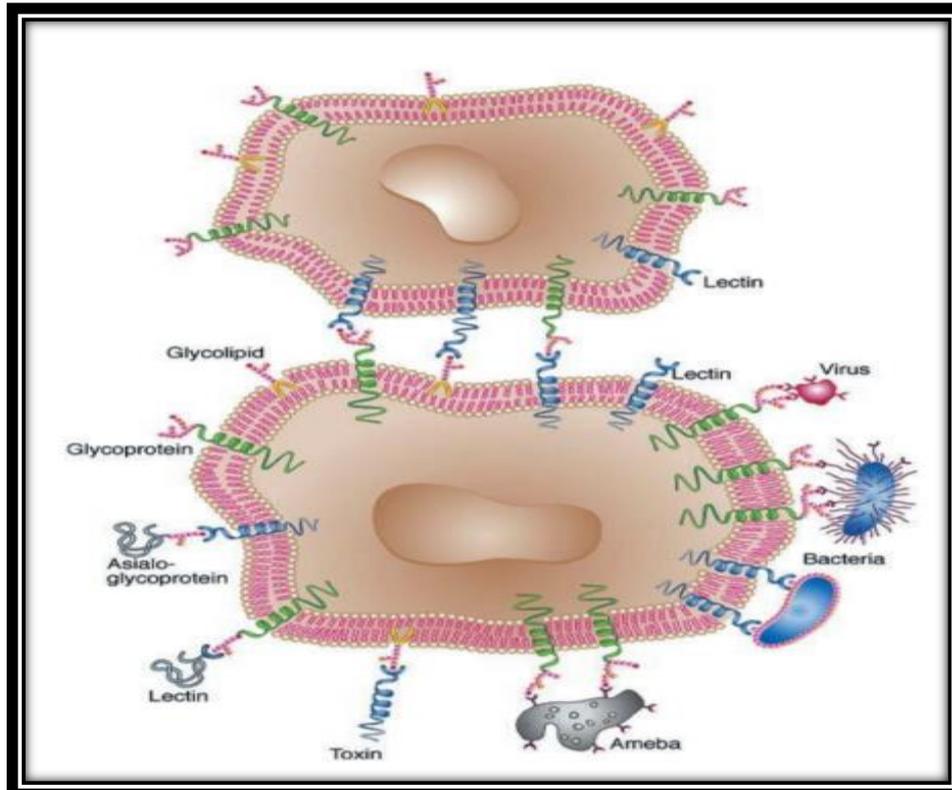


Figure 4: Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Lis and Sharon., 1986).

V. La spécificité et l'affinité des lectines :

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee, 1995**).

La spécificité d'une lectine est généralement définie par les sucres qui inhibent le mieux ses propriétés d'agglutination ou de précipitation (**Robert et al., 2008**).

Il est intéressant de noter que la plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon et al., 2003**).

Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnus par les lectines on retrouve cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le mannose(Man), le fucose(Fuc), le galactose(Gal)/N- acetylgalactosamine(GalNAc), le N-acetylglucosamine (GlcNAc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (**Lis and Sharon, 1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopesglycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (**Dam and Brewer, 2002**).

Tableau 3: La Spécificité osidique de certaines plantes a lectines (Renato andMoreira, 1991)

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal

<i>Adeniadigitata</i>	Gal
<i>Aleuriaaurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man >Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichosbiflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolusvulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulexeuropaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordicacharantia</i>	GalNAc
<i>Cytissussessilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc

VI. La Classification des lectines :

VI.1. Chez les animaux :

a. Les lectines extracellulaires :

Les lectines extracellulaires comprenant toutes les autres familles, comme les lectines de type C et R, ainsi que les galectines. Ces lectines sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance des pathologies (Chabrol *et al.*, 2012).

b. Les lectines intracellulaires :

Les lectines intracellulaires sont composées de quatre groupes ; les calnexines, les lectines de type M, P et L. ces lectines jouent des rôles essentiels dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (**Chabrol et al., 2012**).

VI.2. Chez les plantes :**a. Les mérolectines :**

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 : héveine, protéines d'orchidées), et ils sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules, donc non agglutinantes (**Peumans et Van Damme, 1995**).

b. Les hololectines :

Les hololectines sont des lectines di ou multivalentes c'est à dire ils contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi- identiques ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués et agglutiner les cellules. Elles présentent la majorité des lectines de plantes (exemple : ConBr la lectine de *Canavalia brasiliensis*) (**Van Damme et al., 1998**).

c. Les chimérolectines :

Les chimérolectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison (**Van Damme et al., 1998**). Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se comportent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip ribosominactivatingproteine ; protéine inactivant les ribosomes comme la ricine) (**Peumans et Van Damme, 1995**).

d. Les superlectines :

Les superlectines sont des oligomères poly-spécifiques constitués de plus de quatre monomères, elles sont considérées comme un groupe spécial de chimérolectines composé de deux domaines différents structuralement et fonctionnellement (**Van Damme et al., 1998**).

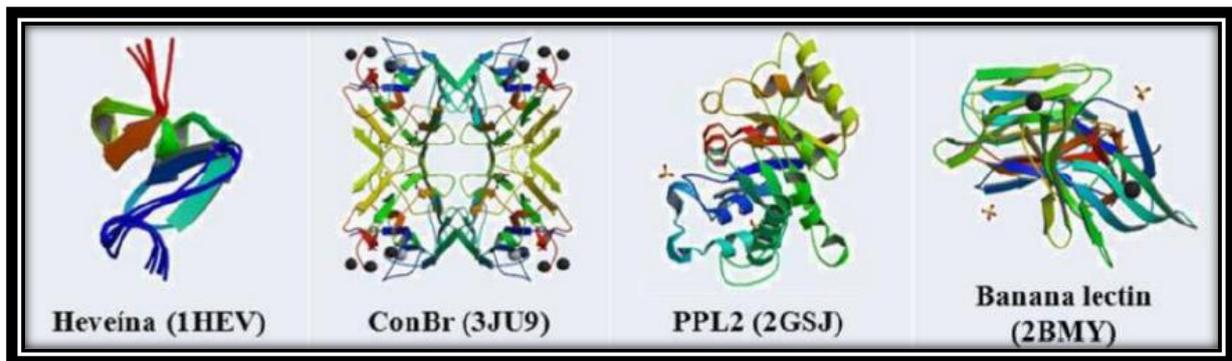


Figure 5: La classification structurale des lectines des plants (Van Damme *et al.*, 1998).

VII. Distribution des lectines dans le monde de vivant :

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants ; chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, insectes et animaux.

VII.1. Les lectines animales :

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes, les trois familles les plus étudiées sont : les *galectines*, les lectines de *type C* et les *siglecs*.

- Les structures de *galectines* sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le β -galactose et plus précisément pour le lactose (β Gal1-4Glc) et le Nacetyllactosamine (β Gal1-4GlcNAc) (Leffler *et al.*, 2004).

La première structure tridimensionnelle d'une galectine humaine (la galectin-7 (hGal-7)) a été obtenue dans sa forme native et complexée avec le galactose, le galactosamine, le lactose, et le *N*-acétyllactosamine (Leonidas *et al.*, 1998).

- Les lectines du *type C* présentent un CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (Drickamer, 1993). Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers *et al.*, 2000), Figure 06.

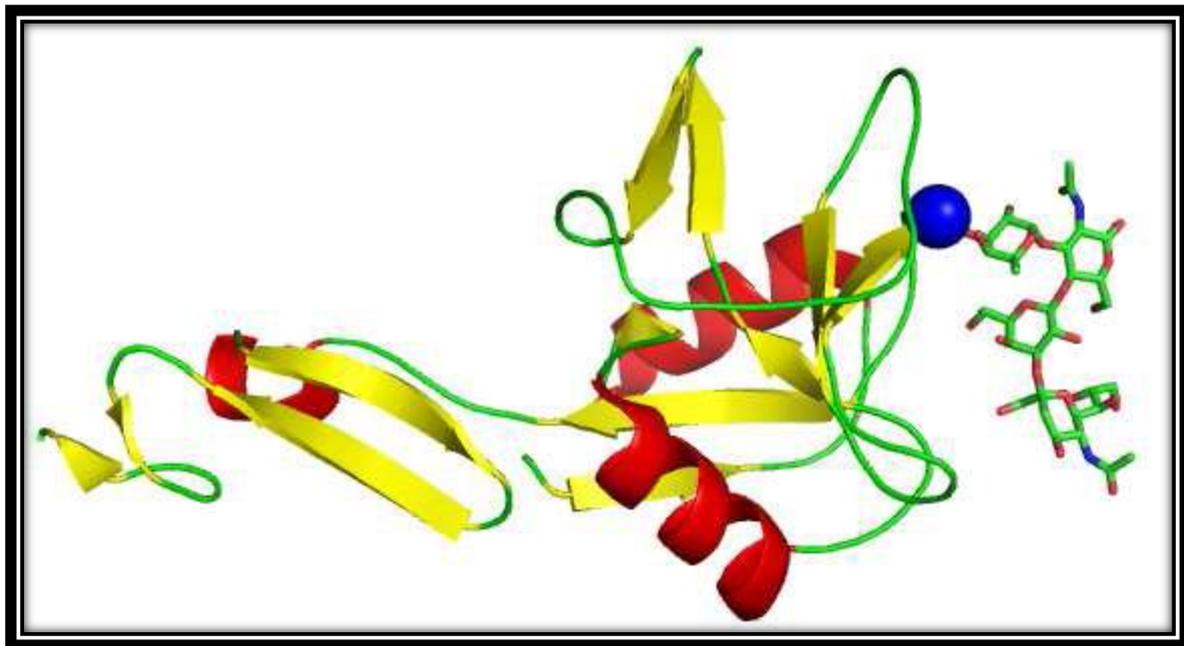


Figure 6: Représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers et al., 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

- Les *Siglecs*, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique (Crocker, 2002). Elles sont membres de la superfamille immunoglobuline (Ig) et adoptent un repliement de type immunoglobuline.
- ✚ Les autres classes de lectines animales comprennent les lectines du *type P* qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CD-MPR (Roberts et al., 1998). Les *pentraxines* qui sont une famille des lectines capables de se lier à des ligands de manière Ca²⁺ dépendante (Emsley et al., 1994). D'autres types de lectines des vertébrés telles que les *calnexines-calreticuline* comme la lectine calnexine de l'espèce *Canis familiaris* (Schrag et al., 2001) et les *ficolines* (Garlatti et al., 2007) ont récemment été mises en évidences.
- ✚ La plupart des lectines de vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des

processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire. (Aragao, 2009).

VII.2. Les lectines des plantes :

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (exemple, les lectines des légumineuse, des céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (Edelman *et al.*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972).

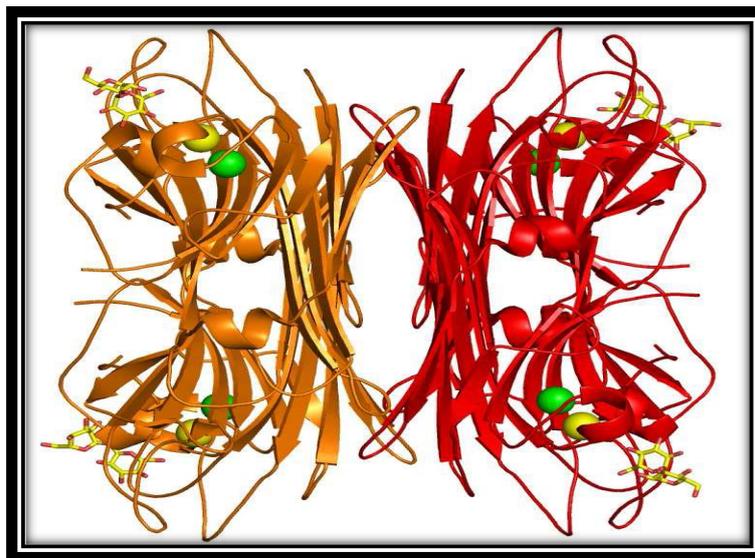


Figure 7: Tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorreet *al.*, 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (Wright, C. S. 1980).

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les Phyto-pathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Chrispeels and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius, 2001**).

VII.3. Lectines des microorganismes :

Les infections sont toujours initiées par l'attachement du microorganisme aux tissus de l'hôte. Ce phénomène implique la reconnaissance des cellules de l'hôte le microorganisme, et nécessite la présence à la surface des deux protagonistes de molécules complémentaires de type récepteur-ligand (**Bouchara and Trouchin, 2003**). Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital. (**Imberty and Varrot, 2008 ; Sharon, 1996**).

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (**Weis et al., 1990**). Les bactéries qui s'attachent aux surfaces s'agglutinent dans une matrice polymère hydrate qu'elles produisent, et donc forment un biofilm (**Imberty, 2011**).

a. Les lectines bactériennes :

Sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol et jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte pendant la première étape du processus d'infection (**Sharon, 1996**).

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

- **Les lectines fimbriaes** : Les bactéries sont dotées d'organelles de surface appelés fimbriae qui servent à différentes fonctions, comme la reconnaissance et l'adhésion sur des surfaces diverses et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes (**Lowet et al., 1996**). Des centaines de fimbriae sont attachés à la surface d'une cellule

bactérienne. Dans les trois types différents de fimbriae qui ont été observés (type 1, type P et type IV) l'organisation structurale est similaire (Soto and Hultgren,1999).

La partie principale qui sort de la surface de la bactérie est une longue superstructure hélicoïdale rigide, assemblée à partir des nombreux monomères de piline (16-22 kDa). Au sommet des pili, on peut avoir la présence d'un domaine lectine relié au dernier monomère du pilus par une partie flexible (monomères adaptateurs).

Les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues jusqu'à aujourd'hui appartiennent aux pili de type 1 ou de type p et montrent que les domaines lectines adoptent des repliements similaires, basés sur une structure allongée de type β -sandwich. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un coté du domaine lectine. (Figure 8).

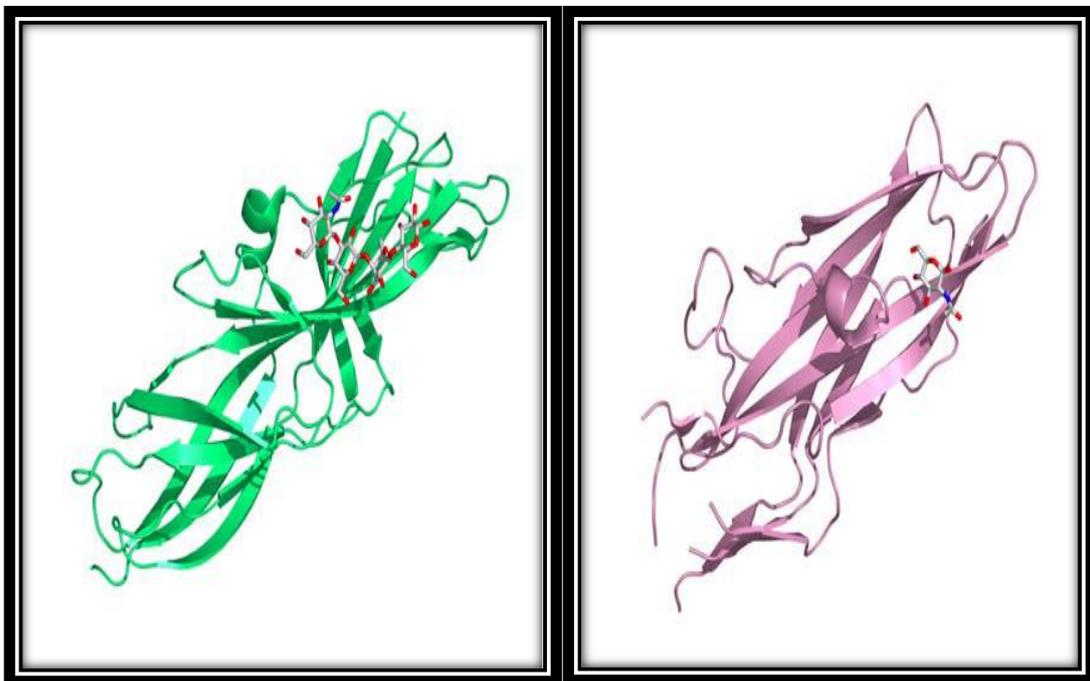


Figure 8 : Récepteur PAPG en complexe avec le tétra-saccharide GBO4 (gauche, PDB 1J8R) et lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (droite, PDB 109W).

- **La famille des toxines :** Les toxines sont des protéines sécrétées par la bactérie qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. L'endommagement de la cellule peut advenir par la rupture de la paroi cellulaire, par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines du type AB₅

sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*E.coli* (ETEC), *Shigella dysenteriae* et *Borderella pertussis*. Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B (**Figure 09**) qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire, comme le GM1, GM2 et le Gb3(**Merritt and Hol, 1995**).

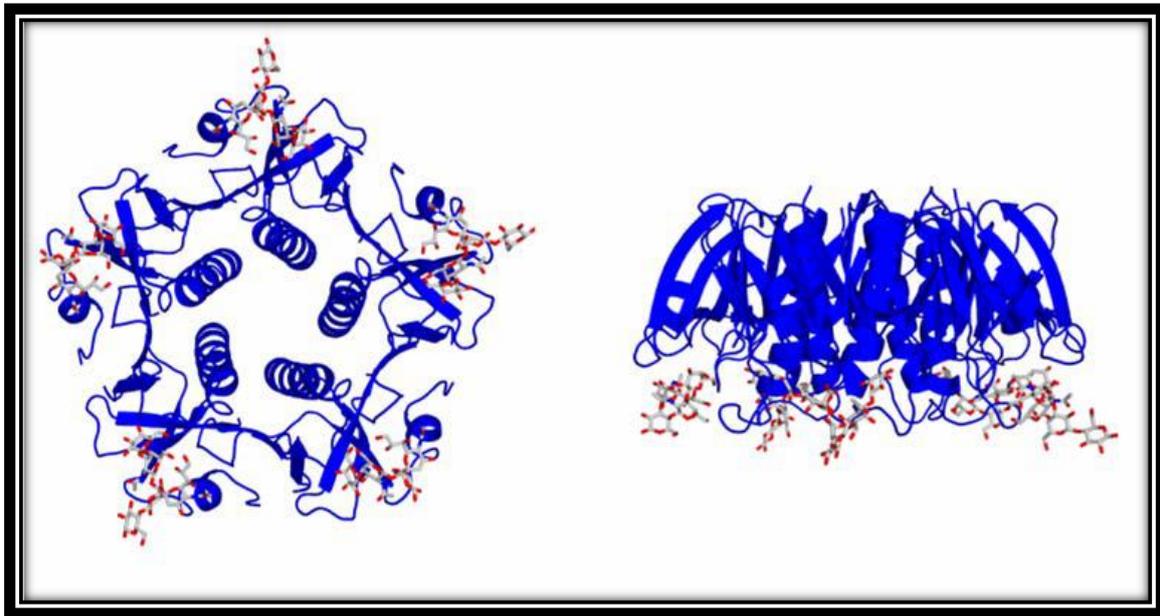


Figure 9 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt and Hol, 1995).

- **La famille de lectines solubles :** Dans cette famille de lectines bactériennes on regroupe toutes les protéines cytoplasmiques solubles exprimées par la bactérie ayant une affinité pour des sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique.

Deux lectines, nommées PA-IL et PA-IIL sont produites par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* respectivement spécifiques pour le D-galactose et le L-fucose. Elles présentent des structures tétramériques ou un ou deux ions calciums respectivement sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre (**Imberty et al., 2004**). *Chromobacterium violaceum* est aussi un pathogène pour les humains et produit une lectine, CV-IIL, ayant une forte homologie de séquence avec PA-IIL.

Tableau 4 : Lectines bactériennes solubles (Kostlanova et al., 2005).

Nom	Type	Spécificité	Caractéristiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-II	Pathogène humain	galactose	Lectine cytotoxique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-III	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute affinité vers le fucose
<i>Cromobacterium violaceum</i> CV-III	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute homologie avec PA-III
<i>Burkholderia cenocepacia</i> BCLx	Pathogène humain	fucose/mannose	Gènes identifiés homologues à PA-III
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS-III	Pathogène végétal	mannose/fucose	Très haute homologie avec PA-III
<i>Ralsonia solanacearum</i> RSL	Pathogène végétal	fucose	Similaire à <i>Aleria arantia</i> lectin, une lectine de champignon
<i>Cyanovirin-N</i>	Cyanobactérie	Man8-9	Puissante activité antivirale

b. Les lectines de champignons :

Les champignons, y compris les moisissures et les champignons proprement dits, font partie d'une importante classe d'organismes. N'étant pas capable d'utiliser la photosynthèse comme les plantes ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils se nourrissent et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui leur confèrent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques.

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

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons a été principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (She *et al.*, 1998 ; Size *et al.*, 2004)

Tableau 5: Lectines de champignons connues (Pemberton, 1994).

Champignon	Année	Caractéristique et spécificités
<i>Aleria arantia</i> (AAL)	2003	Fucose β - propeller 6 lames
<i>Flammulina velutipes</i> (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
<i>Xerocomus chrysenteron</i> (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
<i>Coprineus cinerea</i> (CGL2)	2004	Gal Galectine
<i>Agrocibe cylindracea</i> (ACG)	2005	Gal Galectine
<i>Agaricus bisporus</i> (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
<i>Laetiporus sulphureus</i> (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
<i>Psathyrella velutina</i> (PVL)	2006	GlcNAC/NeuNAc β -propeller à 7 lames

➤ **Caractéristiques des lectines de champignons :**

Les lectines de champignon qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en terme de taille (12-190 kDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines.

De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

➤ **Rôles des lectines de champignons :**

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (**Guillot and Kanska.,1997**). Elles joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la morphogénèse du corps fructifère ou comme protéines de défense immunitaire. Chez les saprophytes, les lectines pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats nutritifs. Par contre, chez les champignons qui adoptent un mode de vie parasitaire ou symbiotique avec d'autres organismes, les lectines sont probablement impliquées dans les processus de reconnaissance de l'hôte ou dans les premières étapes de la mycorrhization (**Giollant et al., 1993**).

VIII. Rôle des lectines dans les organismes vivants :

Le tableau suivant récapitule le rôle des différentes lectines chez les bactéries, les virus, les toxines et les plantes.

Tableau 6: Classification et rôles des lectines dans les organismes vivants (Cioci et al., 2006).

Lectine		Rôles
Bactéries	Lectine fimbriales	Adhésion, infection
	Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm

Toxines		Adhésion, infection
Virus	Influenza haemagglutinine	Adhésion, infection
Amoeba	Lectines de surface	Adhésion
Plantes	Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
	Autres	Défense
Animaux	Calnexine	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
	M-type	Dégradation des protéines dans le RE
	L-type	Contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines
	P-type	Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose, régulation du cycle cellulaire, modulation des interactions cellule-cellule et cellule-substrat
	C-type	Adhésion cellulaire (selectines), Clairance des glycoprotéines, Réponse immunitaire (collectines)
	Galectines	Reconnaissance des glycannes dans la matrice extracellulaire
	I-type	Adhésion cellulaire dans le CNS (siglecs)
	R-type	Ciblage des enzymes,

		régulation du turnover des Hormones
--	--	-------------------------------------

IX. Propriétés des lectines :

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées.

IX.1. L'interaction lectine–glucide :

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (**Myoshimet *et al.*, 1982**).

Les lectines sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres (**Jain *et al.*, 2001**), ces glycanes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine. La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakashet *et al.*, 2003**).

IX.2. Agglutination cellulaire :

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes a un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans and Vandamme, 1995; Wanhg and NG, 1998**).

IX.3. Activité mitogène :

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Nachbaret Oppenheim, 1980 ; Falasca, 1989 ; Babosa, 2001**).

IX.4. Effets mimétiques des hormones :

Les lectines des graines d'haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines d'haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (**Greeret *et al.*, 1985**).

IX.5. Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses :

Les travaux de **Valentier et al., (2003)** suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme in vitro. Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Poiroux, 2011**). Egalement ils inhibent leur migration (**Banwell, 1983**).

IX.6. Actions antivirales :

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (**Wang and NG, 1998**). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius* (**Lopez, 2003**).

IX.7. La propriété antibactérienne :

Les lectines sont des outils de régulation de la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (**Tanne et Neyrolles, 2010**). Les lectines de type C résistent contre la bactérie *Listeria monocytogenes* (**Mukherjee et al., 2014**). Concernent les lectines humain de type L (LTLs), elles ont la capacité d'agglutinées les bactéries par une manier calcium dépendent ou par leurs opsonisation en fixent sur les glycoconjugués de ces micro-organismes (**Zhang et al., 2012 ; Huang et al., 2014 ; Xu et al., 2014**).

IX.8. Autres propriétés :

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (**Nachbaret Oppenheim, 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes, 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreuy, 1997**) et l'induction de l'apoptose (**Kulkarni, 1998**).

X. L'intérêt des lectines :

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans

des processus pathologiques (**Lis and Sharon ,1998**). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

X.1. En biochimie et protéomique :

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...) .Les glycoprotéines éventuellement après clivage enzymatique , peuvent ainsi être caractérisées quantitativement(structure des complexe et interaction) (**Dole A and LindebergS, 2005**).

X.2. Dans le domaine biomédical :

a. Hématologie :

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Sharpleigh, 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

b. Immunologie :

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent et réutilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**). Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques(**Jaffe, 1980**).

c. Biologie cellulaire :

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (**Jaffe, 1980**).

d. Cancérologie :

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycannes présents sur les cellules (**Guillot et al., 2004**). **Kenoth et al.,**

(2001) rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

X.3. Dans le domaine agronomique :

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (Murdock and Shade, 2002).

XI. Le rôle des lectines dans l'immunité :

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la défense naturelle, il a la capacité de reconnaître les agents étrangers à l'organisme, mettant en jeu deux types de défenses : les défenses non spécifiques, naturelles ou innées et les défenses spécifiques ou adaptatives

La modulation du système immunitaire (immunomodulation ou immunostimulation) est devenue un aspect important de la recherche anti-infectieuse. En effet, l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire peut engendrer des conséquences néfastes pour l'hôte.

Les immunostimulants ont une action plus générale sur le système immunitaire et peuvent modifier simultanément plusieurs réponses immunologiques.

Les lectines sont utilisées en immunologie par Paul Ehrlich au début des années 1890, comme antigène. Les changements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans les lymphocytes stimulés par les lectines *in vitro* ressemblent à la plupart des réactions immunitaires provoqués par un antigène qui se déroulent *in vivo* (Sharon, 1983). Dans les cellules animales les lectines jouent un rôle dans la défense dans le cadre d'une réponse de l'immunité innée (De Hoffet *al.*, 2009). Le système du complément, son activation peut être initiée par des complexes immuns (voie classique), par des oligosaccharides microbiens (voie des lectines) ou par divers composants de surface des pathogènes (voie alterne) (Cavaillon, 2005). La voie lectine est initiée par la fixation de diverses lectines, telles la MBL, sur des résidus glucidiques de membranes microbiennes, cette interaction permet de l'activation des protéases MASPS (MBL-Associated Serine Protéase) (Ayméric et Lefranc, 2009). La lectine liant le mannose (mannose binding lectin, MBL) est une molécule de la reconnaissance de la voie lectine du complément qui joue un rôle dans l'immunité innée (Rooset *al.*, 2007). Les invertébrés n'ont pas un système immunitaire adaptatif et les lectines jouent un rôle important

dans leurs systèmes immunitaires innés en reconnaissant microbes ou agents pathogènes (**Kawsaret *al.*, 2010**). La phagocytose se produit lorsque les microorganismes entrent en contact avec les membranes cellulaires des phagocytoses. La première étape consiste en l'adhésion des microorganismes à la membrane des phagocytoses grâce à l'existence de lectines de surface. Ces lectines reconnaissent des structures glucidiques présentes sur les glycoprotéines ou des glycolipides des membranes externes notamment bactériennes : récepteur de mannose – fucose, récepteur de galactose et récepteur de β -glucane (**Guénardet *al.*, 2001**).

Chapitre II :
Généralités sur la psalliotte
jaunissante

Notre travail de recherche portera sur un champignon de la famille d'**Agaricacées**.

Les Agarics sont appelés aussi psalliottes, sont des champignons basidiomycètes. Il existe plusieurs espèces, qui, pour la plupart, se ressemblent fortement et donc difficiles à différencier. Cette dernière peut se faire surtout sur la base de leur habitat, leur odeur, leur taille, leur anneau et la coloration que prend leur chair à la cassure ou aux blessures.

Parmi ces Agarics, on a choisi une espèce toxique *Agaricus xanthodermus* communément connu sous le nom de champignon à coloration jaune ou tout simplement le colorant jaune. Il possède d'autre nom comme : Agaric jaunissant, Psalliota xanthoderma ou psalliotte jaunissante.

- ✓ La description officielle et la dénomination d'*Agaricus xanthodermus*, en 1876, a été réalisée par le botaniste français **Léon GastronGenevier**.

<http://champyves.pagesperso-orange.fr/champignons/fichier-htm/lames/agaric-jaunissant.htm>



Figure 1: représentation d'*Agaricus xanthodermus*

I. Classification scientifique d'*Agaricus xanthodermus* :

Règne : *Fungi*
Division : *basidiomycota*
Classe : *Agaricomycètes*
Sous – classe : *Agaricomycetidae*
Ordre : *Agaricales*

Famille : *Agaricaceae*

Genre : *Agaricus*

Espèce : *Xanthodermus*

Nom binominal : *Agaricus xanthodermus*

<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Agaric-jaunissant>

II. Guide d'identification :

a. Le chapeau de psalliotte jaunissante :

Blanc sale, parfois teinté de gris-fauve au centre, ce tachant de jaune très rapidement au toucher ou aux blessures, soyeux et lisse. Possède un aspect globuleux ou en cloche presque cylindrique, au sommet aplati, avant de s'étaler. La marge du capuchon se développe pour devenir largement convexe et enroulée, floconneuse, brièvement striée.



Figure 2 : les différents formes de chapeau d'agaric jaunissant

b. Lamelles :

Libres, serrées, inégales, étroites de couleur blanchâtres puis roses et enfin brunes chocolatées en vieillissant.



Figure 3 : représentation de la forme des lamelles.

c. La tige :

Possède une surface lisse et soyeuse et une base bulbeuse. Une grande bague pendulaire blanche persiste jusqu'à la maturité.

Lors de la coupe, la chair de la tige tourne rapidement du blanc au jaune chrome, le plus nettement à la base de la tige.



Figure 4 : représentation de la couleur jaune de la tige lors de la coupure.

d. Odeur/ goût :

L'Agaric émet une odeur notable d'encre, de phénol, d'iode en particulier lorsque la chair est écrasée ou coupée. Lors de la cuisson, l'odeur phénolique s'intensifie.

Spores : brun-noirâtre.

e. Répartition et habitat :

L'agaric pousse à la suite des premières chaleurs, il apparaît dès fin mai quand les conditions de chaleur et d'humidité lui sont favorables, jusqu'à la fin de l'automne. Il est très répandu dans les bois, les pelouses, au bord des parcs, des jardins et les haies en automnes

<http://micologia34.canalbolog.com/archives/2010/09/05/18986288.html>

Chapitre III :
Matériels et méthodes :

Matériels et méthodes :**I. Matériels :****I.1. Matériel fongique :**

Nos travaux ont été effectués sur un champignon appartenant à la famille des agaricacées. Il s'agit d'*Agaricus xantheroides*.

a. Récolte :

Les champignons étudiés ont été récoltés de la région de *Tidis* de Constantine au mois de mars 2017.

b. Conservation :

Les champignons sont conservés au frais.

I.2. Matériel animal :

Les hématies utilisées sont issues de sang du lapin pour réaliser les tests d'hémagglutination.

I.3. Protocole expérimental suivi :



320g d'*Agaricus xanthodermus* sont rendus en

Poudre grâce à l'azote liquide

Dilution

10g d'échantillon dans 45ml de
PBS à raison de 4,5ml/g

1^{ère} Centrifugation

4.000tr/min

Culot 1

surnageant 1

C1 + PBS 24h

S1

3^{ème} centrifugation

12.000 tr/min

2^{ème} centrifugation

12.000 tr/min

Culot 1'

Surnageant 3

Culot 2

surnageant 2

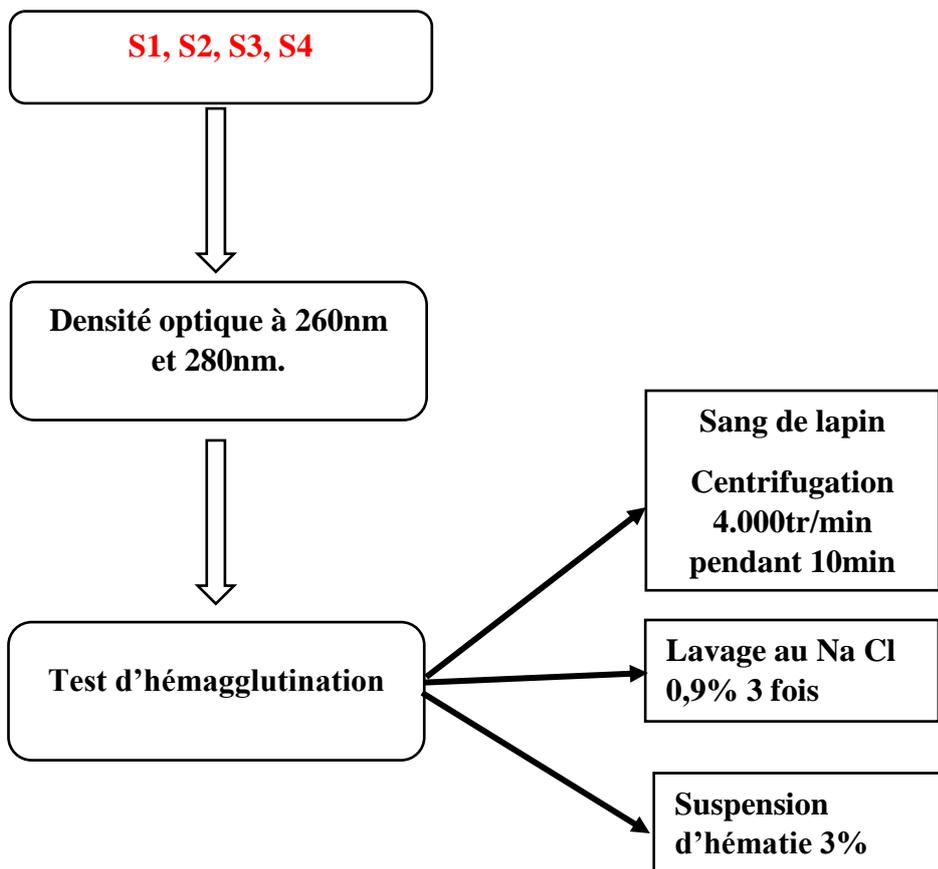
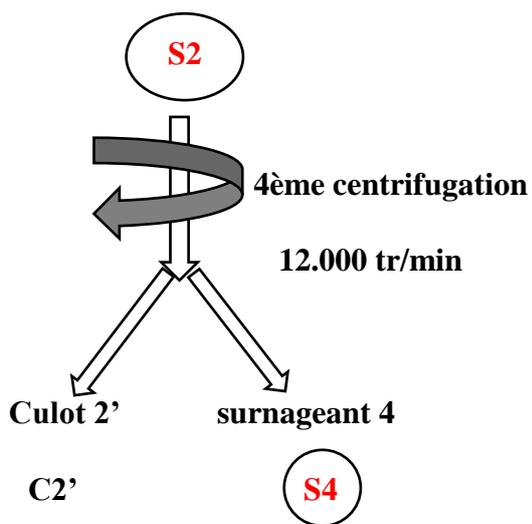
C1'

S3

C2

S2





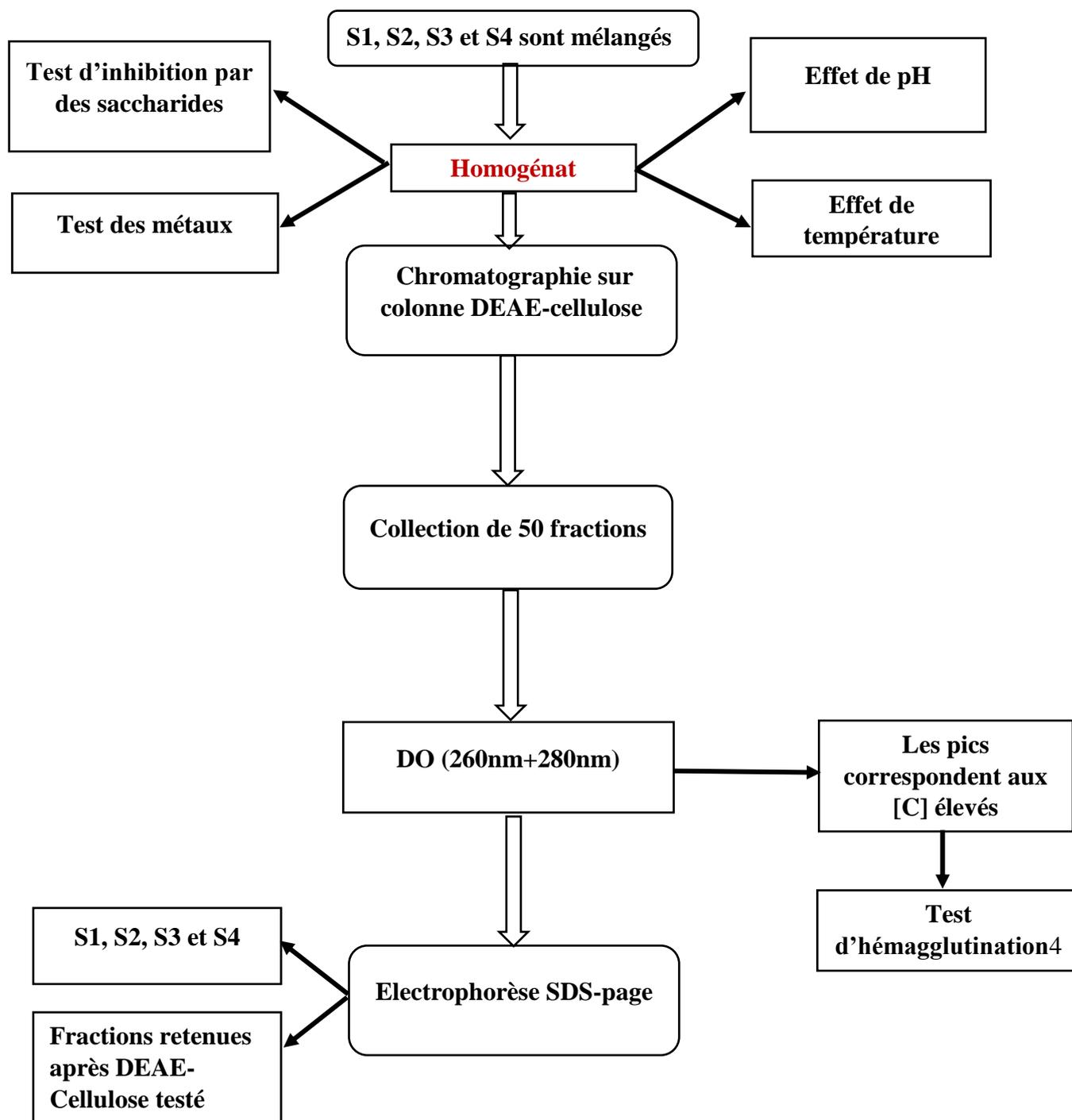


Figure 1 : schéma récapitulatif de la procédure expérimentale.

II. Méthode :

II.1. Préparation de l'extrait brut :

L'extraction des lectines a été faite selon la méthode de (Budu 1988 et de Cammue et al 1985).

a. Broyage :

A l'aide d'un mortier-pilon, l'*Agaricus xanthodermus* congelé a été broyé en utilisant une quantité suffisante d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière a été conservée dans une boîte hermétique.

b. L'extraction des lectines par la solution tampon :

Cette opération a été réalisée afin de récupérer des substances hydrosolubles à partir d'une poudre de champignon à l'aide d'une solution tampon phosphate di-sodique ; PBS (phosphate buffered saline) (Annexe 01).

- **Technique :**

L'échantillon est dilué dans du tampon PBS (0,1 M pH 7,4) à raison de 4,5 ml/g, soit 10 g dans 45 ml. La solution obtenue est homogénéisée grâce à un Ultra-Turax, puis soumise à une centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes à 04°C (Sigma). Le surnageant est récupéré puis repris pour une deuxième centrifugation à 12000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. En parallèle les deux culots C1+C2 récupérés pendant les deux opérations de centrifugation sont redissous dans du PBS pendant 24h et centrifugés à 12000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C.

En fin de centrifugation, les quatre surnageants S1, S2, S3 et S4 sont filtré à travers des membranes millipores et des filtres seringues conçus pour des seuils de filtration de 0,45µm de diamètre facilitant ainsi la récupération des protéines pour la réalisation des tests souhaités. Le filtrât est conservé à 4°C.

II.2. Dosage des protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Warburg et Christian (1941) qui ont étudié les propriétés spectrales des macromolécules et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques qui contaminent souvent les préparations de protéine. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à 280 nm, pour les protéines et à 260 nm, pour les acides nucléiques.

Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}.$$

II.3. Le test d'hémagglutination :

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les extraits aux différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein et al 1980 ; Rüdiger 1993**).

Ce test est réalisé le plus souvent sur les hématies du lapin. Il se base sur l'observation de l'agglutination, et par conséquent de la précipitation des érythrocytes en présence des lectines.

Seuls les extraits positifs sont retenus pour la suite de notre étude.

II.3.1. La Préparation des hématies à 3% :

La préparation de suspension d'hématies est effectuée selon la méthode de **Higuichi et al (1988)**, de la manière suivante :

Les hématies collectées ont été au préalable soumises à un lavage, puis à une dilution.

- **Lavage des hématies :**

Une quantité de sang (environ 3 ml) est mise dans un tube hépariné, puis centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant résultant est éliminé et le culot est dissous dans une solution physiologique (NaCl 0,9%) (**Annexe 02**). Le mélange est soumis à nouveau à une centrifugation. Cette opération de lavage a été reprise trois fois dans les mêmes conditions jusqu'à obtention d'un surnageant clair.

- **Dilution des hématies :**

Après avoir terminé le lavage, le culot contenant les globules rouges est dilué dans du chlorure de Sodium (NaCl 0,9%), soit 1,5 ml d'hématies dans 48,5 ml de NaCl afin d'obtenir une solution d'hématies à 3%.

II.3.2. Technique d'hémagglutination :

L'activité hémagglutinante des lectines a été réalisée dans des microplaques de titration.

A l'aide d'une micropipette, 50 μ l d'extraits sont déposés dans chaque puits d'une microplaque tout en ajoutant 50 μ l d'hématies de lapin à 3%. Après 1h d'incubation à une température ambiante, la lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée par une estimation visuelle (à l'œil nu) et par la suite confirmée à l'aide d'un microscope optique (**G \times 10**).

II.3.3. Test de la limite d'hémagglutination :

Ce test nous a permis de déterminer le pouvoir agglutinant et d'en déduire le titre en lectine c'est-à-dire la concentration la plus basse à laquelle on observe une hémagglutination.

- **Technique**

Dans une première étape, 50µl de tampon phosphate ont été déposés dans chaque puits de la microplaque, ensuite un volume de 50µl d'extrait a été ajouté uniquement au premier puits, puis des dilutions successives de l'échantillon qu'on appelle une gamme de concentration par double dilution ont été réalisées dans les puits suivants. On fera en sorte de jeter 50µl du mélange à partir du dernier puits pour respecter les taux de dilutions et garder les mêmes volumes dans chaque puits.

Ensuite, un volume de 50µl des hématies a été ajouté aux extraits dilués dans chaque puits.

L'observation de l'activité hémagglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante.

II.4.Effet du pH sur l'hémagglutination :

II.4.1. La technique :

L'effet du pH sur l'activité hémagglutinante a été déterminé par la mise en œuvre de test hémagglutinante des lectines en utilisant le tampon PBS à différentes valeurs de pH en allant de 1 à 12, chaque tampon a été mélangé avec une petite quantité de la poudre de champignon, soit 1g par 4ml. Après 24 h d'incubation à 4 °C, le test d'hémagglutination est effectué sur le surnageant.

II.4.2. Test de la limite de l'effet de pH sur l'hémagglutination :

Dans chaque puits d'une microplaque, 50µl de tampon PBS à pH bien défini a été déposé tout on ajoutant 50µl de l'extrait seulement dans le premier puit, puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants on respectant les mêmes volumes. Enfin 50µl d'hématie ont été rajouté dans chaque puits. Après 1h d'incubation la plaque a été observée à l'œil nu.

Nos résultats sont toujours comparés par rapport à un témoin négatif qui contient les mêmes composants sauf l'échantillon dans les mêmes conditions de travail.

II.5.L'effet de température sur l'hémagglutination :

Les aliquotes de notre homogénat ont été incubé à des températures différentes (40, 60, 80,90, 100°C) dans un bain marie pendant une heure de temps. L'extrait chauffé, puis refroidi à la

température ambiante pendant une demie heure, est soumis à un test d'hémagglutination avec et sans dilution.

II.6. Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine :

La spécificité des lectines vis-à-vis des glucides a été mise en évidence en présence d'une série des saccharides pouvant éventuellement inhiber l'agglutination des hématies de lapin.

II.6.1. Technique :

Dans chaque puits d'une microplaque, 50µl d'homogénat sont additionnés à 50µl d'une solution de saccharides ou de glycoprotéine (0,1g/1ml de NaCl 0,9%) (**Annexe 03**) (Lactose, Fucose, Glucose, Saccharose, Ribose, Xylose, Mannitol, Galactose, Arabinose, caséine). Le mélange est incubé pendant 1 h à température ambiante afin de permettre aux lectines de reconnaître leur sucre spécifique. A la fin de cette opération, 50µl d'hématies de lapin à 3% sont rajoutés. La lecture est faite après une heure à l'œil nue.

II.6.2. Test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides :

Ce test a été effectué pour les sucres qui inhibent l'agglutination. Il a été réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination.

- **Technique :**

Dans chaque puits d'une microplaque, 50µl d'homogénat ont été déposés, puis 50µl des inhibiteurs (0,1g/ml) sont rajoutés au premier puits seulement, ensuite une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits suivants, l'incubation de ce mélange a été effectuée pendant 1h de temps à température ambiante. Finalement, 50µl des hématies à 3% ont été ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination a été faite à l'œil nu après une heure de temps.

II.7. Le Test des métaux (oligoéléments) :

L'EDTA est préalablement ajouté à l'homogénat volume à volume (1V/1V respectivement). Après 1h, 50µl de notre composé sont déposés dans un puits tout en ajoutant 50µl de l'un des métaux (MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂) (**Annexe 04**). Enfin 50µl de sang de lapin sont ajoutés au mélange, la lecture a été faite à l'œil nu après 1h d'incubation.

II.8. La purification des lectines par la chromatographie échangeuse d'ions :

La chromatographie échangeuse d'ions est généralement une étape intermédiaire dans un protocole de purification.

Habituellement pour séparer les protéines, on utilise la chromatographie sur DEAE-cellulose dont la phase stationnaire est une résine de cellulose sur laquelle sont liés chimiquement les groupements ammonium quaternaire (DEAE : Di-Ethyl-Amino-Ethyl) du gel, qui sont eux chargés positivement (+) à pH alcalin et permettent la rétention à pH acide. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines en augmentant progressivement la concentration en sel (force ionique).

II.8.1. Préparation de la colonne :

Une quantité suffisante de gel de la DEAE-cellulose en poudre est activée dans quelques millilitres d'une solution tampon PBS (0,1 M pH 7,4). La solution tampon est d'abord dégazée sous vide pour éviter les bulles d'air. L'hydratation du gel est réalisée à température ambiante pendant quelques minutes, puis coulé dans une colonne de 0,5 cm de diamètre et une hauteur de 30 cm.

II.8.2. La séparation des lectines à partir des extraits :

La stabilisation et l'équilibrage du gel est faite avec 30 ml, soit 5 fois le volume de la colonne par un tampon PBS de faible force ionique (0,1 M pH 7,4). Ensuite, l'homogénat est introduit lentement et en petites quantités dans la colonne. Les protéines ayant une affinité relativement faible pour l'échangeur d'ions migreront plus rapidement dans la colonne alors que celles qui se lient à l'échangeur avec une plus forte affinité seront retardées. Afin de permettre l'élution des protéines fortement liées, le tampon de lavage doit être remplacé par un tampon d'élution de concentration saline supérieure. L'élution des protéines retenues est réalisée à l'aide d'un gradient de concentration saline croissant variant entre 1 M et 0.1M. (Tampon phosphate de forte force ionique (1M pH 7,4) et un tampon de faible force ionique (0,1M pH 7,4)).

Des fractions de 3ml sont recueillies par un collecteur automatisé dans des tubes secs placés respectivement dans un portoir avec un débit d'environ 0,4 ml/min.

II.8.3. La spectrophotométrie à UV et dosage des protéines :

Cette étape permet de quantifier les lectines séparées par chromatographie sur colonne en mesurant l'absorption de toutes les fractions, à une longueur d'onde comprise entre 260 nm et à 280 nm. Une courbe reliant l'absorbance en fonction de volume d'élution est ainsi obtenue.

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

II.9.Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

Cette méthode est utilisée pour contrôler la pureté et estimer la masse moléculaire de nos protéines.

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par **(Laemmli and Favre, 1973)**.

II.9.1. Principe :

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique qui permet de séparer les protéines sur un support de gel en polyacrylamide et sous l'influence d'un champ électrique. La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu dans des conditions dénaturantes en raison de la présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS est un détergent anionique fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. En se liant aux protéines, il leur donne une charge nette négative et les fait migrer uniquement en fonction de leurs poids moléculaire.

Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le β - mercaptoéthanol qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts di-sulfures, ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle les rendant ainsi sous forme monomérique.

II.9.2. Préparation des gels :

Les plaques de verre qui servent de moule pour la polymérisation des gels sont assemblées avec deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5mm chacun. Le support d'électrophorèse est formé de deux gels : un gel de séparation (separating gel) et un gel de concentration (stacking gel).

- Le gel de séparation à 11% qui est utilisé à T : 12,25% ; C : 0,97% (T : acrylamide 40% + bis acrylamide à 2% (P/V), du tris-HCl 1M tamponnés à pH 8,8, du SDS à 10% et de l'eau distillée. Pour favoriser la polymérisation on ajoute des catalyseurs : persulfate d'ammonium (APS) à 1% (P/V) et le tétra méthylène-diamine (TEMED) **(Annexe 07)**.
- Le gel de concentration à 4% est préparé à T : 2,8% ; C : 1.42% avec du tris-HCl, PH 6.8 **(Annexe 08)**.

Le gel de séparation est préparé le premier, bien mélangé puis coulé entre deux plaques en verre, en laissant un vide de 4 cm pour le stacking gel. Une fine couche de butanol est ajoutée pour niveler le gel et pour le protéger de l'air. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, et des peignes à 15 puits sont rapidement insérés.

Après la polymérisation du stacking gel qui s'effectue en plus de 60 minutes, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extrais protéiques, les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

L'échantillon protéique dénaturé est déposé à raison de 50µl par puits à l'aide d'une seringue.

II.9.3. Tampon d'électrophorèse :

Après dépôt des échantillons, la cuve d'électrophorèse est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration composé de Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1,4 % (p/v) de glycine et 0,1% de SDS(Annexe 06).

II.9.4. Conditions de migration :

La migration est menée à une intensité de courant de 80 mA avec une tension maximale de 1200 V.

II.9.5. Fixation, coloration et décoloration :

Une fois la migration électrophorétique achevée après la sortie du front de migration, le gel est démoulé, le gel de concentration est éliminé, le gel de séparation est mis sous agitation pendant une nuit dans une solution de coloration contenant une solution composée d'un agent fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 12 % (p/v) et 5% (V/V) de solution mère de bleu de Coomassie R-250 à 1% dans l'éthanol (Annexe 09).

-La décoloration se fait ensuite par des rinçages répétés à l'eau du robinet.

- Le diagramme électrophorétique est lu selon la mobilité relative et l'intensité des bandes, le PM des protéines est déterminé par rapport à des standards moléculaires de masse moléculaire connue qu'on appelle marqueurs de taille, commercialisés en kit.

Chapitre IV :
Résultats et discussions :

I. Dosage des protéines :

Les deux tableaux 7 et 8 représentent l'absorbance des fractions à 260nm et à 280nm.

Tableau 1 : Absorbance à la longueur d'onde de 260 nm pour les acides nucléiques.

Tube	S1	S2	S3	S4
DO à $\lambda=260\text{nm}$	0.604	0,401	0,387	0,296
	Dilution 1/100	Dilution 1/100	Dilution 1/100	Dilution 1/100

Tableau 2 : Absorbance à la longueur d'onde de 280 nm pour les protéines.

Tube	S1	S2	S3	S4
DO à $\lambda=280\text{nm}$	0.453	0,340	0,304	0,210
	Dilution 1/100	Dilution 1/100	Dilution 1/100	Dilution 1/100

λ : Longueur d'onde.

S1 : le surnageant 1 issue de la 1^{ère} centrifugation.

S2 : le surnageant 2 issues de la 2^{ème} centrifugation.

S3 : le surnageant 3 issues de la 3^{ème} centrifugation.

S4 : le surnageant 4 issues de la 4^{ème} centrifugation.

Les concentrations des protéines sont les suivants :

Les concentrations sont calculées d'après la formule de **Warburg et Christian (1941)** :

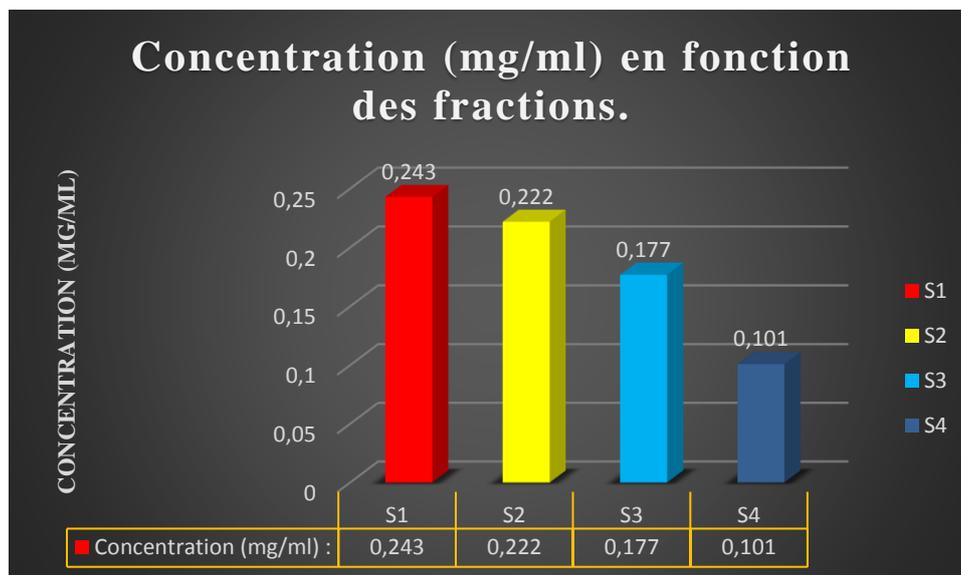
$$[\text{Protéines}] (\text{mg/ml}) = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}.$$

Tableau 3 : concentration des protéines.

Tube	S1	S2	S3	S4
Concentration (mg/ml) :	0,243	0,222	0,177	0,101

On observe que les quatre surnageants révèlent des concentrations différentes. Ces dernières sont réparties par ordre décroissant de S1 à S4.

Le diagramme ci dessous illustre mieux les résultats précédents.

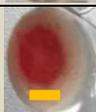
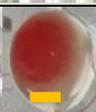
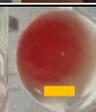
**Figure 1: diagramme représentant les concentrations de chaque surnageant.**

II. Test d'héماغglutination :

La plupart des lectines ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. La mesure d'activité héماغglutinante reste toujours la méthode la plus simple et la plus pratique pour la détection de la présence des lectines (Laija *et al.*, 2010). Ce phénomène repose sur l'observation de l'agglutination ou l'agrégation des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse homogène. Cette suspension correspond à la formation d'un réseau entre les hématies et les lectines une fois mis en contact dans un puits.

Afin de tester l'activité lectinique de notre échantillon, des expériences d'hémagglutination sur des érythrocytes de lapin ont été réalisées pour les quatre surnageants. Le tableau suivant représente l'hémagglutination des hématies du lapin avec les surnageants de notre champignon..

Tableau 4: Agglutination des hématies de lapin avec les quatre surnageants.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	S1	S2	S3	S4									
E													
T-													
R	+++	+++	++	+									

E : essai pour les surnageants 1, 2, 3 et 4(50 µl d'extrait+50 µl des hématies à 3%).

T- : témoin négatif (50 µl de PBS+50 µl des hématies à 3%)

R : résultat

- +++ : Très forte agglutination.
- ++ : Forte agglutination.
- + : faible agglutination
- : Absence d'agglutinations

Nos résultats indiquent clairement que nos quatre surnageants présentent une plus ou moins forte agglutination et par conséquent contiennent une plus ou moins forte concentration en lectines. Ces lectines sont réparties en grande majorité entre les surnageant 1 et 2 qui montrent une très forte agglutination par rapport aux autres, qui tout de même ont donné lieu à une présence de concentration de lectines non négligeable. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes décidés de mélanger ensemble les quatre surnageants afin d'enrichir notre homogénat d'agaric qui servira pour la suite de nos opérations.

Ces résultats sont similaires à beaucoup d'autres comme celles de lectines des deux plantes : *Moringa G* et *Moringa M* qui montrent également une très forte agglutination

(Necib *et al.*, 2014). Par contre d'autres espèces n'ont pas cette activité tel que les deux plantes *Sinapis alba* et *Brassica fruticulosa* (Deeksha *et al.*, 2015).

 Dosage des protéines pour l'homogénat :

Tableau 5 : Absorbance de l'homogénat à 260 et à 280 avec concentration.

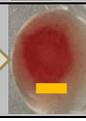
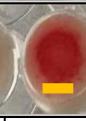
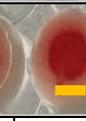
DO à $\lambda=260\text{nm}$	DO à $\lambda=280\text{nm}$	Concentration (mg/ml)
0,484	0,372	0,209
Dilution 1/100	Dilution 1/100	

III. Test de la limite d'hémagglutination :

La limite d'hémagglutination est exprimée par l'unité d'hémagglutination (UH). Elle est utilisée pour déduire le titre en lectine, qui met en évidence soit la concentration minimale montrant une agglutination ou encore, la dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

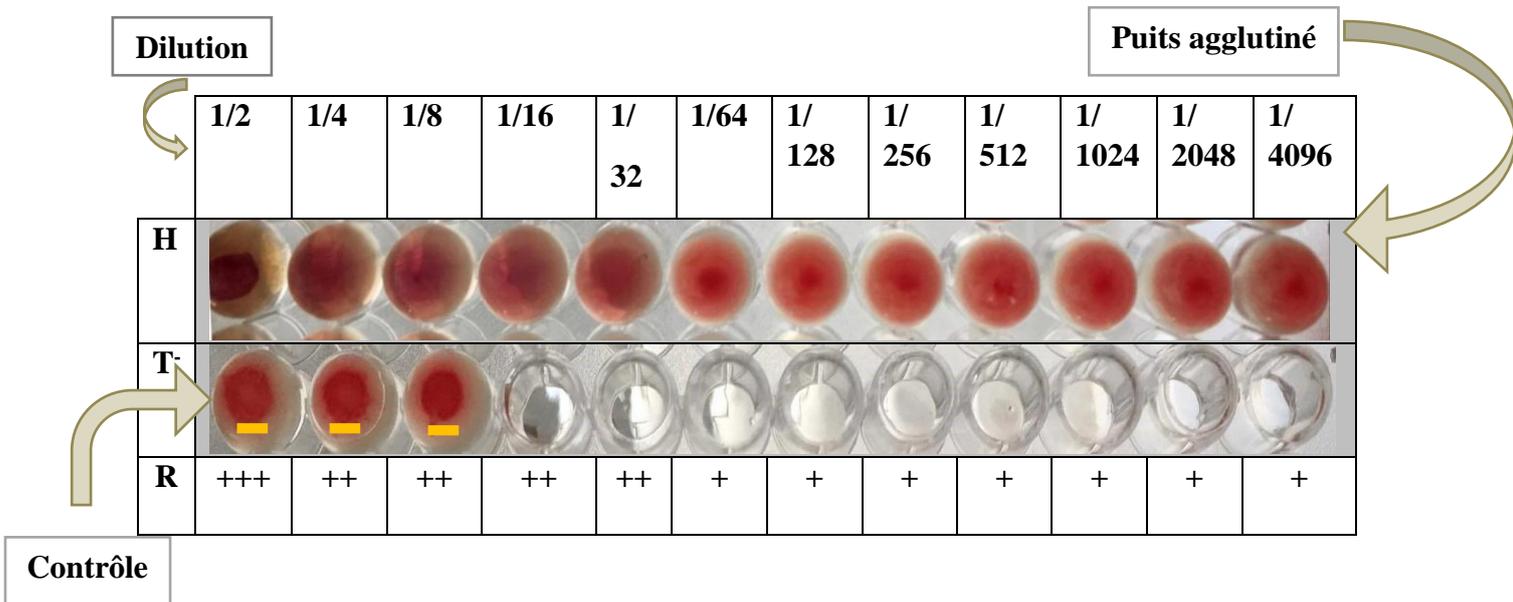
Le tableau suivant montre les résultats obtenus lors du test de la limite d'hémagglutination.

Tableau 6: test de limite d'hémagglutination de l'homogénat.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
H												
T												
R	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+

Contrôle

Puits agglutiné



H : homogénat.

Tableau 7: Dilution des lectines.

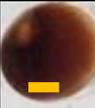
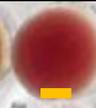
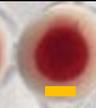
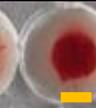
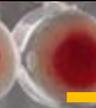
Dilution	[C] (µg/ml)	Dilution	[C] (µg/ml)
1/2	104.5	1/128	1.63
1/4	52.25	1/256	0.82
1/8	26.12	1/512	0.41
1/16	13.06	1/1024	0.20
1/32	6.53	1/2048	0.10
1/64	3.26	1/4096	0.05

D'après les résultats obtenus, on observe sur microplaque une forte activité hémagglutinante au niveau de la dilution (1/2) dont l'unité d'hémagglutination (UH) obtenue est de 104,5 µg/ml. Le pouvoir hémagglutinant de nos lectines commence à diminuer progressivement dans les quatre puits suivants allant jusqu'à la dilution 32UH.ml⁻¹, alors que dans le reste des dilutions et ce jusqu'au douzième puits (1/4096), on observe une concentration nettement plus faible mais elle reste comme même visible. Une autre cascade de double dilution avec l'homogénat aurait pu être réalisée afin de déterminer la concentration à laquelle l'agglutination n'est plus observée, cela pour autant ne nous empêche pas de remarquer que nos lectines présentent un pouvoir hémagglutinant assez élevé qui avoisine probablement quelques microgrammes par millilitre. .

Ce résultat est similaire aux résultats observés pour la truffe blanche du Sahara Algérien *Terfezia bouderei* dont la concentration a été (128 UH. ml⁻¹) (Zitouni *et al.*, 2014). D'autres lectines extraite à partir des feuilles d'une plante de l'*Ocimum sanctum* présentent une activité agglutinante spéciale avec des érythrocytes humains à une concentration minimale de 0,7 ug / ml (Praveen Kumar Vemuri *et al.*, 2015).

IV. Effet de pH sur l'hémagglutination :

Tableau 8: Effet de pH sur l'activité hémagglutinante.

pH extrait	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
R	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+

A : extrait (50µl de surnageant + 50µl d'hématie à 3%).

B : témoin négatif (50µl de PBS+50µl de sang).

L'*Agaricus xanthodermus* montre une activité d'agglutination dans un intervalle large de [2 à 12]. Elle commence avec des taux faibles à pH acide (2), augmente petit à petit jusqu'à atteinte d'une valeur maximale dans un zone basique de PH compris entre [8 et 10] pour revienne chuter à PH compris entre 11 et 12. Ceci montre que les lectines d'agaric jaunissant exercent mieux leur pouvoir hémagglutinant sur les érythrocytes à pH basique qu'à pH acide avec une perte totale d'activité hémagglutinante à pH très acide (1).

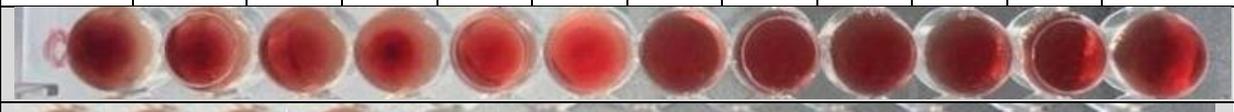
Les lectines des champignons connues affichent généralement une bonne tolérance sur une large gamme de pH. Les exemples comprennent la lectine de champignon *Lentinula edodes*, qui montre une activité hémagglutinante non affectée par des PH compris entre [2 à 11](Queensley et al., 2011)et une tolérance moindre sur la plage de pH de 4 à 11 pour *Ganoderma capense* (Patrick HK Ngai and TB Ng, 2004).

V. Test de la limite de l'effet de pH sur l'hémagglutination :

Le tableau suivant illustre la limite d'hémagglutination des lectines à différents pH.

Tableau 9: la limite d'hémagglutination en fonction du pH.

D		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
pH	S												
	T ⁻												
	R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	E												
	T ⁻												
	R	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	E												
	T ⁻												
	R	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	E												
	T ⁻												
	R	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
6	E												
	T ⁻												
	R	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
	E												

7	T ⁻												
	R	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	E												
	T ⁻												
R	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
9	E												
	T ⁻												
R	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	E												
	T ⁻												
R	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	E												
	T ⁻												
R	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	E												
	T ⁻												
R	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ces résultats montrent clairement que les lectines d'agaric sont particulièrement actives dans la gamme des pH basiques même avec des dilutions faibles de l'ordre de 4096 UH.ml^{-1} .

Ces résultats montrent en comparaison avec d'autres lectines des comportements plus ou moins similaires avec une tolérance meilleure pour les pH basiques.

La lectine purifiée à partir de la bactérie d'*Aspergillus gorakhpurensis* présente une activité lectinique maximale à la dilution (128) et à PH compris entre [6,5-9,5]. L'activité de cette lectine est complètement stable entre un PH compris entre [7,0-10,5] après 24 h, alors qu'au-dessus et au-dessous de cette gamme, une perte importante d'activité a été observée (Ram Sarup Singh et al., 2014).

VI. Effet de température sur l'hémagglutination :

La plupart des molécules protéiques ne conservent presque pas leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle aux températures élevées car elles sont dénaturées.

L'augmentation de la température rompt les interactions faibles (liaisons hydrogènes par exemple) qui stabilisent la structure spatiale ou la forme tridimensionnelle native. Cette dénaturation entraîne la perte totale ou partielle de l'activité biologique. Dans le cas d'une lectine, la dénaturation détruit ses capacités d'hémagglutination.

Nous avons donc voulu savoir comment vont se comporter nos lectines en soumettant nos extraits à une incubation à différentes températures 40, 60, 80, 90 et 100°C.

Tableau 10: Effet de la température sur l'activité hémagglutinante.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	R
40°C													+++
60°C													++
80°C													+
90°C													-
100°C													-

Le traitement thermique des lectines d'agaric jaunissant reflète une bonne activité hémagglutinante à 40°C, encore appréciable entre 60 et 80 °C et presque nulle à totale entre 90°C et 100°C.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés avec la lectine de la plante d'haricot *Phaseolus vulgaris* car elle est aussi thermostable, son activité hémagglutinante est stable à

des températures allant jusqu'à 80 ° C et ne se réduit qu'à 90 ° C. Fait intéressant, une certaine activité est restée même après chauffage à 100 ° C pendant 30 minutes (Arishya Sharma, et al., 2009).

Alors, qu'avec la lectine de *Chlorophyllum molybdites* (champignon appartenant à la famille Agaricaceae), l'agglutination est stable en dessous de 60 ° C mais a été rapidement inactivée à des températures supérieures à 60 ° C (Yuka Kobayashi et al., 2004).

VII. Test de la limite de l'effet de température sur l'hémagglutination :

Tableau 11 : La limite de l'effet de température sur l'hémagglutination.

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
40° C	H												
	T												
	R	+++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
60° C	H												
	T												
	R	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
80° C	H												
	T												
	R	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
90° C	H												
	T												
	R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Ces résultats indiquent que les lectines de ce champignon sont thermorésistantes à des températures élevées car elles présentent une hémagglutination même avec une faible

concentration. Par exemple à 90°C l'activité hémagglutinante peut arriver jusqu'à la dilution «32 », et disparaît par la suite des dilutions. Ce n'est le cas des lectines extraites à partir d'*Aspergillus gorakhpurensis*. Cette lectine possède une activité optimale entre 20 et 30 ° C. l'agglutination est conservée à 100% jusqu'à 60 ° C même après 30 minutes d'incubation, et disparaît complètement à des températures plus élevées (Ram Sarup Singh et al., 2014).

VIII. Test d'inhibition d'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine :

Pour déterminer la spécificité des lectines vers une structure glucidique particulière, on a réalisé un test d'inhibition de l'hémagglutination par une série des saccharides

(Lactose, fructose, glucose, saccharose, ribose, xylose, mannitol, galactose et arabinose) et une glycoprotéine qui est la caséine.

Sur le plan qualitatif, ce test est utilisé aussi pour identifier le sucre qu'on peut utiliser éventuellement lors d'une chromatographie d'affinité pour la purification de ces lectines.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 12 : test d'inhibition des lectines de l'homogénat avec les saccharides.

	H									T			R
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Lactose													-
Fructose													+++
Glucose													-
Saccharose													-
Ribose													+++
Xylose													+++
Mannitol													+++
Galactose													+++

Arabinose		++
Caséine		+

L'agglutination ne se fait pas dans le cas où la lectine va fixer l'inhibiteur plutôt que le sucre se trouvant dans les hématies. Dans le cas contraire, pour les saccharides n'ayant pas une affinité envers la lectine, celle-ci reste libre pour qu'elle puisse reconnaître le sucre des érythrocytes, et donc provoquer une hémagglutination.

Ce test nous permet de constater clairement que notre homogénat d'agaric jaunissant ne présente aucune spécificité pour le fructose, ribose, xylose, mannitol, galactose, arabinose et la caséine du fait de leur agglutination vis-à-vis des hématies. Ce qui n'est pas le cas pour le lactose, glucose et saccharose qui du fait qu'ils n'aient pas donné lieu à une hémagglutination peuvent probablement présenter une spécificité vis-à-vis de nos lectines. Cette inhibition est due à l'occupation du site ou des sites actifs ou encore appelé "**domaine de reconnaissance des glucides**" par un ou plus de ces saccharides.

Ce type de comportement observé dans plusieurs autres travaux de recherche portant entre autre sur l'inhibition d'agglutination de la plante *Ocimum Sanctum*, montrent que cette inhibition n'a été affecté par aucun des sucres testés, cela pourrait être dû au fait que la lectine utilisée pourrait posséder plusieurs sites de liaison et peut donc possède certainement une spécificité relative à une grande variété des sucres (Praveen Kumar Vemuri et al., 2015).

Pour une autre lectine notamment celle de l'algue marine rouge *Pterocladia capillacea*, sur laquelle ont été testés les effets d'une série de glycoprotéines, les résultats obtenues ont mis en évidence deux inhibitions l'une concernant l'avidine et l'autre la mucine de l'estomac porcine nécessitant une même concentration (156 µg. mL⁻¹). La Fétuine et le blanc d'œuf quant à eux n'ont pas inhibé la lectine à la concentration maximale C testée (1250 µg.mL⁻¹) (S.G. Gmel et al., 2002).

IX. Test de la limite d'inhibition d'hémagglutination par les saccharides :

Ce test est réalisé uniquement pour les sucres qui inhibent l'agglutination pour évaluer la concentration minimale de glucide qui induit l'inhibition de l'activité hémagglutinante.

Tableau 13 : Les concentrations minimales provoquant l'inhibition d'hémagglutination.

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Lactose	H												
	T												
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La concentration minimale d'inhibition

0,025 g/ml

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Glucose	H												
	T												
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

La concentration minimale d'inhibition

0,000098 g/ml

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Saccharose	H												
	T												
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La concentration minimale d'inhibition

0,025 g/ml

Le tableau ci-dessus nous montre que l'effet inhibiteur des sucres se manifeste différemment en fonction de son affinité envers les lectines; il y'a donc un effet de seuil spécifique pour chaque sucre inhibiteur, et au-delà de ce seuil il peut y avoir une reprise du pouvoir hémagglutinant propre à chaque lectine. A ce point-là, le sucre inhibiteur n'est plus fixé et est libre pour se lier au saccharide des hématies.

En ce qui nous concerne, **Le lactose** et le **saccharose** révèlent une concentration minimale qui empêche de provoquer une hémagglutination des érythrocytes de l'ordre de **0,025 g/ml** au niveau de la dilution (1/4) en utilisant une concentration initiale de 0,1 g/ml de lactose ou de saccharose, **le glucose** quant à lui à la même concentration de départ, présente une concentration minimale nettement plus faible qui est de l'ordre de **0,000098g/ml** dans le 10^{ème} puits.

Ces résultats montrent que **le glucose possède une grande affinité avec les lectines d'agaric** car il occupe le site de reconnaissance même avec des concentrations à l'état de trace de l'ordre de **0,000098g/ml**.

Des études similaires effectuées sur d'autres lectines comme l'extrait salin des corps fructifères de *Lentinula edode* sont montrés que la N-acétyl-glucosamine et le D-arabinose augmentent légèrement l'activité hémagglutinante de la lectine tandis que le D-Mannitol, le D-Glucose, le D-Sorbitol et D-Maltose ont légèrement inhibé l'activité. L'activité de la lectine a été complètement inhibée par la N-acétyl-D-galactosamine avec une concentration minimale d'inhibition (CMI) d'hémagglutination est de 0,4 M (**Queensley Eghianruwa et al., 2011**).

Deux sucres composés l'acide *N*- glycolylneuraminique (NeuGc), le N-acétyl α galactosamine (α -GalNAc) testés sur un champignon le *Chlorophyllum molybdites*, ont donné respectivement des concentrations minimales d'inhibition (CMI) d'hémagglutination de 0,63 mM pour la NeuGc et de 12,5 à 50 mM pour le α -GalNAc (Yuka Kobayashi et al., 2004).

X. Test des métaux (oligoélément) :

Tableau 14 : test des métaux avec l'homogénat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	R
EDTA													+++
CaCl2													+++
MgCl2													++
MnCl2													-

L'EDTA est un ligand hexadentate, agent chélateur a la capacité de complexer (séquestrer) les ions métalliques.

L'activité hémagglutinante de la lectine d'agaric jaunissant n'a pas été affectée en présence d'EDTA car une très forte hémagglutination été observée. L'agglutination est observée aussi avec la majorité des cations divalents tel que le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}), alors qu'il y'a une inhibition avec le manganèse (Mn^{2+}). Ces résultats montrent que nos lectines possèdent un ou plusieurs sites de fixation pour le Mn^{2+} et pourrait être considérée comme étant une métalloprotéine.

Une dialyse exhaustive de la lectine de *Lentinula edodes* en présence d'EDTA n'a entraînée aucun changement dans l'activité hémagglutinante, même à des concentrations d'EDTA allant jusqu'à 100 mM. Cela pourrait suggérer différentes hypothèses qui sont soit que l'activité de lectine ne dépend pas des ions métalliques, soit que les ions métalliques présents étaient fortement maintenus dans la structure de la lectine et ne pouvaient être éliminés par dialyse avec un agent chélatant (Queensley Eghianruwa et al., 2011).

Des études réalisées sur l'*Ocimum sanctum*, montrent que l'ajout d'EDTA n'influence dans aucun sens l'activité hémagglutinante même après avoir ajouté les cations divalents : Ca^{2+} , Mg^{2+} (Praveen Kumar Vemuri et al., 2015).

XI. La Chromatographie sur colonne DEAE-cellulose :

Les résultats de la mesure d'absorbance à 280 nm après la collection de 50 fractions sont réunis dans le tableau suivant.

Tableau 15 : l'absorbance en fonction de volume d'élution.

Volume (ml)	DO						
1,8	0,219	28,8	0,273	55,8	0,232	82,8	0,215
3,6	0,412	30,6	0,278	57,6	0,215	84,6	0,208
5,4	1,755	32,4	0,262	59,4	0,231	86,4	0,195
7,2	1,907	34,2	0,262	61,2	0,253	88,2	0,215
9	1,864	36	0,265	63	0,218	90	0,207
10,8	1,559	37,8	0,249	64,8	0,225		
12,6	0,869	39,6	0,251	66,6	0,236		
14,4	0,616	41,4	0,221	68,4	0,233		
16,2	0,49	43,2	0,249	70,2	0,223		
18	0,465	45	0,216	72	0,208		
19,8	0,429	46,8	0,284	73,8	0,204		
21,6	0,374	48,6	0,235	75,6	0,206		
23,4	0,331	50,4	0,224	77,4	0,21		
25,2	0,299	52,2	0,21	79,2	0,201		
27	0,278	54	0,24	81	0,206		

Eluant : PBS (1MpH 7,4) +PBS (0,1MpH 7,4)

Absorbance à 280nm

Volume de fraction : 3 ml

A l'aide de tableau précédent on a tracé la courbe de l'absorbance en fonction de volume d'élution.

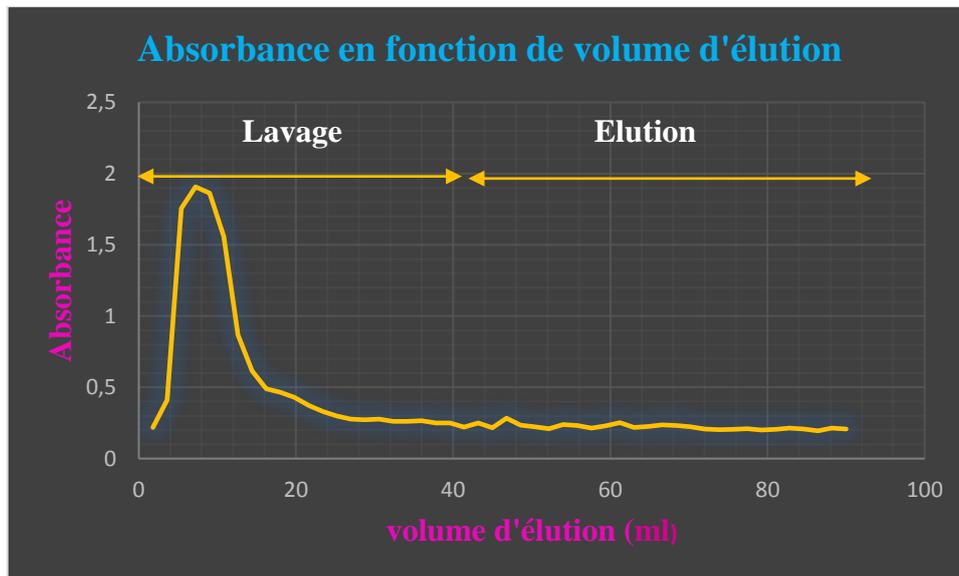


Figure 2 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction de volume d'élution de différentes fractions.

La filtration par chromatographie échangeuse d'ions a montré que tous les protéines de notre champignon sont éluées dans les premières fractions et ne sont apparemment pas adsorbées par le gel, et ce avant l'introduction du gradient de concentration en sel. Ce comportement de nos protéines semble répondre à nos prévisions.

Effectivement, le pH du tampon représente pour nos lectines un pH acide c'est-à-dire que le pH_i de la lectine est probablement supérieur au pH du tampon et donc la lectine de notre agaric est basique et a un pH supérieur à 7,4.

Comme on a déjà fait auparavant le test de l'effet de pH qui révéla que cette lectine est active à un pH basique compris entre 8 et 10, ce résultat est donc tout à fait conforme à nos conclusions.

D'autres travaux de recherche réalisés sur des lectines de Champignon comestible, tel *stropharia rugosoannulata* (Weiwei Zhang et al., 2014) et *Pleurotus citrinopileatus* (YR Lietcol2008) montrent que ces glycoprotéines ne sont pas adsorbées sur la DEAE-cellulose, mais le sont sur la CM-cellulose et Q-sepharose et sont éluées par un gradient linéaire de NaCl.

Un test d'hémagglutination des fractions issues de la chromatographie sur colonne est réalisé. Ce test nous a permis visuellement de repérer quelles sont les fractions qui présentent réellement une agglutination vis-à-vis d'hématies et donc celles qui renferment des lectines.

Tableau 16 :représentation d'agglutination des fractions.

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
R	-	-	+++	+	+	+	+	-
Fraction	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
R	-	-	-	+	+	-	-	-
Fraction	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24
R	+	+	+	-	-	-	-	+
Fraction	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32
R	-	-	-	-	-	-	+	+
Fraction	F33	F34	F35	F36	F37	F38	F39	F40
R	-	+++	-	-	-	-	+	-
Fraction	F41	F42	F43	F44	F45	F46	F47	F48
R	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraction	F49	F50	Témoin négatif					
R	-	-						

L'hémagglutination des fractions : 3, 4, 5, 31 et 34 confirment qu'elles contiennent des lectines et sont retenues pour réaliser une SDS-PAGE.

XII. SDS-PAGE :

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant nous a donné le profil électrophorétique suivant :

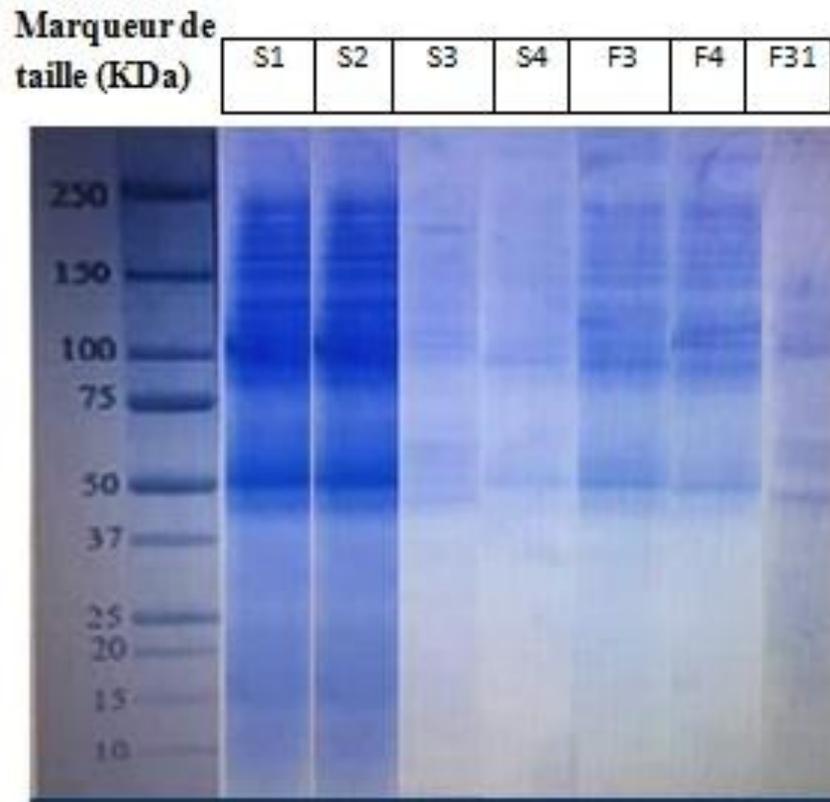


Figure 3 : profil électrophorétique des différentes fractions.

S1 : surnageant 1 de la 1^{ère} centrifugation.

S2 : surnageant 2 de la 2^{ème} centrifugation.

S3 : surnageant 3 de la 3^{ème} centrifugation.

S4 : surnageant 4 de la 4^{ème} centrifugation.

F3 : la fraction 3 après la chromatographie sur colonne.

F4 : la fraction 4 après la chromatographie sur colonne.

F31 : la fraction 31 après la chromatographie sur colonne.

La pureté et la masse moléculaire de la protéine a été estimé par SDS-PAGE. La lecture de diagramme consiste à relever la mobilité des bandes en comparant ces bandes à des marqueurs de taille standard de poids moléculaire connu.

Le diagramme électrophorétique a montré que les échantillons utilisés révèle plusieurs bandes; mais dont les plus évidentes en commun avec les résultats bibliographiques correspondent aux sous unités relative aux masses moléculaires de 50 KDa, 100 KDa et 150 KDa pour les surnageants S1, S2, S3, S4 et les fractions F3, F4 et F31 choisies après la DEAE-Cellulose.

Afin de mieux étoffer nos conclusions, il est souhaitable de procéder à une autre électrophorèse en conditions non dénaturantes (absence de B-mercaptoéthanol et sans chauffage ou sans SDS et de DTT) pour mieux apprécier le nombre de sous unités. Néanmoins cela ne nous empêche pas de prédire pour nos lectine deux sous unités de 50KDa chacune et un monomère de 150KDa.

Généralement la SDS-PAGE est utilisée pour séparer les protéines dénaturées afin de déterminer leurs poids moléculaires. Comme le SDS-PAGE n'est pas applicable directement pour les glycoprotéines, ces derniers se comportent anormalement lorsqu'on les compare directement avec les protéines standards, donc leurs mobilités seront faussées par la présence d'une quantité assez élevée d'hydrates de carbone (**Segrest and Jackson, 1972**).

La lectine du champignon *Chlorophyllum molybdites* purifiée a donné une seule bande avec une masse apparente de 16 kDa sur SDS-PAGE indépendamment de la présence ou de l'absence du 2-mercaptoéthanol (**Yuka Kobayashi et al., 2004**).

La lectine contenue dans les feuilles appartenant à une plante verte, *Ocimum sanctum* purifiée a donné lieu à une seule bande de 66 KDa suggérant la pureté de la préparation. Des rapports antérieurs ont mis en évidence sur ces mêmes lectines sont des glycoprotéines constituées de sous-unités chacune ayant une masse moléculaire comprise entre 25 à 35KDa, réunies sous forme de dimères ou de tétramères et existant comme plusieurs isoformes partageant des similarités dans les propriétés biochimiques. Cela suggère que l'*Ocimum Sanctum* purifié pourrait être une glycoprotéine dimérique avec des sous-unités identiques de 33KDa (**Praveen Kumar Vemuri et al., 2015**).

Chapitre V :
Conclusion et perspectives :

Nos recherches ont permis de mettre en évidence une nouvelle source de lectines à partir d'un champignon de la famille des Agaricacées, puisque les lectines décrites dans ce travail sont les premières à avoir été caractérisées.

Nous nous sommes intéressés à une purification partielle des lectines d'*Agaricus xanthodermus*. Pour cela nous avons tout d'abord opéré une extraction pour la mise en évidence de la présence de lectines.

Nos investigations ont révélé une forte activité hémagglutinante des lectines de *psalliotte jaunissante* ; inhibée par le glucose, et dans une moindre mesure par le lactose et saccharose. L'affinité de ces lectines pour ces saccharides peut être mise à profit pour une éventuelle purification en une seule étape lors d'une chromatographie d'affinité.

Un test mettant en évidence les limites d'hémagglutination en présence de ces sucres (glucose, lactose et saccharose) afin de déterminer la meilleure affinité de nos lectines vis-à-vis de ces sucres spécifiques a permis de sélectionner le glucose en premier lieu.

L'effet du traitement thermique indique que les lectines d'*Agaricus xanthoderma* sont thermorésistantes parce que l'agglutination peut aller jusqu'à 100°C. Elles possèdent un PH isoélectrique basique compris entre de 8 et 10. Le dosage de l'activité hémagglutinante a montré que la lectine n'était pas dépendante de l'ensemble des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) hormis le Mn^{2+} qui de part son effet inhibiteur de l'activité hémagglutinante de nos lectines peut nous laisser suggérer que l'on est en face d'une métalloprotéine. Ce type de comportement est certainement en relation avec la thermo stabilité élevée (90 à 100°C) de nos lectine qui est tributaire des ions métalliques tel le Mn^{2+} qui, quand il est présent au sein d'une lectine renforce sa thermorésistance, surtout quand cette dernière possède un pH_i alcalin. Des recherches similaires ont été effectuées et qui ont donné lieu aux mêmes conclusions concernant les structures métalloprotéiques renforcées par la présence d'ions métallique (**Nomura K. et al., 1998**), ayant une teneur élevée en acide sialique (**pompeue D.G. et al., 2015**), propriété commune à toutes les lectines et un pH basique (**Sharma A, 2009**).

Nous avons consacré les dernières étapes à une purification partielle de nos lectines en utilisant une chromatographie échangeuse d'anions ayant comme support la DEAE-cellulose, qui serait la plus adéquate avec une lectine ayant un pH_i alcalin et qui selon nos prévisions s'est avéré être concluant. En effet nos lectines ont été exclues lors des premières fractions. Cette étape de purification a été contrôlée par une SDS-PAGE.

Le diagramme électrophorétique a révélé plusieurs bandes comprise entre 50 et 250 KDa. Afin de vérifier quelles sont celle relatives aux lectines, il aurait fallait utiliser d'autres techniques telles que le western blotting.

Ce travail constitue une base pour une meilleure connaissance des lectines de ce type de champignon.

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

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires poussées à différents niveaux :

- Une caractérisation fine des lectines par purification grâce à une chromatographie d'affinité et HPLC.
- Une gel filtration pour quantifier leur poids moléculaire.
- Une étude cristallographique afin de déterminer la structure 3-D avec de bonnes résolutions.

Tous ces paramètres pourraient mieux nous orienter pour l'évaluation du potentiel biologique, thérapeutique et immunomodulateur de cette lectine fongique.

Références bibliographiques

-A-

ARAGAO K S. (2009). tudes structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyosteliumdiscoideum*. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France. Pp:17-27.

Arishya Sharma, Tzi Bun Ng, Jack Ho Wong, and Peng Lin (2009).Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). Journal of Biomedicine and Biotechnology,

Assreury AMS. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. Mediators of inflammation .6, 201-210.

Ayméric J-L, Lefranc G. (2009). ImmunologieHumaine. De Boeck&Laccier S.A. Paris.24.

-B-

Babosa T. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinaesubtribe. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95 (5), 673-678.

Banwell J G. (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean : a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. Gastroenrology. 84, 506-515.

Barrientos LG, Gronenborn AM (2005). La protéine hautement spécifique de liaison à la glande cyanovirine-N: structure, activité anti-VIH / Ebola et possibilités de thérapie. *Mini Avis en chimie médicale* . 5 (1): 21 à 31 ans. [[PubMed](#)]

Bothan MB, Weil K R. (2011). Biochimie de harper. 4ème édition. DE BOECK ,510.

Bouchara J-P ,Trouchin G. (2003) .Lectines fongiques et adhérence In Les Mycoses. ELSEVIER.Paris,167.

Boyd WC and Shapleigh E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*.119, 419.

Budu, C. V. (1988), isolation of two lectins from fir (*Abies alba* mill) bark tissue on immobilized peroxidase and some of their properties. Preliminary study. *Rev. roum Biochim.*, 25 (1) :3-7.

-C-

cammue, B., Stinissen, W. J., & Peumans, W. J. (1985). Lectins in vegetative tissues of adult barley plants grown under field conditions. *Plants physiol.*, 78:384-387.

Cavaillon J-M. (2005) .Médiateurs de l'inflammation In Vincent J-L .Martin C. Sepsis sévère et choc septique. SPINGER-VERLAGE. France.23.

Chabrol E, Fieschi F, Girard E. (2012). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une lectine de type C des cellules de langerhans : la langérine. *Chimie et sciences du vivant*. Université de Grenoble. 2012. pp 63-64.

Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V. (1991)Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, 3, 1-9.

Cioci G., Pérez S., Mitchell E (2006). Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Université Grenoble I- Joseph Fourier

Crocker, PR. (2002) .Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 609-615.

-D-

Dam TK and Brewer CF. (2002) .Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*102, 387-429.

De Hoff PL, Brill LM, Hirsch AM. (2009) .Plant lectins : the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomics*282 , 1-5.

DEEKSHA. M., SANGHA. K., KHURANA. D. S., KAUR. G., BALA. M., SINGH. B (2015).

Screening for Lectin Quantification in Brassica Spp and Vegetable Crops. *Journal of Environmental and Applied Bioresearch*. 3(1) : 20-24.

Delatorre P et al. (2006). Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J Struct Biol*. 154, 280-286.

Dole A et Lindeberg S. (2005). Agrarian diet and diseases of affluence-do evolutionary novel dietrylectins cause leptinresistance. *Bio, mad central lid*. doi .10.1186 ,1472-6823-5-10 .

Drickamer K. (1993) . Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 3, 393-400.

-E-

Edelman GM, Cunningham BA, Reeke GN, Becker JW, Waxdal MJ and Wang JL. (1972) .The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 69, 2580-2584.

Emsley, J., White, H.E., O'Hara, B.P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Pepys, M.B. and Wood, S.P. (1994). Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*, 367, 338-345.

-F-

Falasca A I. (1989) .Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowics. *FebsLett*. 246(1-2), 159 -162.

-G-

Gabius HJ, Springer WR and Barondes SH. (1985). Receptor for the cell binding site of discoidin I. *Cell*.(42),449-456.

Garlatti, V., et al. (2007). Structural insights into the innate immune recognition specificities

of L- and H-ficolins. *EMBO J*, 26, 623-633.

Ghopskins W, Evrard C-M. (2003). *Physiologie Végétale*. DE BOECK. 1ère édition, 104-105.

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

Goldstein I J, HAYES.C.E. (1978). the lectin-carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127-334.

Goldstein I J , Hughes R C , Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980). What should be called a lectin? *Nature.* 285, 66.

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

Gomes J. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. *Agent Action* . 41, 132-135 .

Greer F, Brewer AC, Pusztai A. (1985). Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Brit. J. Nutr.* 54, 95 -103.

Guénard H et al.(2001). *Physiologie humaine*. 3ème édition. PARDEL , 497.

Guillaume J. (1993). *Nutrition et Alimentation des Poisson et Crustacés*. Terrain, 396.

Guillot, J., and Konska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Ecol.*, 25, 203-230.

Guillot J, Guerry M, Kanska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M and Penault-Llorca F. (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer.* 91, 141-158.

-H-

Hardman KD and Ainsworth CF. (1972). Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry.* 11, 4910-4919.

Higuichi M., Fukumoto, y. And Iwai, K. (1988). Appearance of lectin in winged bean pods during seed development after flowering. *J. Agric. Food Chem.* 36 (3) : 534-53.

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

Huang Y, Tan J M, Wang Z Y I S W, Hung X, Wang W, Ren Q. (2014). Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheirsinensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 255–266.

-I-

Imberty, A., Wimmerowa, M., Mitchell, E.P. and Gilboa-Garber, N. (2004) Structure of lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan recognition. *Microb. Infect.*6, 222-229.

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

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

Imberty Anne. (2011). Les bactéries aiment nos sucres : approche structurale et thermodynamique des interactions protéines et glucides In « De la recherche à l'enseignement 8 Septembre 2012 ». Société Chimique de France. Paris Tech , 1-12.

-J-

Jaffe WG. (1980). hemagglutinins (Lectins) .In toxic constituents of plant foodstuffs. New – York. Academic Press. pp 502.

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

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

-K-

Kawsar S A, Aftabuddin S, Yasuimitsu H, Ozeki Y. (2010). The cytotoxic activity of two D-galactose bindinglectins purified from marine invertebrates. *Arch. Biol. Sci. Belgarde* 62(4), 1027-1034.

Kenoth R et al. (2001). Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichsanthes cucumerina* seed lectin. *Eur.J. Biochem.*268, 5541-5549 .

Kokourek,J. and Horejsi,V.(1981).Definong a lectin .*Nature* ,290,188

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

Kulkarni GV. (1998). Role of mitochondrial membrane potential in concanavalinA induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell.Research.*245,170-178.

-L-

Laemmli D. K. and Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology.* 80, 575-599.

- LAIJA. S. N., MAHESH. S., SMITHA. L. S., REMANI. P (2010).** Isolation and Partial characterization of two plant lectins. *Current Research Journal of Biological Sciences*, . 2(4): 232-237.
- Lee, Y.C. and Lee, R.T. (1995)** Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.
- Leffler H ,Carlsson S, Hedlund M, Qian Y and Poirier F. (2004).** Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433-440.
- Lenka s., Imberty A., Jaroslav,k.(2006).**Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltrasferases. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph fourier. universitegrenoble i – joseph fourier.
- Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P. and Acharya, K.R. (1998).**Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry*, 37, 13930-13940.
- Liener I, Sharon N, Goldstein J. (1986).** The lectins Properties. Functions and Applications in biologieand medicine. Academic Press INC. London LID. pp 13-24.
- LisH , Sharon N. (1998).** Lectins: carbohydrate- specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev* 98, 637-674.
- Lopez S. (2003).** Anti-humainimmunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from Narcissus species. *Planta medica.*69 (2), 109-112 .
- Low, D., Braaten, B. and Van der Woude, M. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology PressA, Washington D.C.

-M-

Meite A, Kauame K G, Kati-Coulibaly S. (2006). Substances antinutritionnelles. *Méd.Nut* 42(4), 179-187.

Merritt, E.A., Sarfaty, S., Van Den Akker, F., L'hoir, C., Martial, J.A. and Hol, W.G.J. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.*, 3, 166-175.

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

Mukherjee S , Zheng H , Derebe M G, Callenberg K M , Partch C L, Rollins D , Propheter D C, Jiang Q X.(2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*. 505, 103–107.

Murdock LL, Shade RE .(2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectectes. *J.Agric. food. Chem.* 50 (22),6605-6611 .

Myoshim. et Al (1982). The lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. vitaminol*, , 28, 255-264.

-N-

Nachbar M S , Oppenheim J D.(1980). Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33, 2238 -2345.

Necib Y, Bahi A, MerouaneF ,Bouadi H , Boulahrouf K.(2015).comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperusrotundus*, *Pistacialentiscus* and *Rutagraveolens*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1), 1720-1733.

Ng T.B. (2004).Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073.**Nussenzweig, R. S. (1967)** *Exp. Parasit.*, 21, 224.

Nomura K., Ashida H., Uemura N., Kushida S., Ozaki, T., et Yoshika M. (1998). purification and caractérisation of a mannose/glucose-specific lectin from castanea crenata. *phytochemistry*.49 (3) 667-673.

-P-

Patrick H.K Ngai, T.B Ng.,(2004). A mushroom (*Ganodermacapense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; V. 314 (4):988-993.

Pemberton.(1994).Agglutinins from some british higher fungi. *Mycol. Res.*, 98, 277-290.

PeumansWJ ,Vandamme JM. (1995).lectine as plant defenseproteins. *Plant Physiol*.109,347-352.

POIROUX. G (2011). Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et Biochimie*.

Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier,.Pp: 35-50.

Pontet M. (1996). Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines animales: les galectines. *Immunoanal.Biol. Spéc* 11,297-305.

Praveen Kumar Vemuri 1, BhavanaTalluri, Ananya Sharma, GeethikaAkkala and Vijaya Lakshmi Bodiga (2015).Isolation and Characterization of a Lactose-Binding Lectin from *Ocimum sanctum*.*Journal of Applied Pharmaceutical Science*, ; V. 5 (10) : 113-117.

Pusztai A, Grant G, Spencer RJ, et al (1993). Le creux excrétoire d'*Escherichia coli* induit par la lectine de haricot rénal dans l'intestin grêle est bloqué par GNA, une lectine spécifique au mannose. *Journal of Applied Bacteriology* .75 (4): 360-368. [[PubMed](#)].

-Q-

QueensleyEghianruwa , OludeleOdekanyin and Adenike Kuku (2011). Physicochemical properties and acute toxicity studies of a lectin from the saline extract of the fruiting bodies of the shiitake mushroom, *Lentinulaedodes* (Berk). *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, V.2 (4): 309-317.

-R-

Ram Sarup Singh, HemantPreet Kaur and Jatinder Singh (2014). Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillusgorakhpurensis*: Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity. *PLoS One A Peer-Reviewed, Open Access Journal*, v.9 (10).

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

Roberts, D.L., Weix, D.J., Dahms, N.M. and Kim, J.J. (1998) Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell*, 93, 639-648.

Robert K, Marry MD, PhD. (2008). Les glycoprotéines in *Biochimie de Harper*. DEBOECK ,527.

Roos A, Daha M R, Vanpelt J, Berger S P. (2007). Lectine liant le mannose dans les maladies rénales. *Flammarion-Médecine-Science-Actualités Néphrologiques* 13 , 134- 157.

Rüdiger, H. (1993) Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology*. Springer, Berlin, pp. 31-46.

Rudiger, H. and Gabius, H.J. (2001) Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J*, 18, 589-613.

-S-

Schrag, J.D., Bergeron, J.J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D.Y. and Cygler, M.

(2001) The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, 8, 633-644.

segrest JP and jackson RL.(1972). Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Pp. 54-62. In : methods in enzymology. V 28. Part B. V. Ginsburg (ed). New Yorck: Academic Press, Inc. 1057p.

S.G. Gmel, Santel and Hommers (2002).Purification et caractérisation d'une lectine d'algue marine rouge *Pterocladia capillacea*. *Revista Brasil. Bot.*, V.25 (4) :397-403.

Sharon N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Advances in immunology* 34. 213-291.

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

Sharon N and Halima, Lis. (2003). Lectins. Kluwer Academic Publishers.

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

She Q B, NG T B, Liu W K A. (1998). Novel lectin with potent immunomodulatory activity Isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*.247, 106-111.

Size, S.C.W., Ho, J.C.K. and Liu, W.K. (2004)*Volvariellavolvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *J. cell. Biochemistry*, 92, 1193-1202.

Somers WS , Tang J , Shaw GD and Camphausen RT. (2000). Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLex and PSGL-1. *Cell.* 103, 467-479.

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

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

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

-T-

Tanne A ,Neyrolles O.(2010). C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence.* 1, 285–290.

-V-

Valentiner U et al .(2003). The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.*23 (2B), 1197-1206 .

Vandamme E J, Peumans W J ,Barre A, Rougé P.(1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences.*17(6) , 575-692

Van Damme EJM, Lannoo N, Fouquaert E, Peumans WJ (2003). L'identification de protéines inductrices de protéines cytoplasmiques / nucléaires inducibles recommande de développer de nouveaux concepts sur le rôle des lectines végétales. *Glycoconjugate Journal*, 20 (7-8): 449-460. [PubMed]

Vyas, N.K. (1991) Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 1, 732-740.

-W-

Wang. H., NG. T. G(1998). Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordicacharantica*) seeds: sequence comparaisn with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*, 253: 143-146.

Warburg ET Christian W, (1941). Isolierung-und Kristallisation des garungsferments Enolase. *Biochem.Z.*, 310,384-421.

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

Weiwei Zhang, GuotingTian, XueranGeng, Yongchang Zhao, Tzi Bun Ng, Liyan Zhao

Et Hexiang Wang (2014). Isolation et caractérisation d'une nouvelle lectine à partir duChampignon comestible *strophariarugosoannulata*.

Wimer BM (1990). Les caractéristiques de PHA-L4, l'isoelectine mitogène de la phytohémagglutinine, en tant que modificateur de réponse biologique idéal. *Biothérapie moléculaire* . ; 2 (1): 4-17. [PubMed]

Wright, C.S. (1980) Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J MolBiol*, 141, 267-291.

-X-

XuS , Wang L , Wang X W , Zhao Y R B I W J , Zhao X F , Wang J XL.(2014).Type lectin from the kuruma shrimp marsupenaesusjaponicus promotes hemocyte

phagocytosis. Dev. Comp. Immunol. 2014. 44, 397–405 .

-Y-

Ye XY, Ng TB, Tsang PWK, Wang J (2001). Isolation d'une lectine homodimère avec des activités antifongiques et antivirales à partir de graines de haricots rouges (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Protein Chemistry*, 20 (5): 367-375. [PubMed]

Yuka Kobayashi, Kouji Kobayashi, Kanako Umehara, Hideo Dohra, Takeomi Murata, Taichi Usui and Hirokazu Kawagishi (2004). Purification, Characterization, and Sugar Binding Specificity of an *N*-Glycolylneuraminic Acid-specific Lectin from the Mushroom *Chlorophyllum molybdites*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.,.

YR Li, QH Liu, HX Wang and TB Ng (2008). Une nouvelle lectine avec de puissantes activités inhibitrices de la transcriptase inverse antitumorale, mitogène et du VIH-1 à partir du champignon comestible *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimical et Biophysical Acta (BBA)*, ;V.1780(1) :51-57.

-Z-

Zhang H , Peatman E , Liu H , Feng T , Chen L , Liu Z.(2012). Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2012. 32 , 598-608.

Zitouni A, Bahi A, Necib Y. (2015). Immunomodulatory Activity of Lectins Extracted from *Terfeziabouderei*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 50 ,285-287 .

<http://champyves.pagesperso-orange.fr/champignons/fichier-htm/lames/agaric-jaunissant.htm>

<https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Agaric-jaunissant>

<http://micologia34.canalbolog.com/archives/2010/09/05/18986288.html>

Annexe

Annexe 01 : Composition du tampon phosphate di-sodique PBS (0,1M ; pH 7,4).

Pour préparer 1000 ml.

Produit chimique	concentration	Quantité
phosphate di-sodique (Na ₂ HPO ₄)	10 mM	1,44 g
Phosphate de mono-potassium (KH ₂ PO ₄)	2 mM	0,24g
Chlorure de sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de potassium (KCl)	2,7 mM	0,2g
Eau distillée	-	1 L

Annexe 02 : Préparation de NaCl à 0,9%:

Chlore de sodium (NaCl)	Eau distillée
0,9 g	100 ml

Annexe 03 : préparation des monosaccharides.

Sucre	Na Cl
0,1 g	1 ml

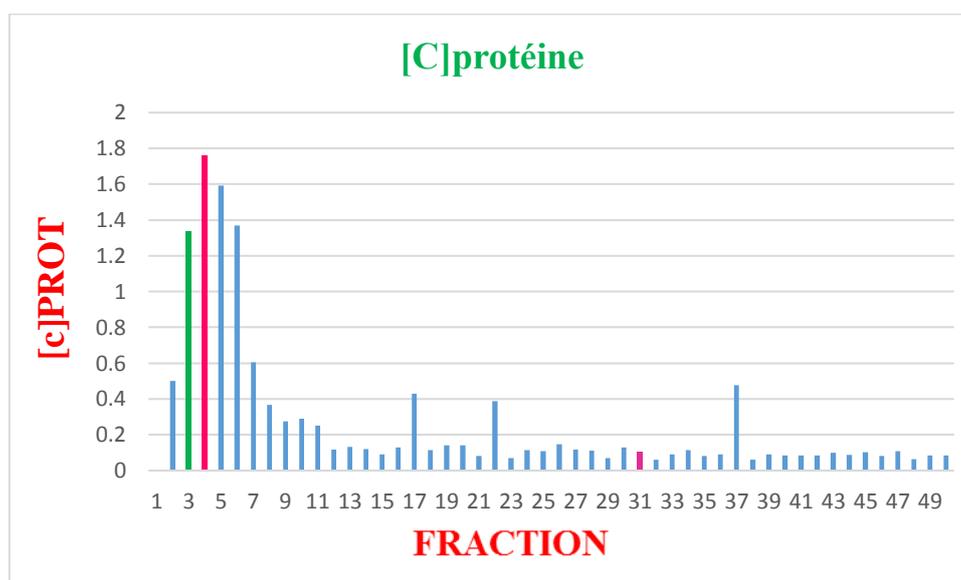
Annexe 04 : Préparation des métaux :

Métaux	Quantité	NaCl
MgCl ₂	0,048 g	100 ml
CaCl ₂	0,032 g	4 ml
MnCl ₂	0,15 g	4 ml

Annexe 05 : l'absorbance et la concentration des fractions après DEAE-Cellulose.

F	DO ₁	DO ₂	[C]	F	DO ₁	DO ₂	[C]	F	DO ₁	DO ₂	[C]
1	0,219	0,378	0,0052	21	0,249	0,399	0,08	41	0,204	0,306	0,0836
2	0,672	0,710	0,502	22	0,251	0,372	0,389	42	0,206	0,308	0,085
3	1,755	1,824	1,334	23	0,221	0,358	0,07	43	0,21	0,299	0,098
4	1,907	1,574	1,759	24	0,249	0,359	0,113	44	0,201	0,293	0,0888
5	1,864	1,705	1,593	25	0,216	0,299	0,107	45	0,206	0,286	0,1019
6	1,559	1,378	1,369	26	0,284	0,384	0,148	46	0,215	0,331	0,081
7	0,869	0,975	0,605	27	0,235	0,324	0,118	47	0,208	0,282	0,108
8	0,616	0,772	0,368	28	0,224	0,311	0,11	48	0,195	0,312	0,065
9	0,49	0,636	0,276	29	0,21	0,328	0,07	49	0,215	0,329	0,0832
10	0,465	0,565	0,291	30	0,24	0,319	0,129	50	0,207	0,311	0,084
11	0,429	0,544	0,251	31	0,232	0,336	0,104	F : fraction après DEAE-Cellulose DO ₁ : absorbance à 280 nm DO ₂ : absorbance à 260 nm [C] : concentration des protéines			
12	0,374	0,553	0,117	32	0,215	0,356	0,06				
13	0,331	0,499	0,133	33	0,231	0,343	0,09				
14	0,299	0,452	0,119	34	0,253	0,365	0,114				
15	0,278	0,441	0,09	35	0,218	0,337	0,08				

16	0,273	0,387	0,129	36	0,225	0,333	0,09
17	0,278	0,428	0,43	37	0,636	0,669	0,477
18	0,262	0,384	0,114	38	0,233	0,393	0,06
19	0,262	0,348	0,141	39	0,223	0,333	0,09
20	0,265	0,353	0,142	40	0,208	0,314	0,0837



Concentrations des fractions après DEAE-Cellulose.

Annexe 06 : Solutions utilisées pour la SDS-PAGE.

✚ **Solution mère d'acrylamide à 40% (à préparer avec gants et masque) :**

Acrylamide	Eau distillée
40 g	100 ml

✚ **Solution mère de bisacrylamide à 2 % (à préparer avec gants et masque) :**

Bisacrylamide	Eau distillée
2 g	100 ml

✚ **Solution stock de SDS à 10 % :**

Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	Eau distillée
10 g	100 ml

✚ **Solution d'Ammonium persulfate APS à 1% :**

APS	Eau distillée
0.1 g	10 ml

✚ **Tampon Tris-HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque) :**

Tris	Eau distillée
60,57 g	400 ml
Ajuster à pH 8,8 et compléter le volume à 500 ml avec de l'eau distillée	

✚ **Tampon Tris HCl pH 6,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque) :**

Tris	Eau distillée
30,285 g	200 ml
Ajuster à pH 6,8 et compléter jusqu'à 250 ml avec de l'eau distillée	

 **Tampon d'électrophorèse :**

Réactif	Quantité
Glycine	70,55 g
Tris	15 g
SDS	5 g
Eau distillée	5000 ml

Annexe 07 : préparation de gel de séparation à 11% : (T : 12,52%, C : 0,97%).

réactifs	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2,4
Eau distillée	8,25
Tris-HCl pH 8.8	14,65
SDS à 10	0,5
APS à 1%	1
TEMED	0,02

Annexe 08 : préparation de gel de concentration (stacking gel) à 4% : (T : 2.88%, C : 1.42%).

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1
Bisacrylamide 2%	0,3
Eau distillée	10,2

Tris-HCl pH 6.8	1,7
SDS à 10 %	0,14
APS à 1%	0,7
TEMED	0,014

Annexe 09 : préparation d'une solution de coloration pour le gel d'électrophorèse :

TCA 60%	Solution mère de bleu de coomassie R250	Eau distillée
50 ml	12,5 ml	250 ml

 **Solution mère de bleu de Coomassie R250 :**

Bleu de Coomassie R250	Ethanol 95°
5 g	500 ml

N.B:L'éthanol est mis en agitation, le bleu de Coomassie est ensuite ajouté, pour qu'il ne prenne pas de masse, laisser agiter au moins deux heures, la solution est ensuite filtrée.

Caractérisation partielle de psalliotte jaunissante d'*Agaricus xanthodermus*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Biochimie
Moléculaire et Santé.

Résumé : Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires, polyvalentes d'origine non-immunitaire, elles reconnaissent spécifiquement certaines structures oligosaccharidiques.

Le but de ce travail est de détecter la présence de lectines dans les extraits du champignon toxique « *Agaricus Xanthodermus* » communément appelé psalliotte jaunissante.

Dans notre étude, nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines tout en mettant en évidence leur activité hémagglutinante, cette dernière est stable dans un intervalle de pH allant de 2 jusqu'à 12.

Le traitement thermique de ces lectines révèle une thermo-résistance pouvant atteindre 100°C.

Un test d'inhibition a été réalisé par la suite avec différents monosaccharides et une glycoprotéine et a montré que nos lectines présentent une affinité pour le glucose, le lactose et le saccharose.

La purification de nos protéines est faite par chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose, et à révéler l'existence probable de trois (3) sous-unités dans la SDS-PAGE, la première est un monomère dont la masse moléculaire est de 150 KDa et l'autre est un dimère de 100 KDa dont la masse moléculaire de chaque sous-unité est de 50 KDa.

Mots clés : Lectines, glycoprotéines, *Agaricus Xanthodermus*, activité hémagglutinante, monosaccharides, inhibition, affinité, purification.

Laboratoire : BIOCHIME, Génie microbiologique et application, génétique Biochimie et Biotechnologies végétales.

Membres du jury

Président du jury : Mr Khelifi D	(Pr-UFM Constantine)
Rapporteur : Mr zitouni A	(MC-UFM Constantine)
Examineurs : Mme BAHI A	(MC-UFM Constantine)

Date de soutenance : 02/07/2016