



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث 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 و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
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 extraites du champignon de
couche
« Agaricus Bisporus »**

Présenté et soutenu par : Abdi Nesrine

Le : 28/06/2017

Jury d'évaluation :

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

Encadreur : Mr Zitouni.A Maitre de conférence - UFM Constantine

Examineur : Mme Bellil.I Docteur – UFM Constantine

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Avant de présenter mon travail, je souhaiterais exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidée tout au long de mon parcours.

A monsieur Abdelbaki Zitouni, mon professeur, mon encadreur, cette force tranquille qui m'a guidée dans mon travail et encouragée tout au long de mon cursus universitaire.

A l'université des frères Mentouri Constantine, qui m'a permis d'accéder au laboratoire de biochimie et mis à ma disposition les produits et le matériel dont j'ai eu besoin, sans compter son aimable personnel.

Au professeur monsieur Khelifi Douadi pour m'avoir offert le privilège de travailler dans son laboratoire et surtout pour avoir accepté de présider et juger mon travail, et à monsieur Bousba Bachir d'avoir accepté de l'examiner.

A mes adorables camarades Dalel Bouzergui et Houda Hmames pour leur forte contribution, leur sympathie, leur gentillesse et leur complicité..

A monsieur Toumi Seddik-eddine, pour m'avoir accordée de son temps et surtout de son savoir, et qui m'a chaperonnée ainsi que mes camarades à plusieurs étapes de notre parcours, et à monsieur Bahri pour son aide précieuse dans l'animalerie.

A Leila Zerougui et Samia Bendamen, les crèmes du laboratoire d'enzymologie pour n'avoir jamais refusé mes maintes sollicitations.

A mes chers parents, auxquels je dois la vie, pour m'avoir aimée et soutenue durant ces vingt-deux dernières années, inculquée leurs valeurs et permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui, je vous aime très fort, sans oublier mes sœurs adorées, Maya et Rym, ma famille, mes amis et tous ceux que j'ai pu côtoyer durant mon parcours.

Et enfin, un grand merci au professeur Bensegueni Abderrahmane sans qui mon accès à la filière n'aurait jamais eu lieu.

Une pensée particulière à ma chère tante défunte « Wassila Belkacem » dont l'amour me remplissait le cœur et ma chère grand-mère défunte « Fatima-Zohra Benyamina » dont le souvenir reste à jamais gravé dans ma mémoire.

Résumé

Les lectines sont des glycoprotéines ayant la capacité de se lier spécifiquement et de manière réversible aux hydrates de carbones des surfaces cellulaires. Elles sont multivalentes et provoquent dans certains cas l'agglutination des cellules, et sont trouvées dans pratiquement tous les organismes vivants.

Les champignons y compris les moisissures appartiennent à une importante division d'organismes et bénéficient actuellement d'un grand essor dans le domaine biomédical et diverses applications biotechnologiques. Notre objectif se situe dans la caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon comestible « *Agaricus Bisporus* » dit champignon de couche ou champignon de Paris.

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, leur thermo-stabilité et leurs interactions et affinités avec les sucres et les métaux lourds. Elles ont ensuite été partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Mots Clés : Lectines ; Extraction ; Agglutination ; Affinité ; Purification.

مُلخَص

اللكتينات عبارة عن غليكوبروتينات لها القدرة على الإرتباط بشكل خاصّ وعلى طريقة قابلة للتغير بالكربوهيدرات الموجودة على سطح الخلايا. تكون متعددة الوظائف والمصادر، تتسبب في بعض الحالات في ظاهرة التراص مع كريات الدّم الحمراء في الخلايا . نجدها تقريبا في كلّ الكائنات الحية.

تنتمي الفطريات وبما فيها العفن الفطري إلى مجموعة كبيرة من الكائنات، وتتمتع حاليا باستعمال واسع في المجال الطبي ومختلف الإستعمالات البيوتكنولوجية.

يتمثل هدفنا في التمييز الجزئي للكتينات المستحصاة من الفطر المعروف بفطر الدبال أو فطر باريس

هذه البروتينات تم استخراجها واختبارها بهدف البحث عن نشاط التراص مع واستقرارها الحراري، وتفاعلها وتقاربها كريات الدّم الحمراء، للبحث عن السكرّيات والمعادن الثقيلة. تمّ بعد ذلك تنقيتها جزئيا عن طريق عمود متبادل PHi مع للأنيون. تتم تنقيتها تحت ظروف مفسدة لطبيعتها.

كلمات مفتاحية: لكتين، استخلاص، تراص مع كريات الدّم الحمراء، تقارب، تنقية.

Abstract

Lectins are glycoproteins with the ability to be linked specifically and reversibly to the carbohydrates of cell surfaces. They are multivalent and in some cases cause agglutination of cells, they are found practically in all living organisms.

Mushrooms, including fungi, belong to a large division of organisms. They enjoy a large and various use in the biomedical field and in biotechnological applications. Our objective is to partially characterize the lectins extracted from the fungus "Agaricus Bisporus" known as fungi of humus or mushrooms of Paris.

These proteins have been extracted and subjected to several tests in order to search the hemagglutinating activity, their P_Hi, their thermo-stability, and their interactions and affinities with sugars and heavy metals. They were then partially purified using anion exchange column chromatography. The evaluation of their state of purity is carried out under denaturing conditions (SDS-PAGE).

Key Words: Lectins; Extraction; Agglutination; Affinity; Purification.

Sommaire

I.	Introduction	15
	➤ Objectif du travail	16
II.	Généralités sur les lectines	18
	1. Définition des lectines	18
	2. Historique	19
	3. Structures des lectines	22
	3.1. Les lectines simples	23
	3.2. Les lectines en mosaïque	23
	3.3. Les assemblages macromoléculaires	24
	3.4. Structure tridimensionnelle	25
	4. Distribution des lectines dans le monde vivant	25
	4.1 Les lectines présentes chez les plantes	26
	1) Selon la Spécificité osidique	27
	2) Selon la structure quaternaire	28
	a. Les mérolectines	28
	b. Les hololectines	29
	c. Les chimérolectines	29
	d. Les superlectines	29
	4.2 Les lectines des microorganismes	30
	a. Les lectines bactériennes	30
	b. Les lectines fimbriales	30
	c. Les toxines	31
	d. Les lectines solubles	32

4.3	Les lectines de champignons	33
4.3.1.	Caractéristiques	34
4.3.2.	Rôles	34
4.4.	Les lectines présentes chez les animaux	35
4.4.1.	Lectines intracellulaires	35
4.4.2.	Lectines extracellulaires	35
5.	Spécificité et affinité	35
➤	Le site de reconnaissance	36
6.	Rôle des lectines chez les organismes vivants	36
7.	Propriétés des lectines	38
7.1.	Propriétés biologiques.....	38
7.1.1.	Liaison avec les sucres (interaction lectine-glucide).....	38
7.1.2.	Activité mitogène	39
7.1.3.	Agglutination des cellules	39
7.2.	Propriétés médicinales	39
7.2.1.	Propriété anticancéreuse	39
7.2.2.	Propriété antivirale	40
7.2.3.	Propriété antibactérienne	40
7.2.4.	Propriété antifongique	40
7.2.5.	Propriété immuno-modulatrice.....	40
7.2.6.	Autres propriétés.....	41
8.	Les lectines les mieux connues	41
9.	Domaines d'applications des lectines	41
9.1.	Domaine biomédical	42

9.1.1.	Immunologie.....	42
9.1.2.	Hématologie.....	42
9.1.3.	Biologie cellulaire.....	42
9.1.4.	Cancérologie.....	43
9.2.	Domaine agronomique.....	44
III.	Généralités sur le champignon de couche.....	45
1.	Définition de l'agaric bispore.....	45
2.	Classification scientifique de l'agaric bispore.....	46
3.	Morphologie, reproduction et développement de l'Agaricus.....	46
4.	Culture de l'agaric bispore.....	47
5.	Les ennemis du champignon de couche.....	48
IV.	Matériel et méthodes.....	50
1.	Extraction et fractionnement des protéines.....	50
2.	Dosage des protéines.....	51
3.	Tests d'héماغglutination.....	53
➤	Réalisation du test d'héماغglutination.....	53
➤	Test de la limite d'héماغglutination.....	54
➤	Effet de la température sur l'héماغglutination.....	54
➤	Effet de la température sur la limite d'héماغglutination.....	55
➤	Effet du pH sur l'héماغglutination.....	55
➤	Effet du pH sur la limite d'héماغglutination.....	56
➤	Test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et une glycoprotéine.....	56
➤	Test de la limite d'inhibition de l'héماغglutination par les saccharides et une glycoprotéine.....	57

➤	Test des métaux lourds (oligoéléments)	57
4.	Purification des protéines sur chromatographie échangeuse d'anions.....	57
5.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ..	58
V.	Résultats et discussion.....	60
1.	Dosage des protéines	60
2.	Résultats des tests d'hémagglutination	61
➤	Résultats du test d'hémagglutination réalisé après fractionnement des protéines .	61
➤	Résultats du test de la limite d'hémagglutination	62
➤	Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination.....	64
➤	Résultat du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination	65
➤	Résultats du test de l'effet du pH sur l'hémagglutination.....	66
➤	Résultats du test de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination	67
➤	Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine	69
➤	Résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine	70
➤	Résultats du test des métaux lourds	73
3.	Résultats de la purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions	73
4.	Résultats SDS-PAGE	77
V.	Conclusions générales	79
➤	Perspectives	80
	Références bibliographiques	81
	Annexes.....	89

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de « <i>canavalia ensiformis</i> » en complexe avec le tri-mannosoïde (Lenka <i>et al.</i> , 2006).....	23
Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexé à l'acide sialique (Lenka <i>et al.</i> , 2006).....	24
Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d' <i>Escherichia Coli</i> (Lenka, 2006)	24
Figure 4 : Tétramère de la protéine ConM de « <i>Canavalia maritima</i> » complexée avec le	27
Figure 5 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b),FimH complexé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W).....	31
Figure 6 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)	31
Figure 7 : L-Fucose dans le site de liaison de la lectine PA-IIL (Gianluca, 2006).....	36
Figure 8 : Champignon « <i>agaricus bisporus</i> » (Photo: © Fred Stevens).....	45
Figure 9 : Morphologie et reproduction de l'agaric	47
Figure 10 : culture de l'agaric bispore	48
Figure 11 : Le mycogone <i>Perniciososa</i>	49
Figure 12 : Ramollissement et déformation de l'agaric bispore liés à la molle	49
Figure 13 : Spectrophotomètre UV-Vis	51
Figure 14 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction du volume d'élution des différentes fractions protéiques	75
Figure 15 : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes	78

Liste des tableaux

Tableau 1: Historique et propriétés des lectines les plus connues	20
Tableau 2 : Tableau N°2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (Karoline S.A, 2008)	25
Tableau 3 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato <i>et coll.</i> , 1991).	27
Tableau 4 : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme <i>et al.</i> 1998).....	29
Tableau 5 : Lectines bactériennes solubles	32
Tableau 6 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)	33
Tableau 7 : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant (Guillot, 1997)	37
Tableau 8 : Lectines importantes (Hermoso .J, 2005).....	41
Tableau 9 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (Kenoth et ses collaborateurs, 2001).....	43
Tableau 10 : Classification scientifique de l'Agaric Bisporus (Hibbett <i>et al.</i> , 2007)	46
Tableau 11 : résultats du dosage des protéines	60
Tableau 12 : résultats du test d'hémagglutination des quatre surnageants	61
Tableau 13 : Résultats du test de la limite d'hémagglutination	62
Tableau 14: Dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm et 260nm.....	63
Tableau 15 : Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination.....	64
Tableau 16 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination.....	65
Tableau 17 : résultats du test de l'effet du pH sur l'hémagglutination	66
Tableau 18 : Résultats du test de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination.....	67
Tableau 19: Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine.....	69
Tableau 20 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine.....	71
Tableau 21 : Résultats du test des métaux lourds.....	73

Tableau 22 : Résultats du dosage des cinquante fractions obtenues après purification des protéines (Annexe 9)	74
Tableau 23 : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les cinquante fractions obtenues après purification des protéines.....	76
Tableau 24 : résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions 3 et 4 obtenues après purification des protéines.....	77
Tableau 25 : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse	77

Liste des abréviations

A : Absorbance

ConA : Concanavaline A lectin

ConM : Canavalia Maritima

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

DiscI; DiscII : Discoidine 1 et 2

DEAE-C : Cellulose diéthyl-aminoéthyle

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

Fuc : L-fucose

Gal, GalNAc : D-galactose, N-acethylgalactosamine

Gal: galactose

Glc, GLCNAC : D-glucose, N-acétylglucosamine

KDa : kilo Dalton

PBS : Phosphate buffer saline

PAPG : Pyelonephritis-associated Pili G(sous-unité).C'est une adhésine (Protéine)

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PA-IIL: *Pseudomonas aeruginosa* lectin II

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TrFBL1 et 2 :Terfezia Boudieri Fruiting Body Lectin1 et 2

TSA: Thermal Shift Assay

Tris : 2-amino-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

I. Introduction

Les lectines sont des glycoprotéines que l'on trouve en fortes concentrations dans la plupart des graines de légumineuses sèches (lentilles, fèves, pois), mais aussi de façon plus large dans la nature (autres familles de plantes, champignons et animaux).

La première lectine identifiée est connue sous le terme d'hémagglutinine, extraite à partir du pois «*Canavalia ensiformis*», découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 (Université de Dorpat, Russie). Le composé actif purifié, est la concanavaline A. Une autre lectine populaire est la ricine, très toxique, obtenue à partir des graines de ricin.

Les lectines sont des protéines capables de se lier spécifiquement de façon non covalente et réversible à des glucides, elles se sont donc révélées être des outils très utilisés au laboratoire dans les techniques préparatives ou analytiques. L'intérêt était, motivé surtout par leur utilisation dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides, tels que les déterminants de groupes sanguins et de glycoconjugués surtout des glycoprotéines, on peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité osidique:

- Celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique.
- Celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon & Lis, 2003**).

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

Elles possèdent aussi la propriété d'agglutiner des cellules (comme les érythrocytes) en se fixant sur les polysaccharides membranaires ou les glycoprotéines présents dans les matrices extracellulaires, ou dans les fluides biologiques comme le sérum. (**Herrmann Stillmark, 1888**).

L'intérêt accordé à la recherche sur les lectines repose aujourd'hui sur leur capacité unique à décrypter l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont les récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clés dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (**Wiley, 1987**).

De même, les lectines situées sur les surfaces bactériennes, virales ou parasitaires intestinales reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection.

Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours une allégorie. Une supposition très probable est le rôle de défense du végétal contre les phyto-pathogènes (ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante), mais d'autres possibilités ont été considérées (**Rudiger, 2001**).

Par contre, les rôles des lectines animales ont été étudiés en détail comme l'indiquent les exemples suivants : L'adhésion des lymphocytes sur la paroi interne des vaisseaux sanguins est un processus important, qui précède leur extravasation vers les organes lymphoïdes ou vers les zones infectées. Des lectines appelées « Selectines » situées sur la surface des vaisseaux sanguins reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des lymphocytes (**Bevilacqua, 1991**). Les lectines animales ont des rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. La toute première interaction qui s'effectue pendant les processus de fertilisation est la reconnaissance entre une lectine du spermatozoïde « spermadhesine » et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes (**Topfer-Petersen, 1998**).

➤ **Objectif du travail**

Notre étude consiste en une purification et caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon de couche « Agaricus Bisporus » dont la bibliographie ne rapporte que très peu d'informations.

Le protocole expérimental et les méthodes utilisées sont les suivants :

- Extraction et Fractionnement des protéines à partir des champignons broyés dans l'azote liquide et dilués dans un tampon phosphate (PSB) suivis de filtrations et de centrifugations.
- Test d'hémagglutination sur érythrocytes de lapin afin de déterminer l'activité hémagglutinante des protéines.
- Test des effets du pH et de la température sur l'hémagglutination en présence de ces protéines afin de déterminer leur pH et leur thermo-stabilité.

- Test d'inhibition d'héماغglutination en présence de différents monosaccharides et d'une glycoprotéine pour déterminer la spécificité.
- Test d'héماغglutination en présence de métaux lourds
- Purification des lectines par chromatographie échangeuse d'anions (sur colonne de DEAE-Cellulose)
- Contrôle de la pureté et estimation des poids moléculaires par SDS-PAGE.

II. Généralités sur les lectines

1. Définition des lectines

Les lectines sont une famille diversifiée de protéines d'origine non-immunitaire, aptes à reconnaître des glucides complexes de façon spécifique et réversible, ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats (**Lis and Sharon, 1998**). D'autre part, l'affirmation « d'origine non immunitaire » peut être controversée puisque certaines lectines sont impliquées dans le barrage immunitaire inné, cette affirmation souligne la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis (**Karolin.S, 2008**).

Les lectines existent dans toutes les souches du règne vivant, elles sont dites « ubiquitaires » car on les trouve chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, les animaux et les insectes.

Elles sont aussi appelées « agglutinines » car elles sont capables d'agglutiner les cellules comme les érythrocytes et les glycoconjugués, cet aspect très important des lectines est du au fait que ces protéines sont majoritairement multivalentes (**Gianluca, 2006**).

L'agglutination des érythrocytes est le test principal permettant de détecter les lectines, leurs masses moléculaires sont généralement comprises entre 50 et 120 KDa.

Les lectines sont donc des glycoprotéines pouvant agglutiner les cellules et précipiter les polysaccharides et les glycoconjugués (**Goldstein, 1980**). Ces molécules ont été successivement élues agglutinines, hémagglutinines, ou bien phyto-hémagglutinines et pour finir « Lectines ».

La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides avec une plus grande affinité que pour certains oligosaccharides (**Gianluca Cioci, 2006**), elles peuvent aussi interagir avec des systèmes biologiques et développer une cascade d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants, ces interactions sont d'un grand essor car elles sont impliquées dans divers processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis & Sharon, 1998**) comme par exemple l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas, ces effets nuisibles des lectines sont inactivés par leur traitement thermique dont l'efficacité dépend de la température et de la durée de traitement (**Kokourek,J. and Horejsi,V.1981**).

L'abondance de ces molécules et leur aisance de purification leur ont permis d'être exploitées dans de larges domaines biologiques, aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical :

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (**Hirabayashi, J. 2004**)
- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (**Boyd and Shapleigh, E. 1954**) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

2. Historique

Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du XXe siècle mais la communauté scientifique ne s'y est intéressée qu'à partir des années soixante en simultanéité avec la nativité de la glycobiologie.

Les scientifiques étaient préoccupés par l'utilisation des lectines dans la détection, l'isolation et la caractérisation des oligosaccharides. L'utilisation des lectines a permis de découvrir que certains états physiologiques et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules. Le nombre de publications sur les lectines s'est multiplié grâce à l'abondance des lectines dans tous les organismes vivants et leur aisance de purification.

Dernièrement les lectines ont été considérées comme molécules bioactives, les chercheurs scientifiques se sont alors de plus en plus intéressés aux rôles biologiques de ces protéines, ils se sont tout de suite aperçus de la grande variabilité des lectines (structure primaire et tridimensionnelle).

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888, connue sous le terme d'hémagglutinine, Stillmark décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin « *Ricinus Communis* » agglutinaient des érythrocytes (**Sharon & Lis, 2004**). A partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale ayant une activité hémagglutinante ont été découvertes, des chercheurs ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and shapleigh, 1954**).

Tableau 1: Historique et propriétés des lectines les plus connues (Renato DE A, Moreira. 1991).

Année	Auteurs	Découvertes
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <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 de la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' « <i>Abrus precatorius</i> »
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur

1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes à hémagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavoline 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>Phaseolus Vulgaris</i> »
1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de « <i>Phaseolus vulgaris</i> »

1952	Watkins & Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples ; démonstration à l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupes sanguins
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de « <i>Phaseolus vulgaris</i> »
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>E. Coli</i>

3. Structures des lectines

D'un point de vue structural, les lectines sont divisées en 3 grandes classes selon leur topologie.

3.1. Les lectines simples

Cette catégorie de lectines enveloppe pratiquement toutes les lectines végétales mais aussi : les lectines bactériennes solubles, les galectines et une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose. (Lenka *et al.*, 2006)

Elles sont formées de plusieurs monomères dont les masses moléculaires ne dépassent généralement pas les 40 KDa. (Figure 1)

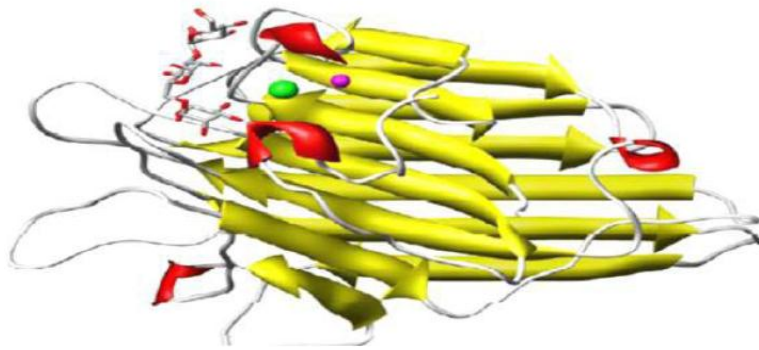


Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de « *canavalia ensiformis* » en complexe avec le tri-mannosoïde (Lenka *et al.*, 2006).

La protéine est représentée 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 boules (Lenka *et al.*, 2006)

3.2. Les lectines en mosaïque

Ce groupe comporte différentes protéines issues de diverses sources (virus, animaux), ce sont des molécules complexes composées de plusieurs types de domaines dont un seul comporte un site de liaison (Lenka *et al.*, 2006). Dans ce groupe se retrouvent les hémagglutinines virales et les lectines animales de Type C (endocytiques, collectines & sélectines), leurs masses moléculaires sont variables. (Figure 2)

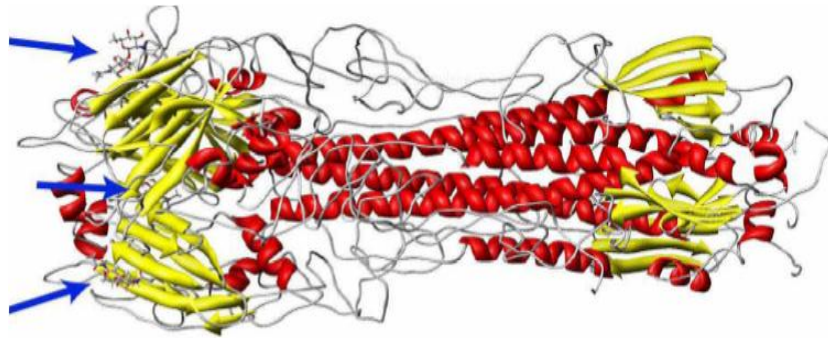


Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexé à l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

3.3. Les assemblages macromoléculaires

Ces lectines sont le plus souvent rencontrées chez les bactéries au niveau des fibrilles, elles forment des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre et jusqu'à 100 nm de longueur, elles sont appelées: Fimbriae ou pili (elles s'insèrent dans la structure du filament). (**Figure3**)

La plus grande partie d'un filament fimbriale est formée par la polymérisation d'une unité prédominante qui ne joue qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, le plus souvent 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)

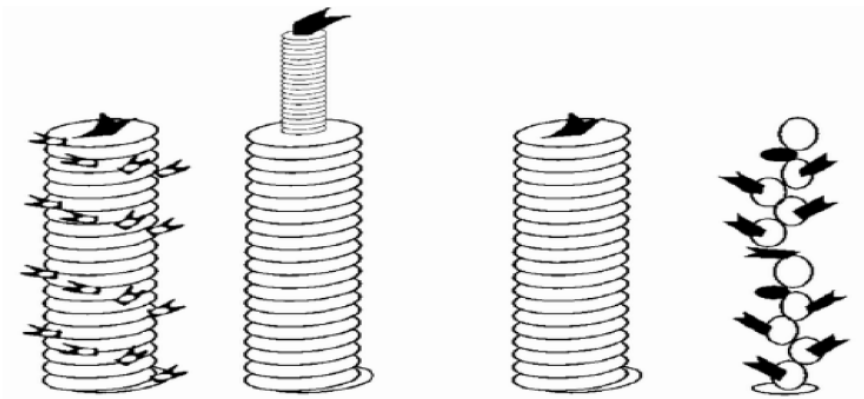


Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia Coli* (Lenka, 2006)

3.4. Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle des lectines est constituée de feuilles β reliés par un nœud et formant des chaînes antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon & Lis, 1990).

Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regrouper jusqu'à trois régions chevauchantes, la région centrale est constituée par les résidus d'interactions et les ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) nécessaires à ces interactions, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction : lectine-carbohydate. (Sharon & Lis, 1990 ; Young *et* Oomen, 1992).

4. Distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, abondantes chez tous les organismes vivants.

Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle de plus de 1000 lectines. La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes.

Tableau 2 : Tableau N°2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (Karoline S.A, 2008)

Origine	Exemples de lectines	Native	complexé	Total
Plante	ConA, ricine	106	201	307
Bactéries	PA-IL de pseudomonas Toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin <i>Helix pomatia</i> <i>agglutinin</i>	80	152	232

Virus	Hemagglutinine de virus Capside de rotavirus	43	25	68
Champignons	Lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9

4.1 Les lectines présentes chez les plantes

Chez les plantes, les lectines ont été détectées dans les moisissures, les lichens, les champignons et les spermatophytes mais plus fréquemment dans les légumineuses et les Euphorbiacées (**Grant, 1991 ; Renkonen, 1948**).

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g. les lectines de légumineuses, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquences et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (Con A) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (Con A) a été déterminée en 1972 (**Edelman *et al.*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**). Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé « β jelly roll » formé par deux feuillets β superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variété d'assemblages macromoléculaires sous forme de dimères ou de tétramères (**Sinha *et al.*, 2007**). **La Figure 4** représente un tétramère de la protéine Con M de *Canavalia maritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose (**Delatorre *et al.*, 2006**). La géométrie du site de fixation est fixée par la présence d'un ion manganèse et d'un ion calcium qui sont proches du ligand glucidique mais qui n'interagissent pas directement avec lui. Les variations en acides aminés autour du site de reconnaissance apportent la spécificité pour différents monosaccharides et oligosaccharides (**Loris *et al.*, 1998**).

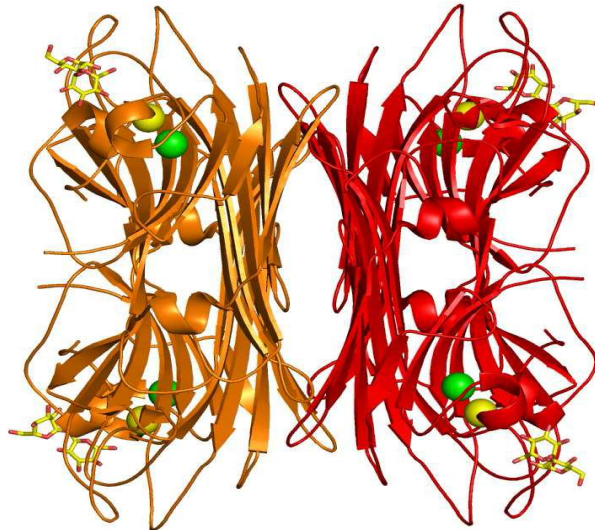


Figure 4 : Tétramère de la protéine ConM de « *Canavalia maritima* » complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre *et al*, 2006).

Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune, Manganèse en vert et les ligands par des bâtonnets.

1) Selon la Spécificité osidique

Selon La classification de Goldstein et Poretz basée sur la spécificité de reconnaissance, les lectines végétales sont classées en 6 groupes :

Lectines spécifiques au D-mannose/D-glucose, au N-acétylglucosamine, au galactose, au N-acétylgalactosamine, au L-fucose et enfin à l'acide sialique. (Wu, 1988)

Cette classification permet de définir les propriétés des lectines, mais elle ne fournit aucun renseignement sur leur structure moléculaire.

Tableau 3 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato *et coll.*, 1991).

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

<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man >Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissus sessilifolia</i>	GlcNac>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GalNAc

2) Selon la structure quaternaire

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

a. Les mérolectines

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

b. Les hololectines

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


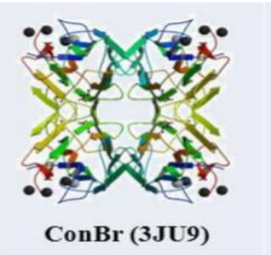

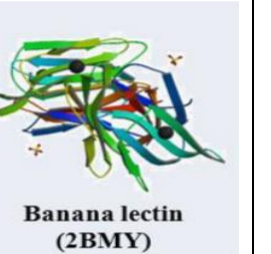
c. Les chimérolectines

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

d. Les superlectines

Peuvent être des hololectines possédant plus de deux sites de reconnaissance des glycanes, chaque site de reconnaissance peut reconnaître des structures glycaniques différentes. Les superlectines peuvent aussi être considérées comme des chimérolectines composées cette fois-ci de deux domaines fixant les glycanes, ces deux domaines sont structuralement et fonctionnellement différents l'un de l'autre.

Tableau 4 : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme *et al.* 1998).

Les mérolectines	Les hololectines	les chimérolectines	les superlectines
 Heveína (1HEV)	 ConBr (3JU9)	 PPL2 (2GSJ)	 Banana lectin (2BMY)

4.2 Les lectines des microorganismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôtes. 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 (**sharon. N, 1996**)

a. Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol, elles jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte durant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré bien évidemment beaucoup d'attention au cours de ces dernières années (**Sharon, 1996**).

Les lectines bactériennes connues sont divisées en trois classes: les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles qui n'appartiennent pas aux deux premières classes (**Imberty, 2005**).

b. Les lectines fimbriales

Les bactéries sont armées d'organelles de surfaces appelées fimbriae qui adrent à différentes fonctions, telle que la reconnaissance et l'adhésion sur des surfaces diverses et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes (**Low, 1996**). Des centaines de fimbriae sont attachés à la surface d'une cellule bactérienne. Dans les trois différents types de fimbriae qui ont été observés (type 1, type P et type IV) l'organisation structurale est similaire (**Soto, 1999**).

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 5**).

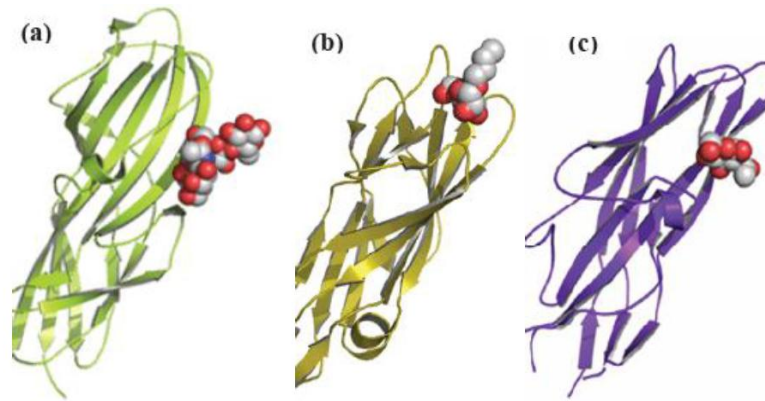


Figure 5 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b),FimH complexé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)

c. Les toxines

Les toxines sont des protéines sécrétées par les bactéries qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. L'endommagement de la cellule peut provenir de la rupture de la paroi cellulaire, par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines de type AB sont sécrétées par différents microorganismes tels que « *Vibrio cholerae* », certaines souches d'*E.coli* (ETEC), « *Shigella dysenteriae* » et « *Bordetella 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 6**) qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire, comme le GM1, GM2 et le Gb3 (**Merritt, 1995**).

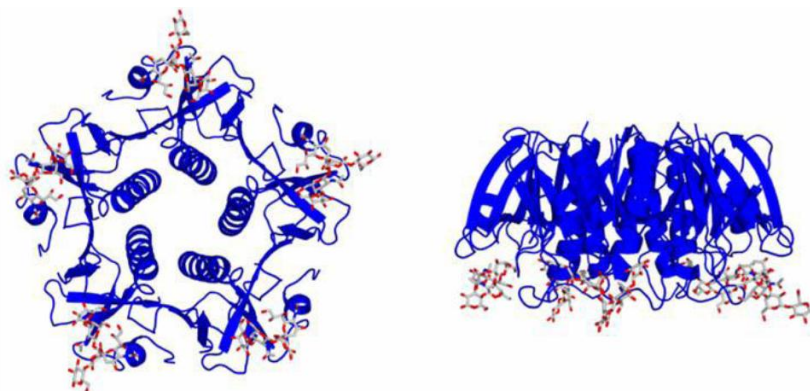


Figure 6 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)

d. Les lectines solubles

Cette famille de lectines bactériennes regroupe toutes les protéines solubles exprimées par des bactéries ayant une affinité pour les sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique (Kostlanova, 2005).

Tableau 5 : Lectines bactériennes solubles

Nom	Type	Spécificité	Caractéristique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-II	Pathogène humain	Galactose	Lectine cytotoxique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-III	Pathogène humain	Fructose/Mannose	Très haute affinité vers le fucose
<i>Cromobacterium violaceum</i> CV-III	Pathogène humain	Fructose/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>Aleuria aurantia</i> lectin », une lectine de champignon

4.3 Les lectines de champignons

Les champignons, y compris les moisissures, appartiennent à une importante division d'organismes. N'étant pas aptes à utiliser la photosynthèse comme les plantes, ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils ont besoin 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 procurent 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, 1998; Sze, 2004)

L'abondance des lectines dans les champignons est remarquable, des tests d'hémagglutination réalisés sur plus de 411 spécimens ont permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés. (Tableau 6)

Tableau 6 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
<i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	2003	Fucose β -propeller à 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) 3116	2006	GlcNAc/NeuNAc β -propeller à 7 lames

4.3.1. Caractéristiques

Les lectines de champignons 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 de 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.

4.3.2. Rôles

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (**Guillot, 1997**). Les lectines des champignons 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, 1993**).

4.4. Les lectines présentes chez les animaux

Chez les animaux, il existe 13 familles de lectines, on peut les diviser en deux groupes :

4.4.1. 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**).

4.4.2. Lectines extracellulaires

Les lectines extracellulaires comprennent toutes les lectines restantes, comme celles de type C et R, ainsi que les galectines, elles sont généralement impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, la clairance de glycoprotéines ou encore dans la reconnaissance de certaines pathologies (**Chabrol et al., 2012**).

5. Spécificité et affinité

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 & lee, 1995**)

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, 2003**). Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park et coll., 2008**). Par exemple, en utilisant les techniques du test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et du test

« Glycans array » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent des quantités réduites de matériel.

➤ Le site de reconnaissance

Chez les lectines spécifiques aux monosaccharides, les sites de liaisons sont généralement sous forme de creux peu profonds sur la surface de la protéine. Par contre, chez les lectines spécifiques aux oligosaccharides, les sites de liaisons sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (**Figure 7**) (**Gianluca, 2006**). Les liaisons hydrogènes, ioniques et van der Waals entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et directionnelles, ce qui leur permet d'avoir une bonne affinité et spécificité (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).

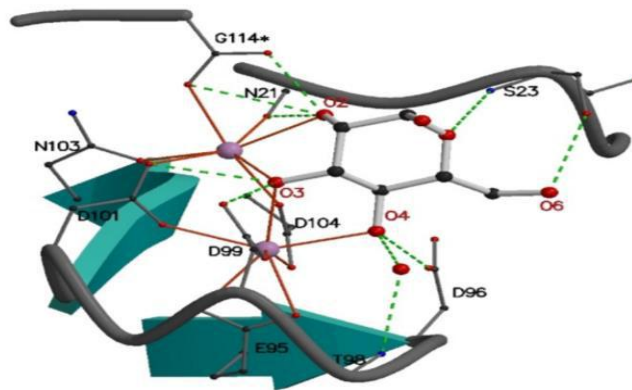


Figure 7 : L-Fucose dans le site de liaison de la lectine PA-III (**Gianluca, 2006**).

6. Rôle des lectines chez les organismes vivants

Le tableau 7 est un récapitulatif des rôles des différentes lectines chez les bactéries, les virus, les toxines et les plantes.

Tableau 7 : Rôles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant (Guillot, 1997)

Lectine	Rôle
Bactéries	
Lectines 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 glycanes dans la matrice extracellulaire
I-type	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire
R-type	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire

7. Propriétés des lectines

Les lectines ont de multiples propriétés :

7.1. Propriétés biologiques

7.1.1. Liaison avec les sucres (interaction lectine-glucide)

Elle est spécifique et propre à chaque lectine afin que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (**Miyoshim et coll., 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 (**Jeyaprakash et al., 2003**). La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakash et al., 2003**).

7.1.2. Activité mitogène

Une des propriétés les plus frappantes des lectines demeure dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes de 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 (**Barbosa *et al.*, 2001**).

Les études concernant les lectines végétales ont montré la capacité de certaines d'entre elles à activer spécifiquement diverses sous-populations lymphocytaires indépendamment de leur spécificité saccharidique (**Wimer, 1996**).

7.1.3. Agglutination des cellules

L'agglutination cellulaire est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaisons avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon) pour qu'elle puisse se produire. Les lectines monovalentes ont un seul site de reconnaissance et ne provoquent pas d'agglutination (**Peumans *et coll.*, 1995**).

Les lectines agglutinent plus facilement les cellules malignes par rapport à leurs homologues normales. Des attitudes préférentielles ont été observées également entre cellules embryonnaires et cellules adultes, entre cellules en mitose et cellules en interphase (**Wang *et coll.*, 1998**)

7.2. Propriétés médicinales

Les lectines étaient considérées comme des substances toxiques uniquement destinées à être utilisées comme outils d'analyse des glycoconjugués. Cependant des études récentes ont montré leur intérêt dans le domaine médical.

7.2.1. Propriété anticancéreuse

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort des cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (**Poiroux, 2011**). Ils inhibent également leur migration (**Banwell, 1983**).

7.2.2. Propriété antivirale

Au cours des infections virales, les lectines sont impliquées dans la fixation et l'inhibition de la réplication des virus (**Xu et al., 2014**). Elles sont aussi impliquées dans la détection des molécules pathogènes (PAMPs) associées aux virus (**Kawamura et al., 2014**). Les lectines ont la capacité de bloquer l'infection du VIH-1 par inhibition de l'enzyme : rétro-transcriptase du virus (**Tanaka et al., 2009 ; Hamid et al., 2013**).

7.2.3. Propriété antibactérienne

Les lectines sont capables de réguler la migration et l'adhésion des cellules bactériennes d'où leur activité antibactérienne (**Tanne et Neyrolles, 2010**). Exemple : l'EUL et la calnexine A qui ont une action antibactérienne contre « *Xanthomonas oryzae pv* », « *Oryzae* » et « *Psyringae* » respectivement (**Atalah et a., 2014**). Les lectines animales comme les lectines réceptrices des kinases (LecRKs) sont impliquées dans la résistance aux bactéries (**Singh et al., 2012**). Exemple : les lectines de type C qui résistent à la bactérie « *Listeria monocytogenes* » (**Mukherjee et al., 2014**).

7.2.4. Propriété antifongique

Seules quelques lectines purifiées et qui possèdent un domaine catalytique ont une activité antifongique mais elle reste indirecte. Elles appartiennent généralement à la classe I des chitinases (**Andrew et al., 2014**).

Les lectines de « *Phaseolus vulgaris cv* » ont une activité fongicide contre « *Valsa mali* » (**Lam et Ng, 2010**). La même propriété est présentée par les lectines de « *Tinospora tomentosa* » qui sont capables d'inhiber la croissance du champignon « *Aspergillus niger* » (**Repon et al., 2014**).

7.2.5. Propriété immuno-modulatrice

De nombreuses lectines ont la capacité d'exercer une activité immuno-modulatrice lors de la première interaction avec les glycanes présents à la surface des cellules immunitaires (**Abdeljalil et al., 2014**). Les lectines forment des signaux de production de cytokines (**Souza et al., 2013**) comme est le cas des lectines isolées à partir de « *Viscum album L* » qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages, et elles modulent la réponse immunitaire par amélioration des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- α) (**Lee et al., 2007**).

7.2.6. 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 (**Oppenheim J.D, 1980**), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes J.C, 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreury A.M.S, 1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni G.V, 1998**).

8. Les lectines les mieux connues

Tableau 8 : Lectines importantes (Hermoso .J, 2005)

Lectine	Exemple de commentaire
Lectines de légumes	concanavalineA, lectines de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces membranaires des cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant de graines de ricin
Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E. Coli et toxine du choléra
Hémagglutinine du virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte ainsi que la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectine animales se liant avec les B-galactoses, elles ont aussi des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

9. Domaines d'applications des lectines

Les lectines sont capables d'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.

9.1. Domaine biomédical

L'utilisation des lectines a permis de découvrir que certains états physiologiques et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules (**Raquel et Benevides, 2011**).

9.1.1. Immunologie

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées 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 35 maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immuno-therapeutiques (**Jaffe, 1980**).

9.1.2. Hématologie

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

Grace à leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification des glycoconjugués mais aussi pour leur caractérisation (**Hirabayashi, 2004**).

9.1.3. Biologie cellulaire

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

Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar, 2005**).

9.1.4. Cancérologie

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies telles que le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (Gillot *et coll.*, 2004).

Kenoth et ses collaborateurs en 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.

Tableau 9 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (Kenoth et ses collaborateurs, 2001)

Propriétés	Applications
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	<ul style="list-style-type: none">- typage du sang- identification de nouveaux groupes Sanguins
Induction de la mitose	<ul style="list-style-type: none">- étude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Agglutination cellulaire	<ul style="list-style-type: none">- recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations.- phagocytose et motilité. Diminution de la croissance des cellules Tumorales
Précipitation des polysaccharides et des glycoprotéines	<ul style="list-style-type: none">- isolement, purification et études structurales des glucides,- purification des glycoconjugués (enzymes, hormones)- modèles pour la réaction antigène anticorps (test ELISA, etc)

Liaison aux sucres	<ul style="list-style-type: none"> - études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. - structure et fonctionnement des Membranes
--------------------	--

9.2. Domaine agronomique

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

Par exemple, la lectine de blé et celle de graine de « *Bauhinia purpurea* » ont des effets létaux pour deux insectes (*Ostrinia nubilalis* et *Diabrotica undecimpunctata*) se nourrissant de maïs, l'action des lectines peut se faire à des concentrations relativement faibles (**Peumans et coll., 1995**)

III. Généralités sur le champignon de couche

Notre travail de recherche porte sur un champignon comestible qui provient majoritairement des Etats-Unis, de France ou de Chine, rare à l'état sauvage, ce champignon est cultivé sous le nom de « champignon de paris » ou « champignon de couche », il appartient à l'espèce « *Agaricus bisporus* ». (J.E.Lange Imbach, 1946)



Figure 8 : Champignon « *agaricus bisporus* » (Photo: © Fred Stevens)

1. Définition de l'agaric bispore

L'agaric bispore est une espèce de champignons basidiomycètes de la famille des agaricaceae, c'est le champignon le plus cultivé en champignonnière car il est simple et facile à cultiver, Ce champignon pousse à l'état naturel en début d'été ou en automne sur les sols gras, le fumier, les jardins, dans les haies de cyprès, les pâtures, les cours mais toujours hors des forêts.

2. Classification scientifique de l'agaric bispore

Tableau 10 : Classification scientifique de l'Agaric Bisporus (Hibbett *et al.*, 2007)

Règne : Fungi
Division : Basidiomycota
Classe : Agaricomycetes
Sous-classe : Agaricomycetidae
Ordre : Agaricales
Famille : Agaricaceae
Genre : <i>Agaricus</i>
Espèce : <i>Agaricus bisporus</i>

3. Morphologie, reproduction et développement de l'Agaricus

Les champignons se reproduisent grâce à la formation de **spores** dispersées ensuite par l'eau et le vent. Ces spores sont fabriquées au niveau de l'organe reproducteur: le **carpophore**, ce dernier représente la partie visible du champignon, il est composé d'un chapeau rond d'un blanc velouté qui se tache par la suite d'ocre ou de brun , attaché au pied qui peut être orné d'un anneau, d'un voile reliant ces deux deniers, de collerettes (ou lamelles) se situant sur la face inférieure du chapeau, roses lorsque le champignon est jeune, puis brun-noir à noires en vieillissant, et enfin d'un épiderme dont la teinte est différente suivant les variétés de champignons. (Kernaghan et Harper, 2001)

Le reste du champignon est constitué d'un mycélium, cette partie est pratiquement invisible, elle représente l'appareil végétatif du champignon, elle est composée d'un amalgame de filaments ramifiés incolores pouvant se développer dans le sol et la litière. Le mycélium est déshydraté et peut rester des mois en attente de pluie.

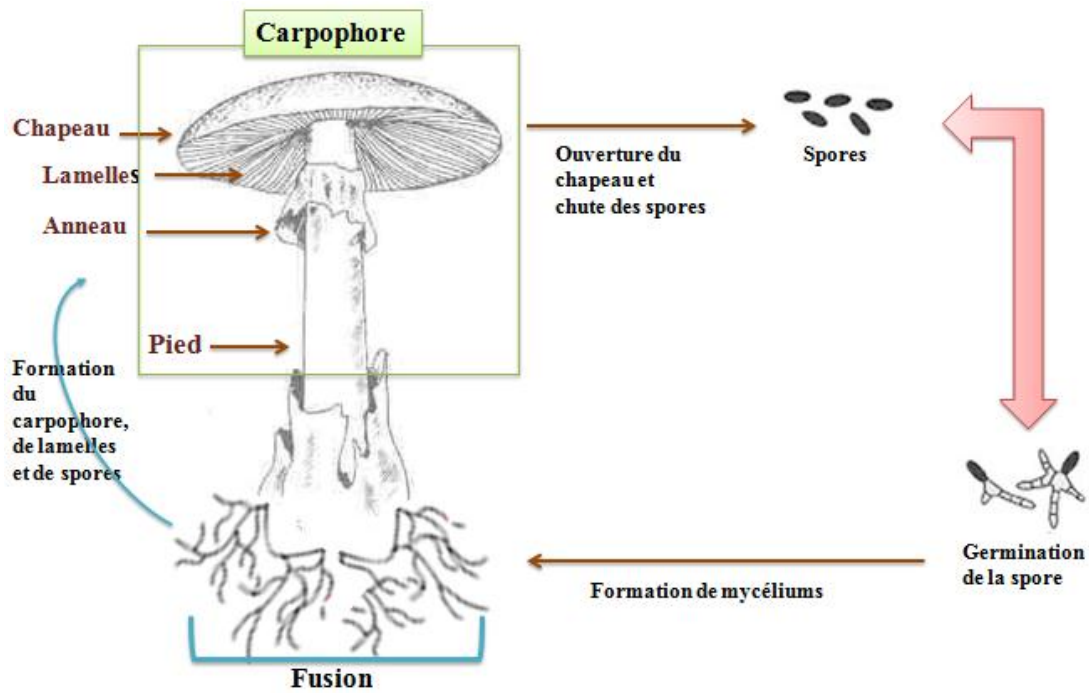


Figure 9 : Morphologie et reproduction de l'agaric

4. Culture de l'agaric bispore

La Chine possède 10 millions d'éleveurs et domine le marché de ces champignons avec 70% de la production mondiale.

L'agaric bispore est cultivé industriellement en champignonnières, dans d'anciennes carrières, dans des caves ; la température doit y être constante, l'aération des locaux est indispensable. Le substrat de culture est constitué de paille, fumier de cheval, gypse (sulfate de calcium) que l'on fait composter. Une fois le compost refroidi, ensemencé puis envahi par le mycélium du champignon, une couche de terre calcaire (terre de gobetage) est ajoutée pour provoquer la pré-fructification. La fructification est induite par l'abaissement de la température et la ventilation (baisse du taux de CO_2). (Flegg and Wood, 1985)

Le champignon de couche est cultivé depuis deux siècles en France, la culture étant introduite dans le Val de Loire en 1895. La Touraine et le Saumurois représentent aujourd'hui les trois quarts de la production française. La culture s'est d'abord pratiquée sur couches, puis en sac ou en caisses, de plus c'est une des rares espèces de champignons que l'on peut faire pousser à domicile. La pratique s'est répandue avec la popularisation de l'agriculture urbaine.



Figure 10 : culture de l'agaric bispore

L'ensemble des besoins nutritifs et reproductifs de l'agaric bispore montre que sa culture ne nécessite pas de lumière (absence de chlorophylle) et se prête bien aux carrières. Sa reproduction a lieu en automne, ce champignon aime bien l'humidité.

5. Les ennemis du champignon de couche

Le champignon de Paris a des ennemis naturels qui sont eux-mêmes des champignons, On peut les classer en deux catégories :

- Des champignons décomposeurs, qui profitent du fumier de la culture pour se développer. Ils entrent donc en compétition avec l'Agaricus pour se nourrir. Ce sont surtout des "moisissures".
- Des champignons parasites, qui se nourrissent de l'Agaricus. La maladie la plus répandue dans les champignonnières est la "molle". Elle est provoquée par un champignon parasite (le *Mycogone Perniciosa*) qui digère littéralement les tissus de l'Agaricus, le rendant tout mou et difforme.



Figure 11 : Le mycogone Perniciosa

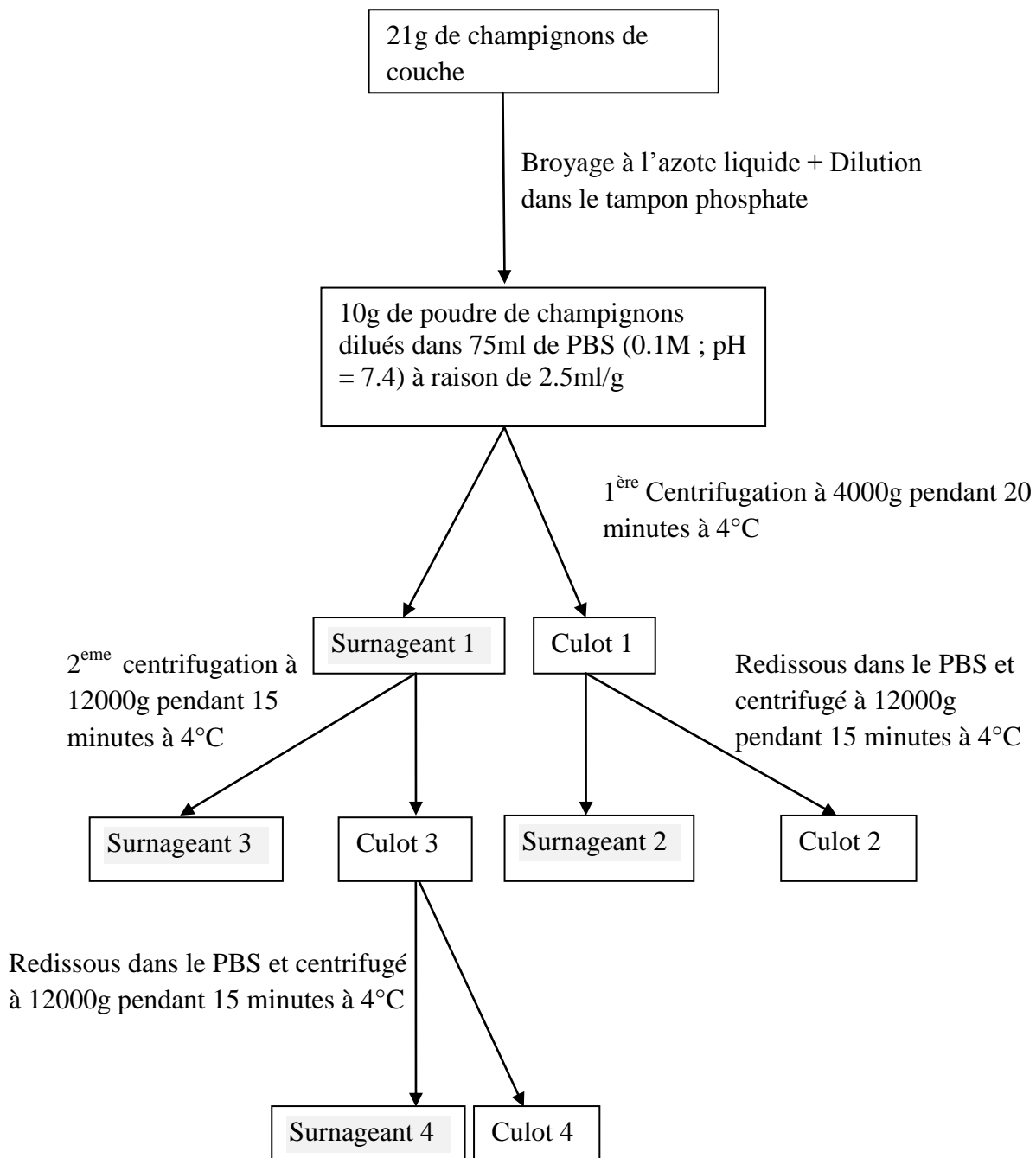


Figure 12 : Ramollissement et déformation de l'agaric bispore liés à la molle

IV. Matériel et méthodes

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

1. Extraction et fractionnement des protéines



Le travail a été réalisé sur 21 grammes de champignons « *Agaricus Bisporus* » dits « *champignons de couche* » qu'on a laissé sécher quelques jours devant une source de chaleur. Ils ont ensuite été broyés dans de l'azote liquide afin d'être réduits en poudre.

La poudre obtenue à l'issue de ce processus (10g) est diluée dans 75ml d'un tampon phosphate (PBS 0.1M pH 7.4) (**Annexe 1**) à raison de 2.5ml/g, le tout est homogénéisé grâce à un blender ultra-turax puis soumis à une centrifugation à 4000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré puis repris pour une deuxième centrifugation à 12000g pendant 15minutes à 4°C.

En simultanéité, les deux culots récupérés lors des deux opérations de centrifugation sont redissous dans du PBS et centrifugés à leur tour pendant 15 minutes à 12000g à 4°C. Seuls les surnageants issus des différentes centrifugations serviront pour la suite des opérations car ils manifestaient une Densité optique à 280 nm relativement appréciable.

Les quatre surnageants sont ensuite filtrés au travers de membranes millipores et filtres seringues conçus pour des seuils de filtration de 0,45µm de diamètre facilitant ainsi la récupération des protéines pour des applications critiques. Le filtrât est conservé à 4°C.

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé sur un spectrophotomètre visible, UV-Vis



Figure 13 : Spectrophotomètre UV-Vis

La spectrophotométrie est une méthode extrêmement courante, simple et facile à mettre en œuvre, elle permet de mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une solution à une

longueur d'onde donnée, Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

L'absorbance est fonction de la concentration du soluté :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon \cdot \lambda \cdot C$$

A = absorbance sans unité

I_0 = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté)

I = intensité lumineuse transmise

ϵ = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde)

λ = longueur du trajet optique (en cm)

C = concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction)

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

Le spectrophotomètre dispose d'un monochromateur qui génère, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente traverse alors une cuve (en Quartz pour les ultra-violets) contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

L'absorbance a été mesurée à 280nm pour les protéines et à 260nm pour les acides nucléiques qui pourraient éventuellement contaminer nos solutions. L'étude des propriétés spectrales de ces deux macromolécules a abouti au développement d'une méthode permettant de déterminer la concentration protéique d'une solution qui contient une proportion donnée en acides nucléiques (**Warburg et Christian, 1941**)

Les valeurs obtenues peuvent alors s'intégrer à l'équation suivante :

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

3. Tests d'hémagglutination

La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein, 1980; Rüdiger, 1993**). Cette technique est basée sur la capacité des lectines à former un réseau avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de surface.

Les tests sont réalisés sur des microplaques de titration et l'agglutination des globules rouges par les lectines forme une phase gélatineuse visible à l'œil nu. En absence d'activité hémagglutinante, les hématies sédimentent par gravité au fond des puits.

Le sang utilisé est celui du lapin : hématies à 3%

➤ Préparation des hématies à 3%

Un prélèvement de sang oculaire a été effectué sur un lapin de 4kg.

Le sang est prélevé directement dans un tube hépariné (5 ml), il est ensuite soumis à une première centrifugation à 4000g pendant 10 minutes à température ambiante, le surnageant issu de cette centrifugation est versé dans un évier tandis que le culot (1.5ml) est ajouté à une solution de NaCl 0.9% (**Annexe 2**) (3.5ml), le tout est mélangé délicatement puis soumis à une deuxième centrifugation toujours à 4000g pendant 10 minutes, et ainsi de suite jusqu'à arriver à 3 centrifugations (l'opération a été répétée à 3 reprises, jusqu'à obtention d'un surnageant clair).

A la fin de la troisième centrifugation, le culot est dilué dans la solution de NaCl 0.9% à raison de 1.5 ml d'hématies par 48.5ml de NaCl dans le but d'obtenir une suspension d'hématies à 3%.

➤ Réalisation du test d'hémagglutination

Dans les quatre premiers puits de la microplaque sont déposés à l'aide d'une micropipette (P100) 50µl de chaque extrait et 50µl d'hématies à 3%. Nos extraits correspondent aux quatre surnageants (S1, S2, S3 et S4) filtrés, obtenus lors de l'extraction et fractionnement des protéines. Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs composés chacun de 50µl de solution tampon (PBS) et de 50µl d'hématies à 3% (dépourvus d'échantillons).

La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

Les résultats du test d'hémagglutination et du dosage des protéines démontrent la présence de lectines dans les quatre surnageants (plus de détails dans les résultats), ils sont donc mélangés afin de poursuivre les étapes qui restent avec un seul et unique homogénat.

➤ **Test de la limite d'hémagglutination**

Ce test est effectué afin de connaître la plus basse concentration en lectines pour laquelle une hémagglutination est encore visible, cette dernière est appelée point d'équivalence et la concentration en lectines de ce puits correspond à une limite d'hémagglutination (UH).

Dans le premier puits de la microplaque sont déposés 50µl de l'homogénat, le PBS est quant à lui déposé dans tous les puits de la première ligne et pas uniquement dans le premier puits. Des cascades de doubles dilutions sont ensuite réalisées dans les puits suivants (de 1 jusqu'à 12) et enfin 50µl d'hématies de lapins sont rajoutés dans tous les puits.

Là encore, trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs, composés chacun de 50µl de solution tampon (PBS) et de 50µl d'hématies à 3%

La lecture de l'activité hémagglutinante est effectuée à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Effet de la température sur l'hémagglutination**

Afin de déterminer l'effet de la température sur l'hémagglutination, 5 extraits de l'homogénat sont incubés dans un bain marie à différents degrés de température (40°C, 60°C, 80°C, 90°C et 100°C) et ce durant une heure de temps à chaque incubation.

Une fois le temps écoulé, les extraits sont retirés du bain marie et laissés de côté afin qu'ils refroidissent à température ambiante (pendant une demi-heure). Le test d'hémagglutination est ensuite effectué de la manière suivante : dans les cinq premiers puits de la microplaque sont déposés les 5 extraits de l'homogénat ayant chacun été soumis à un degré différent de température (50 µl de chaque extrait), 50µl d'hématies à 3% y sont ensuite rajoutés.

Les puits contenant le témoin négatif de chaque extrait sont respectivement composés de 50µl de tampon phosphate ayant aussi été incubé dans le bain marie à chaque température (40°C, 60°C, 80°C, 90°C, 100°C) et de 50µl d'hématies de lapin (3 puits pour chaque témoin)

La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Effet de la température sur la limite d'hémagglutination**

Ce test est réalisé avec uniquement les échantillons qui ont résisté aux températures auxquelles ils ont été incubés, il est fait avec des cascades de doubles dilutions, les premiers puits de chaque ligne de la microplaque contiennent 50µl de chaque extrait de l'homogénat ayant été soumis à différents degrés de température avec 50µl de tampon phosphate dans tous les puits des premières lignes, les cascades de doubles dilutions sont ensuite réalisées dans les puits suivants, les témoins négatifs sont faits de la même manière précédente, les hématies de lapin sont rajoutées juste après. La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Effet du pH sur l'hémagglutination**

Avant d'effectuer le test d'hémagglutination, de petites quantités de poudre de champignons (0,1g) sont dispersées à égalité dans 12 tubes à essais contenant chacun 4ml de tampon phosphate à différentes valeurs de pH, en allant respectivement de 1 jusqu'à 12. Après 24 heures d'incubation à 4°C, les douze mélanges sont soumis à une centrifugation à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. Les tests d'hémagglutination sont ensuite réalisés avec et sans dilutions.

Afin de déterminer l'effet du pH sur l'hémagglutination, le test est réalisé comme suit :

Les douze premiers puits de la microplaque contiennent chacun 50µl de chaque mélange avec 50µl d'hématies de lapin, douze autres puits sont réservés aux témoins négatifs (tampon phosphate à pH allant de 1 jusqu'à 12 + hématies de lapins), lecture après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Effet du pH sur la limite d'hémagglutination**

Afin de déterminer l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination, le test est réalisé comme suit :

Dans chaque premier puits de chaque première ligne de la microplaque, sont déposés 50µl du mélange (poudre de champignons + PBS à un pH donné) et 50µl de tampon phosphate (0.1M pH = 7.4) dans tous les autres puits et pas uniquement au premier, une cascade de doubles dilutions est ensuite réalisée dans les puits suivants, l'opération est répétée pour tous les mélanges (ceux ayant manifesté une agglutination au test de pH précédent).

Les puits contenant les témoins négatifs sont effectués de la même manière précédente. Les hématies de lapins sont rajoutées à tous les puits et la lecture est faite après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine**

Ce test est réalisé afin de déterminer l'affinité des saccharides vis-à-vis des lectines et ce en étudiant la capacité de ces derniers à inhiber l'hémagglutination des hématies de lapin en présence de lectines. L'agglutination des érythrocytes en présence de lectines est testée en présence d'une glycoprotéine.

Le test est réalisé comme suit :

Dans chaque puits de la microplaque sont déposés 50µl de l'homogénat et 50µl de solution de saccharides ou de la glycoprotéine (0,1g/1ml de NaCl 0,9%) (**Annexe 3**) respectivement : Lactose, Fructose, Glucose, Saccharose, Ribose, Xylose, Mannitol, galactose, Arabinose, Caséine.

Le mélange est incubé pendant une heure à température ambiante, cela permet aux lectines de reconnaître les sucres, 50µl d'hématies de lapin à 3% sont ensuite rajoutés.

Chaque puits de témoin négatif contient 50µl de solution de sucre et 50µl d'hématies à 3%. La lecture de la microplaque est faite après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine**

Ce test est effectué avec les sucres qui inhibent l'agglutination, il est réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination.

Dans chaque puits de la microplaque, 50µl d'homogénat sont déposés, et c'est uniquement dans les premiers puits relatifs à chaque sucre que sont rajoutés 50µl de chaque inhibiteur, une gamme de concentrations par doubles dilutions est réalisée dans les puits suivants, le mélange est incubé pendant une heure de temps à température ambiante. Au final 50µl d'hématies à 3% sont ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination est faite à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Test des métaux lourds (oligoéléments)**

Afin de réaliser ce test, l'homogénat est mélangé au préalable avec l'EDTA, après une heure d'incubation à température ambiante, 50µl de ce composé sont déposés dans trois puits de la microplaque avec 50µl de chacun de ces trois métaux : MgCl₂, CaCl₃, MnCl₃ (**Annexe 4**) et enfin 50µl d'hématies de lapin y sont rajoutés. La lecture est faite à l'œil nu après 1h d'incubation.

4. Purification des protéines sur chromatographie échangeuse d'anions

Nous avons opté pour purifier nos lectines de les soumettre à une chromatographie échangeuse d'anions parce que ces dernières ont révélé avoir un pHi au voisinage de 8.

La chromatographie sur colonne échangeuse d'anions est la méthode utilisée afin de séparer et purifier les protéines contenues dans l'homogénat en fonction de leur différence de pHi, elle dispose d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. La phase stationnaire est solide, elle contient la cellulose diéthyl-aminoéthyle (DEAE-C) qui est une résine chargée positivement permettant la rétention à pH acide, puis la séparation spécifique des molécules chargées négativement, la DEAE-C échange ses ions contre les ions de la même charge provenant de la solution homogène, cette phase est introduite dans une colonne en verre de 30 centimètres de hauteur et 0.5 centimètres de diamètre, l'échantillon qui contient les lectines est introduit ensuite manuellement de façon délicate dans une boucle d'injection, Une solution aqueuse tamponnée appelée phase mobile (PBS 0.1M pH = 7.4), emmène l'échantillon de la boucle vers la colonne.

La phase mobile entraîne les composés à séparer tout au long de la colonne, ces derniers y adhèrent s'ils sont de charge opposée au support. La force de rétention qui régit l'association entre les molécules chargées et la matrice dépend de la force ionique et du gradient de concentration saline de la solution d'éluion. Elle peut être modulée en agissant sur ces deux composantes, ce qui conduit à la séparation.

➤ **Préparation de la colonne**

Une quantité suffisante de gel de DEAE-C est diluée dans un tampon phosphate à faible molarité (0.1M pH = 7.4) puis coulée dans une colonne (0.5cm X 30cm) placée sur un support. L'équilibrage de la colonne est réalisé avec 30ml de PBS préalablement dégazé (0.1M pH = 7.4).

L'éluion est faite selon un gradient de molarité avec deux tampons phosphate l'un à faible et l'autre à forte molarité, passant respectivement de 0.1M à 1M, le pH est maintenu à 7,4.

➤ **Séparation des protéines**

Avant la phase d'éluion, les protéines sont séparées en fonction de leur phi.

L'éluion est faite selon un gradient de concentration saline, par ordre décroissant, ce qui crée une sorte de compétition qui favorise le décrochage de toutes les protéines qui restent fixées à la colonne.

Après éluion, cinquante fractions sont recueillies au moyen d'un collecteur de fractions et un dosage est effectué afin de déterminer avec exactitude lesquelles d'entre elles révèlent une concentration appréciable en protéines.

Après avoir tracé la courbe : absorbance à 280nm en fonction du volume d'éluion, un test d'hémagglutination est réalisé avec uniquement les fractions ayant manifesté des pics d'absorbance afin de confirmer la présence de lectines et les soumettre ensuite à une électrophorèse.

5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

Afin d'analyser la pureté des fractions ayant montré une forte agglutination, déterminer les fractions contenant la protéine d'intérêt et estimer la masse moléculaire de nos protéines, une électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE (sigle anglophone de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) est réalisée,

ce concept permet d'analyser les protéines et les séparer en fonction de la masse moléculaire de la chaîne peptidique, C'est une technique dénaturante qui dissocie les complexes protéiques non-covalents.

A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique, cette propriété leur confère la possibilité de migrer sous l'influence d'un champ électrique (certaines migrent vers l'anode, d'autres vers la cathode), dans cette technique, les protéines sont d'abord incubées avec un agent réducteur, le β -mercaptoethanol qui rompt les liaisons disulfures, et aussi avec le SDS qui est un détergent fort et qui, via sa longue chaîne hydrocarbonée forme des interactions hydrophobes avec les chaînes peptidiques des protéines de telle sorte à leur procurer une charge nette négative, dès lors elles migrent toutes dans la même direction à travers le gel de polyacrylamide et ne sont séparées qu'en fonction de leurs masses moléculaires.

On utilise deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide, permettant la séparation suivant la taille, précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation), moins dense permettant au préalable de concentrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées. (**Annexe 5**)

Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 50 μ l par puits, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8).

Une fois la migration électro-phorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie.

La décoloration avec l'eau de robinet est faite le lendemain. (**Annexe 6 ; Annexe 7 ; Annexe 8**)

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa. Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électro-phorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad (Precision plus, protein unstained, Biorad).

V. Résultats et discussion

1. Dosage des protéines

L'absorbance est mesurée pour les quatre surnageants aux longueurs d'onde $\lambda = 280\text{nm}$ pour les protéines et $\lambda = 260\text{nm}$ pour les acides nucléiques qui pourraient éventuellement contaminer nos solutions, le calcul des concentrations est donc fait selon la méthode de Warburg et Christian avec l'équation ci-dessous, et sont représentés dans le tableau 11.

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

Tableau 11 : résultats du dosage des protéines

	280nm	260nm	Concentration (mg/ml)
S1	0,581 F = 1/100	0,773 F = 1/100	0,313
S2	0,529 F = 1/100	0,709 F = 1/100	0,281
S3	0,432 F = 1/100	0,681 F = 1/100	0,152
S4	0,378 F = 1/100	0,597 F = 1/100	0,132

S1 : surnageant 1

S2 : surnageant 2

S3 : surnageant 3

S4 : surnageant 4

F : facteur de dilution

Nos résultats montrent que les quatre surnageants présentent des concentrations en protéines non négligeables, plus élevées pour S1 et S2 que S3 et S4. La suite des opérations nous


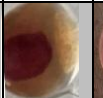
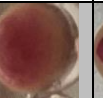
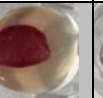




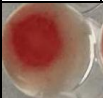
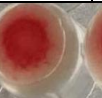


impose donc de retenir les quatre surnageants qui feront l'objet chacun d'un test d'hémagglutination.

2. Résultats des tests d'hémagglutination

➤ Résultats du test d'hémagglutination réalisé après fractionnement des protéines

Afin de tester l'activité lectinique de nos champignons, des expériences d'hémagglutination sur des érythrocytes de lapin ont été réalisées, les quatre surnageants obtenus ont été soumis au test et ont donné les résultats ci-dessous

Tableau 12 : résultats du test d'hémagglutination des quatre surnageants

	S1	S2	S3	S4						T ⁻		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
lecture	+++	+++	+++	+++						-	-	-

(+++): Très forte agglutination

(++): Forte agglutination

(+): Faible agglutination

(-): Pas d'agglutination

La lettre A marque le début de la microplaquette de titration

S1 : surnageant 1

S2 : surnageant 2

S3 : surnageant 3

S4 : surnageant 4

T⁻ : témoin négatif

Les résultats obtenus indiquent clairement la présence de substances ayant une activité hémagglutinante sur les hématies de lapin dans les quatre surnageants soumis au test, et ce avec la même intensité d'hémagglutination.

C'est uniquement pour cette raison là qu'on a pris l'initiative de mélanger les quatre surnageants afin d'enrichir notre homogénat qui servira pour la suite des opérations.

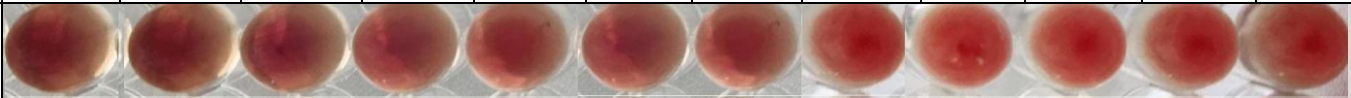


➤ **Dosage de l'homogénat**

	Absorbance (nm)		Concentration (mg/ml)
	280	260	
Homogénat	0,543	0,719	0,295

➤ **Résultats du test de la limite d'hémagglutination**

Afin d'évaluer l'activité hémagglutinante de l'homogénat, un test de la limite d'hémagglutination est réalisé. Dans cette approche, pour une concentration de départ définie, l'unité d'hémagglutination (UH) est définie comme étant le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Tableau 13 : Résultats du test de la limite 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	
Homogénat	A													
T	B													
Lecture		+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	

(+++): Très forte agglutination

(++): Forte agglutination

(+): Faible agglutination

(-): Absence d'agglutination

Homogénat = S1+ S2+ S3+ S4

T⁻ : témoin négatif

Ces résultats mettent en évidence une très forte agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines de l'homogénat au niveau du premier (dilution 1/2) et du deuxième puits (dilution 1/4) avec des concentrations de : 147,5µg/ml et 73,75µg/ml, elle diminue ensuite un peu au niveau du troisième (dilution 1/8), du quatrième (dilution 1/16), du cinquième (dilution 1/32) et du sixième puits (dilution 1/64) avec respectivement les concentrations : 36,87µg/ml ; 18,43µg/ml ; 9,218µg/ml et 4,609µg/ml. L'agglutination diminue mais persiste jusqu'au septième puits (dilution 1/128) avec une concentration égale à : 2,304µg/ml. Cependant, l'activité hémagglutinante des lectines de l'homogénat disparaît au niveau du huitième puits (dilution 1/256) avec une unité hémagglutinante (UH) de : 1,152µg/ml.

Les résultats montrent que ces glycoprotéines possèdent des propriétés d'hémagglutination assez intéressantes puisqu'elles peuvent causer une hémagglutination des érythrocytes de lapin jusqu'à 2,304µg/ml.

Ces résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines contenues dans le champignon « *Térfezia Boudiéri* » appelé truffe blanche (champignon du Sahara algérien), ces dernières ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes jusqu'à 3,5µg/ml (**Zitouni et al., 2014**)

Tableau 14: Dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm et 260nm

Dilution	[Homogénat] (mg/ml)	Dilution	[Homogénat] (mg/ml)
2	0,1475	128	0,002304687
4	0,07375	256	0,001152343
8	0,036875	512	0,000576171
16	0,0184375	1024	0,000288085
32	0,00921875	2048	0,000144042
64	0,004609375	4096	0,000072021

➤ **Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination**

L'homogénat est incubé à 5 degrés différents de température (40°C ; 60°C ; 80°C ; 90°C ; 100°C), un test d'hémagglutination est ensuite effectué afin de voir jusqu'à quel degrés de température les lectines présentes dans l'homogénat peuvent-elles résister.

Tableau 15 : Résultats du test de l'effet de température sur l'hémagglutination

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

H : Homogénat

T° : Température

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

Ces résultats indiquent que notre homogénat contient des lectines qui peuvent résister à des degrés élevés de température pouvant aller jusqu'à 80°C. On remarque une forte agglutination à 40°C et à 60°C et une diminution de cette dernière à 80°C.

A 90°C et à 100°C, il y'a une absence totale d'activité hémagglutinante, ce qui veut forcément dire que les lectines présentes dans l'homogénat ont été dénaturées lors de ces incubations, ceci n'inclut pas le fait que les lectines sont des molécules thermorésistantes.

➤ **Résultat du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination**

Voici ce qu'a donné le test de la limite d'hémagglutination réalisé avec l'homogénat récemment incubé à 40°C ; 60°C ; 80°C (les températures auxquelles les lectines ont résisté).

Tableau 16 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination

T°		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												
Lecture		++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60°C	H												
	T												
Lecture		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80°C	H												
	T												
Lecture		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

H : Homogénat

T : Témoin négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : absence d'agglutination

A 40°C, il y'a une assez forte agglutination dans les deux premiers puits qui diminue ensuite dans le troisième puits et qui disparaît aussitôt au niveau du quatrième puits (dilution 1/16) correspondant à la concentration : 18,437µg/ml

A 60°C, il y a une faible agglutination au niveau des trois premiers puits, elle disparaît au niveau du 4^{ème} puits (dilution 1/16) avec une concentration de : 18,437µg/ml.

A 80°C, le premiers puits manifeste une faible agglutination qui disparaît aussitôt dans le deuxième puits (dilution 1/4) correspondant à la concentration : 73,75µg/ml.

Les résultats obtenus montrent que les lectines ont perdu leur activité hémagglutinante à des seuils élevés de concentrations, on en déduit que même si les lectines ont résisté à des degrés élevés de température, elles n'ont pas pour autant gardé l'intégralité de leur pouvoir hémagglutinant, il se peut que les lectines ont été dénaturées, mais pas totalement, il y aurait probablement eu un réarrangement moléculaire en vue de garder l'intégrité du site de reconnaissance spécifique des sucres.

Les lectines présentes dans les champignons de couche sont moins thermorésistantes que les lectines du champignon « *Ganoderma capense* », ces dernières ont une thermo-stabilité (thermo-résistance) spectaculaire, leur activité hémagglutinante n'est pas affectée même après exposition à 100°C pendant 60 minutes. (Patrick H.K Ngai, 2004)

➤ **Résultats du test de l'effet du pH sur l'hémagglutination**

Concentration des protéines de chaque extrait : 0,025g/ml

Les résultats sont représentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : résultats du test de l'effet du pH sur l'hémagglutination

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrait												
T												
Lecture	-	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+

A : Extrait = poudre de champignon diluée dans des tampons à différents pH (de 1 à 12) + hématies à 3%

T : Témoin négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

Les résultats indiquent une absence totale d'activité hémagglutinante dans les puits correspondant aux pH acides 1 ; 2 et 3, cependant l'activité reprend à partir du quatrième puits à pH = 4 donnant une forte agglutination, elle reste stable de pH = 4 jusqu'à pH = 9 et elle diminue ensuite au niveau du dixième, du onzième et du douzième puits [pH = 10 ; pH = 11 ; pH = 12].

Ces résultats révèlent que les lectines présentes dans les champignons de couche perdent leur activité hémagglutinante à pH très acide et que cette dernière diminue à pH très basique, mais qu'elle est forte dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 9, on en conclue que la structure des lectines peut être affectée par les changements de pH.

➤ **Résultats du test de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination**

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 18 : Résultats du test de l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination

pH		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
4	E												
	T ⁻												
Lecture		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	E												
	T ⁻												
Lecture		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	E												
	T ⁻												
lecture		+++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

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

E : Extrait + hématies à 3%

T⁻ : témoin négatif

(+++): Très forte agglutination

(++): Forte agglutination

(+): Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

D'après les résultats obtenus :

A pH = 4, l'agglutination est faible dans les trois premiers puits, elle atteint sa limite dans le quatrième puits (dilution 1/16) avec une concentration en lectines égale à : 1,562mg/ml, cette dernière ne change presque pas à pH = 5 où elle atteint sa limite dans le sixième puits (dilution 1/64) avec une concentration en lectines égale à : 0,39mg/ml

A pH = [6 ; 7 ; 8] l'activité hémagglutinante des lectines est exponentielle, elle atteint ses limites avec respectivement les unités d'hémagglutination suivantes : 0,097mg/ml ; 0,048mg/ml ; 0,0122mg/ml, cette dernière est à son apogée à pH = 8 et commence ensuite à diminuer progressivement de pH = 9 jusqu'à pH = 12.

Ces résultats suggèrent fortement que notre lectine a un pHi basique se rapprochant de 8.





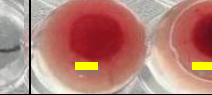
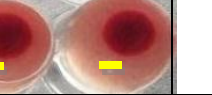
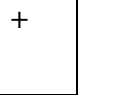
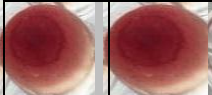





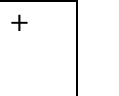

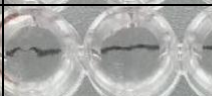
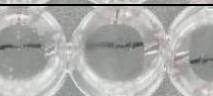


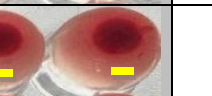
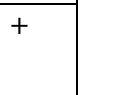
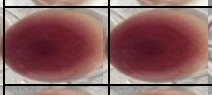
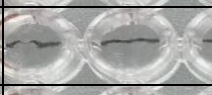
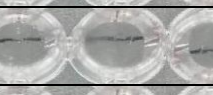


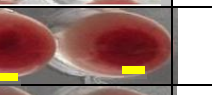
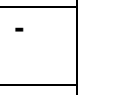

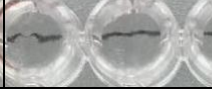


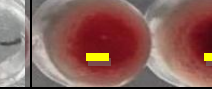

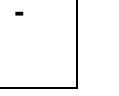
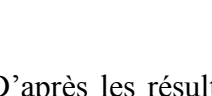

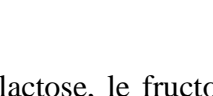
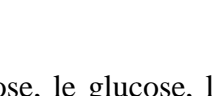
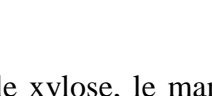
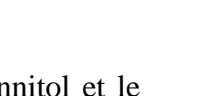

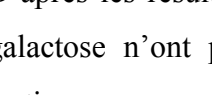
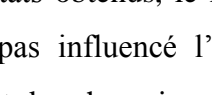
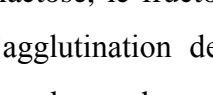
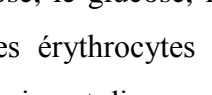
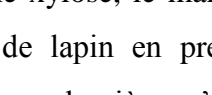
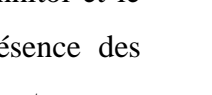

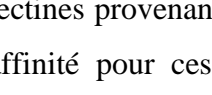
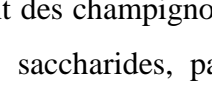
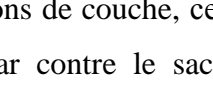
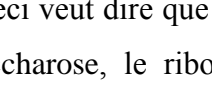
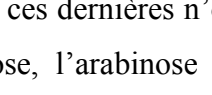
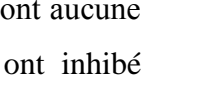

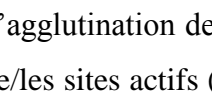
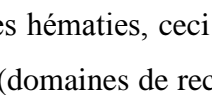
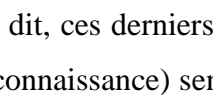
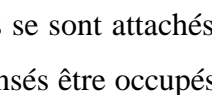
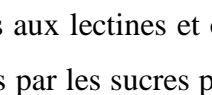
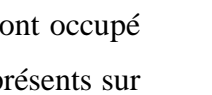

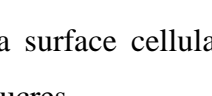
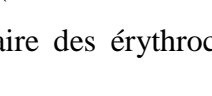
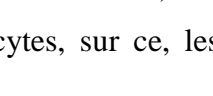
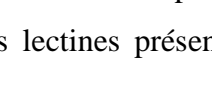
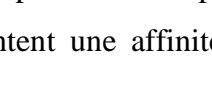
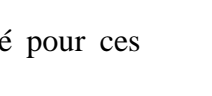

Les résultats obtenus sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines du champignon « *Ganoderma capense* », l'activité hémagglutinante de ces lectines est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11. (Patrick H.K Ngai, 2004)

➤ **Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine**

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 19.

Tableau 19: Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et une glycoprotéine

	H									T ⁻			lecture
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Lactose													+
Fructose													+
Glucose													+
Saccharose													-
Ribose													-

Xylose															+
Mannitol															+
Galactose															+
Arabinose															-
Caséine															-

D'après les résultats obtenus, le lactose, le fructose, le glucose, le xylose, le mannitol et le galactose n'ont pas influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines provenant des champignons de couche, ceci veut dire que ces dernières n'ont aucune affinité pour ces saccharides, par contre le saccharose, le ribose, l'arabinose ont inhibé l'agglutination des hématies, ceci dit, ces derniers se sont attachés aux lectines et ont occupé le/les sites actifs (domaines de reconnaissance) sensés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, sur ce, les lectines présentent une affinité pour ces sucres.

La caséine quant à elle a également inhibé l'hémagglutination des hématies en fixant elle-même le sucre présent au niveau de ces dernières et a empêché l'action hémagglutinante de nos lectines car elle présente probablement une meilleure affinité pour les sucres présents à la surface cellulaire des érythrocytes.

➤ **Résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine**

Afin de déterminer la concentration minimale à laquelle l'inhibition de l'agglutination n'est plus observée et de déduire par cela avec quel sucre nos lectines présentent une plus grande affinité, un test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides (saccharose, Ribose et Arabinose) et la caséine (glycoprotéine) est réalisé, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/3 2	1/6 4	1/128	1/256	1/5 12	1/10 24	1/2048	1/4096
saccharose	H												
	T												
Lecture		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	H												
	T												
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Arabinose	H												
	T												
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
Caséine	H												
	T												
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

H : Homogénat

T : Témoin négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

Dans le cas du saccharose, on remarque une agglutination dès le deuxième puits là où la concentration du sucre est égale à 25mg/ml, ce dernier n'a donc pas une si grande affinité avec les lectines du champignon de couche.

Concernant le ribose, l'agglutination a lieu dans le onzième puits (dilution 1/2048), [ribose] = 0,048mg/ml, ceci **indique que nos lectines ont une très forte affinité avec le ribose.**

L'arabinose quant à lui présente une affinité moindre vis-à-vis des lectines par rapport au ribose, l'agglutination apparaît au niveau du neuvième puits (dilution 1/512) avec une concentration égale à : 0,19mg/ml et s'accroît dans les trois puits restants.

Sur ce, parmi les neuf saccharides utilisés, les lectines présentent une affinité pour seulement trois d'entre eux, ceci dit, le degré d'affinité pour chacun d'entre eux est différent, **nos lectines sont donc spécifiques pour le ribose** car c'est celui avec lequel elles présentent une plus forte affinité.

La caséine a inhibé l'agglutination jusqu'au septième puits (dilution 1/128) avec une concentration de : 0,781mg/ml, ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que la caséine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines contenues dans notre homogénat.

Ceci n'est pas le cas des deux lectines DiscI et DiscII, extraites à partir de l'espèce « *Dictyostelium discoideum* » dont Les tests d'inhibition d'hémagglutination ont été fait en présence d'un ligand mono-saccharidique. DiscI a une affinité plus forte pour le GalNAc que pour le galactose. La DiscII présente presque la même affinité pour les deux sucres testés. **(Karoline S.A, 2008)**

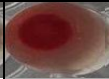























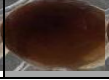











Entre autres, la lectine TrFBL1 extraite de la truffe blanche du Sahara algérien « Téfèzia Boudiéri » semble avoir une spécificité envers essentiellement le Fucose qui s'est lié sur son site actif ou encore appelé « domaine de reconnaissance des glucides », et qui l'a empêché de provoquer une hémagglutination des érythrocytes jusqu'à une concentration équivalente à 0,39 mMolaire. **(Zitouni et al., 2014)**

Nos lectines mises en présence de caséine affichent des résultats similaires à ceux obtenus à partir de lectines extraites de l'espèce « *Morus nigra* », ces dernières ont une moindre affinité avec les sucres des surfaces cellulaires des érythrocytes par rapport aux deux glycoprotéines qui sont la caséine et la fetuine. **(Necib et al., 2015)**

➤ Résultats du test des métaux lourds

Les résultats obtenus après incubation de l'homogénat avec trois métaux lourds différents sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Résultats du test des métaux lourds

	H + EDTA									T ⁻			Lecture
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CaCl ₂													-
MgCl ₂													-
MnCl ₂													-

H : Homogénat

T⁻ : témoin négatif

(-) : absence d'agglutination

Ces résultats montrent une absence totale d'activité hémagglutinante des lectines en présence d'hématies de lapin et ce avec les trois métaux utilisés, ceci nous informe que les lectines des champignons de couche sont de nature métallo-protéinique c'est-à-dire qu'elles possèdent un ou plusieurs sites de fixation d'ions métalliques. L'inhibition est donc due à la fixation des métaux aux lectines.

Ceci n'est pas en accord avec les résultats obtenus avec les lectines extraites de l'algue rouge « *Pterocladia capillacea* », il a été révélé que ces lectines ne sont pas des métalloprotéines et ne possèdent donc aucun site de fixation pour les métaux lourds. (Necib *et al.*, 2014).

3. Résultats de la purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose nous a permis de purifier notre échantillon (homogénat) et d'en extraire cinquante fractions.

On a ensuite procédé au dosage des fractions à 280nm, les résultats obtenus 22.

Tableau 22 : Résultats du dosage des cinquante fractions obtenues après purification des protéines (Annexe 9)

F	Volume	Absorbance	F	Volume	Absorbance	F	Volume	Absorbance	F	Volume	Absorbance
1	2	0,372	16	32	0,34	31	62	0,293	46	92	0,277
2	4	1,014	17	34	0,345	32	64	0,295	47	94	0,289
3	6	1,901	18	36	0,318	33	66	0,294	48	96	0,273
4	8	1,696	19	38	0,327	34	68	0,299	49	98	0,275
5	10	1,676	20	40	0,301	35	70	0,276	50	100	0,248
6	12	1,11	21	42	0,287	36	72	0,204			
7	14	0,84	22	44	0,281	37	74	0,267			
8	16	0,843	23	46	0,333	38	76	0,275			
9	18	0,67	24	48	0,294	39	78	0,269			
10	20	0,491	25	50	0,268	40	80	0,256			
11	22	0,506	26	52	0,286	41	82	0,265			
12	24	0,419	27	54	0,269	42	84	0,267			
13	26	0,563	28	56	0,266	43	86	0,264			
14	28	0,387	29	58	0,274	44	88	0,274			
15	30	0,362	30	60	0,257	45	90	0,288			

F : fraction

Afin de pouvoir interpréter les résultats du dosage, on a tracé la courbe représentant le profil d'élution: absorbance à 280nm en fonction du volume d'élution.

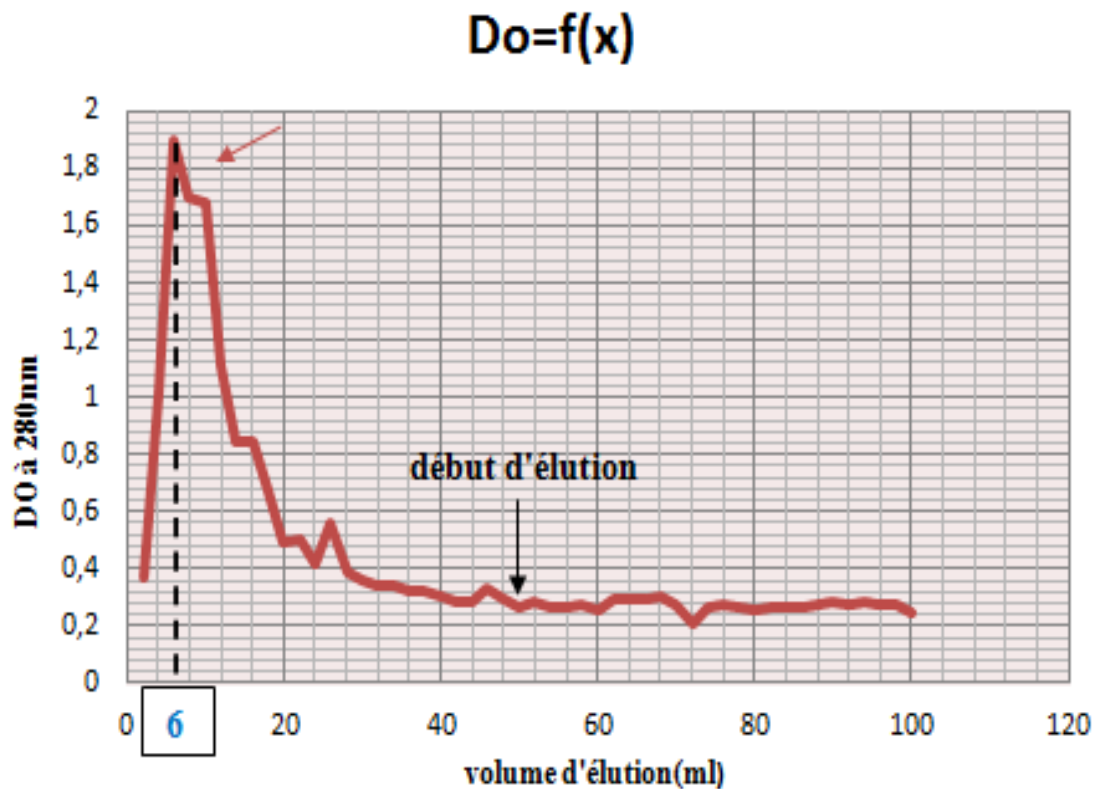


Figure 14 : Courbe représentant le profil d'élution de l'absorbance en fonction du volume d'élution des différentes fractions protéiques

Le pic majeur désigné par la flèche rouge correspond en principe à une lectine, celle-ci est repérée dans la fraction 3 située entre les volumes d'élution de 4ml et 8ml.

Les résultats obtenus sont ceux que nous avons espérés. En effet la lectine étant sensée apparaitre avant la phase d'élution, cette dernière est apparue en début d'équilibrage c'est-à-dire qu'elle a été exclue du gel avant que l'on ait introduit le deuxième tampon à forte concentration saline, ceci est justifié, étant donné que notre lectine a un pHi basique (conclusion tirée dans le test de pH récemment réalisé) et que notre résine est chargée positivement, cette dernière se décroche en premier.

Ces résultats ressemblent à ceux obtenus avec des lectines extraites du champignon comestibles « *Stropharia rugosoannulata* » (Weiwei Zhang *et coll.*, 2014), et de celles extraites à partir de « *Pleurotus citrinopileatus* » (YR Li *et coll.*, 2008), ces dernières ne se sont pas fixées à la résine de DEAE-Cellulose et se sont décrochées en premier, elles avaient par contre une affinité avec la CM-Cellulose et la Q-Sepharose.

Afin de confirmer cela, nous avons testé systématiquement l'activité hémagglutinante de toutes les fractions collectées à partir de cette chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose.

Tableau 23 : Résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les cinquante fractions obtenues après purification des protéines























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

Les résultats de ce test confirment ceux obtenus après dosage des cinquante fractions, effectivement le pic d'absorbance obtenu au volume d'éluion de 6ml (fraction 3) correspond bien à une lectine.

On remarque une hémagglutination dans la fraction 4 dont le volume d'éluion correspond à 8ml, on en déduit que cette dernière contient aussi une lectine.

Par mesure de précaution, un autre test d'hémagglutination est réalisé avec la fraction 3 et la fraction 4, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 24.

Tableau 24 : résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions 3 et 4 obtenues après purification des protéines

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Lecture
Fraction 3													+
Fraction 4													+

En effet les fractions 3 et 4 contiennent bien nos lectines, elles feront donc l'objet d'un test de pureté lors de l'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.

4. Résultats SDS-PAGE

Les échantillons soumis à l'électrophorèse sont : les quatre surnageants obtenus lors de l'extraction et fractionnement des protéines (S1 ; S2 ; S3 ; S4) et les deux fractions : 3 et 4 obtenus après purification sur colonne de DEAE-Cellulose, leurs concentrations sont reprises dans le tableau 25.

Tableau 25 : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse

	Concentration (mg/ml)
Surnageant 1	0,313
Surnageant 2	0,281
Surnageant 3	0,152
Surnageant 4	0,132
Fraction 3	1,418
Fraction 4	1,259

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a donné le profil électro-phorétique suivant : **(Figure 16)**

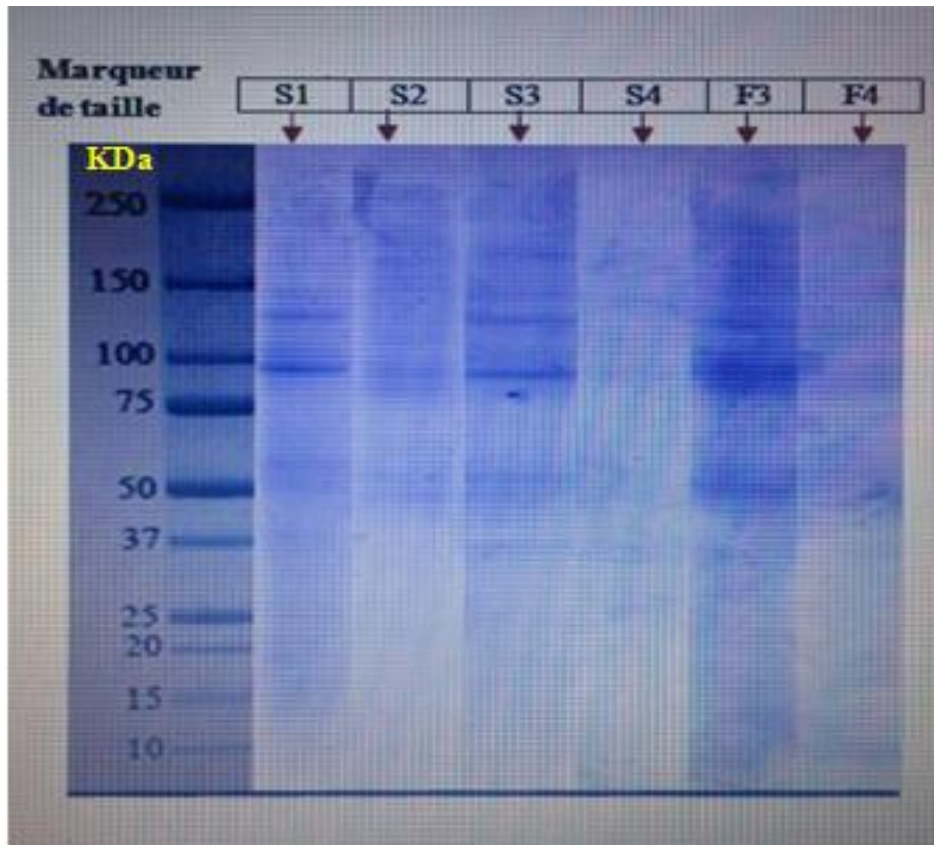


Figure 15 : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes

La lecture de cet électrophorogramme a pour but de relever la mobilité des bandes qui sont apparues en estimant les distances parcourues par chacune d'elles dans le gel de séparation, ceci permet d'évaluer la pureté et la masse moléculaire de chaque protéine en comparant avec la migration électrophorétique et la masse moléculaire d'un standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire connu (Precision Plus, protéine non colorée, Biorad)

Les échantillons S1 ; S3 et F3 et dans une moindre mesure S2 présentent chacun trois (3) sous-unités se situant respectivement dans des zones dont le poids moléculaire est proche de 140 KDa, 100 KDa et 50 KDa.

D'autres auteurs rapportent que les poids moléculaires des lectines fongiques sont d'une grande variabilité, ils se situent généralement entre 15KDa et 90KDa mais la majorité se situe entre 23KDa et 36KDa avec une à six sous-unités (Feroz khan, 2001). Quatre sous-unités furent trouvées chez la lectine de « *Pleurocybella porrigens* » (Suzuki *et al.*, 2009) et la lectine extraite de « *Agaricus Blazei* » (Kawagishi *et al.*, 1988).

V. Conclusions générales

Les lectines occupent désormais une place prépondérante dans le monde de la biologie, notamment l'immunologie, la biologie cellulaire et moléculaire, ces glycoprotéines ont des propriétés diverses qui doivent être pleinement exploitées.

Dans le cadre des travaux de recherche effectués, nous nous sommes intéressés à la caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon de couche « *Agaricus Bisporus* ».

En réalisant différents tests d'hémagglutination, nous avons déduit que les lectines des champignons de couche avaient la capacité d'agglutiner les érythrocytes, c'est à partir de là que nous avons poussé nos recherches en effectuant plusieurs autres tests biologiques.

Nos recherches ont montré que ces lectines pouvaient résister à des seuils élevés de température, leur thermo-stabilité s'étend jusqu'à 80°C.

L'effet du pH sur l'hémagglutination des érythrocytes de lapin en présence de lectines extraites des champignons de couche et les résultats obtenus après purification de ces protéines par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose ont prouvé que ces dernières avaient un pHi basique (au voisinage de 8).

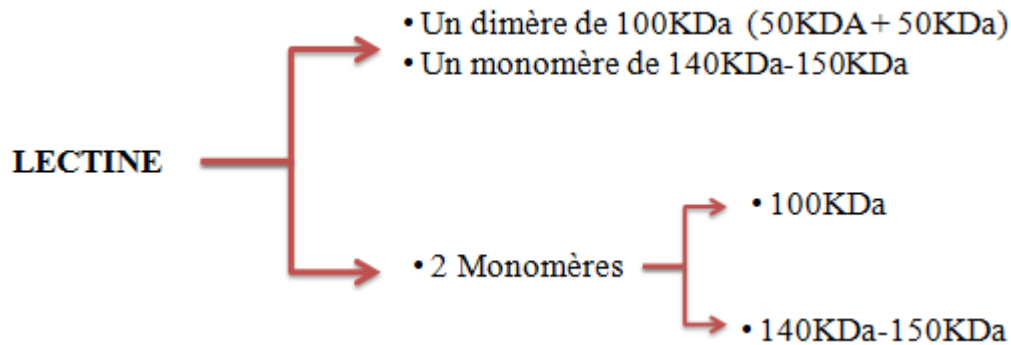
De plus, nous avons démontré que ces lectines avaient une affinité avec des saccharides dont le saccharose, le ribose et l'arabinose, ces derniers peuvent adhérer au site de reconnaissance des lectines, sur ce, elles semblent avoir une spécificité envers essentiellement le ribose.

La caséine qui est une glycoprotéine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines des champignons de couche.

Les lectines extraites des champignons de couche sont des métalloprotéines, elles possèdent des sites de fixation pour certains métaux lourds tel que le CaCl_2 ; le MgCl_2 et le MnCl_2 .

L'étape à laquelle nous avons procédé afin de purifier nos protéines est une chromatographie échangeuse d'anions faite sur colonne de DEAE-Cellulose qui est une résine chargée positivement, le résultat obtenu était celui escompté, la protéine est sortie en début d'équilibrage en raison de son pHi basique (au voisinage de 8).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a permis d'estimer la pureté de notre lectine, elle se compose soit d'un dimère de 100KDa (conditions dénaturantes) et d'un monomère de 140KDa-150KDa ou de deux (2) monomères, un de 100KDa (conditions non dénaturantes) et l'autre de 140KDa-150KDa.



➤ Perspectives

Les travaux que nous avons effectués sont une initiation à de nombreuses autres perspectives, la poursuite des recherches sur ces lectines impliquerait au préalable l'utilisation de plusieurs autres techniques d'analyse biochimique et méthodes permettant de fournir une très bonne caractérisation et purification de ces protéines. Il serait possible d'utiliser le Ribose comme ligand dans la matrice d'affinité pour la purification de nos lectines. D'autre part, une électrophorèse en conditions non dénaturantes pourrait être réalisée afin de confirmer les résultats obtenus en conditions dénaturantes. Ce travail mériterait également d'être étoffé par une étude cristallographique en vue de déterminer les structures en 3D des lectines et ainsi les comparer avec d'autres structures connues.

Les résultats de ces recherches pourraient également être suivis par des études sur l'activité antivirale, anticancéreuse et immuno-modulatrice de nos protéines.

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. 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.

Références bibliographiques

- ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A.** The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461.
- Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014)** .Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from Phaseolus vulgaris cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*.172, 672–686.
- Assreuy AMS. (1997)**. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation* .6, 201-210.
- Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005)**. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*.(57) , 919-922.
- ATALAH. B. A., DE VLEESSCHAUWER. D., XU. J., FOUQUAERT. E., HÖFTE. M., VAN DAMME. E. J.** Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins towards important abiotic and biotic stresses. *J. Plant Physiol*, **2014**. 171: 986–992.
- Bevilacqua, M.,** Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L. et al., (1991) Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67, 233.
- Boyd, W.C. and Shapleigh, E (1954)**. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) *Science*, 119,419.
- BABOSA. T.** In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2001**. 95 (5): 673-678.
- Banwell JG.** (1983). Phytohaemagglutinins derived from red kidney bean: a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial over growth in the rat. *Gastroenrology*. 84, 506-515.

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

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.

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

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.

FLEGG PB, WOOD DA, 1985. *Growth and fruiting*. In: Flegg PB, Spencer DM, Wood DA, eds. *The biology of the cultivated mushroom*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p141–177.

Gianluca Cioci ; Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. *Biomolécules*. Université Joseph-Fourier -Grenoble I, 2006. French. <tel-00081084>

Goldstein,IJ,Hughes.R.C.,Monsigny,M.,Osawa,T.and Sharon,N. What should be called a lectin? *Nature* 285 (1980) 66

GRANT. G. Lectins. In *Toxic substances in crop plants*.ed.by the Royal Society of Chemistry, 1991. p: 339.

Guillot, J., Kanska G., 1997 : Lectins in higher fungi. *Biochem. System. Ecol.*, 25, 203- 230.

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.

G. Kernaghan, K. A. Harper Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone, April 2001

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

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.

Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M , Ozawa T & Sharon N.(1980). What should be called a lectin? *Nature.*285, 60.

Herrmann Stillmark(1888) Ueber ricin,ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus

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

HAMID. R., MASOOD. A., WANI. I. H., RAFIQ. S. lectins : proteins with diverse Application. *J. Appl. Pharm Sci,* **2013.** 31:93-103.

HIBBETT DS, BINDER M, THORN RG, TIBELL L, UNTEREINER WA, WALKER C, WANG Z, WEIR A, WEISS ML, WHITE MM, WINKA K, YAO YJ, ZHANG N, 2007. A higher- level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509- 547.

Himansha Singh, Sai Pantha Sarathi,Inside of lectins-A review .International journal of scientific&Engineering Research,Volume3,Issue 4,April-2012.ISSN 2229-5518.

Hirabayashi,J (2004) Lectin-based structural glycomics:glycoproteomics and glycan

IMBERTY. A., MITCHELL. E. P., WIMMEROVÁ. M. Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol,* **2005.** 15: 525-534.

JEYAPRAKASH. A. A., KATIYAR. S., SWAMINATHAN. C. P., SEKAR. K., SUROLIA. A. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol,* **2003,** 332: 217-228.

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

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

Karoline S.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. These Pour l’obtention du Diplôme de docteur de l’université Joseph Fourier. Université Grenoble 1- Joseph Fourier.

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

KAWAMURA. T., OGAWA. Y., AOKI. R., SHIMADA. S. Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Dermatol. Sci*, **2014**. 75 : 159–166.

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

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

Lis, H. and Sharon, N. (1998) Lectins carbohydrate-specific proteins that mediate cellular Recognition.*Chem.Rev.*, 98,637-674.

Lenka s., Imberty A., Jaroslav,k., 2006: Modelisation moleculaire des lectines et des glycosyltransferases. Thèse pour l’obtention du diplôme de docteur de l’université joseph fourier. universite grenoble i – joseph fourier.

Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. and Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383, 9-36.

LEE. Y.C., LEE. R. T. Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res*, **1995**. 28: 321-327.

LEE. J. Y., KIM. J. Y., LEE. Y. G., BYEON. S. E., KIM. B. H., RHEE. M. H., CHO. J. Y. In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **2007**. 30(11): 2043-2051.

LAM. S. K., NG. T. B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, **2010**. 17: 457–462.

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

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

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 insects. *J.Agric. food. Chem.* 50 (22),6605-6611 .

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

Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K. (2014). Immunomodulatory activity of lectin extracted from THE RED MARINE ALGA PTEROCLADIELLA CAPILLACEA .Volume 4. Issue 1, 1693-1706.

Necib Y, Bahi A, Derri N, Merouane F, Bouadi H, Boulahrouf K.(2015). Immunomodulatory Activity Of Lectin Extracted From Bark Of The Black Mulberry (*Morus Nigra*). *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(1) , 1707-1719.

Nachbar MS, Oppenheim JD. (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

Peumans W. J. and Damme E. J. M. V. (1995) Lectins as plant defense proteins. *PlantPhysiol*. **109**, 347-352.

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

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

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.

Patrick H.K Ngai *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 314, Issue 4, 20 February 2004, Pages 988–993.

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

Rudiger, H., and Gabius., H.J. (2001) Plant lectins.Occurence,biochemetry,funtions and applications.*Glycoconj .J*,18,589-613

RENKONEN K. O. Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, **1948**. 26: 66.

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

REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOVON. S. H . Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa*. *The Journal of Phytopharmacology*, **2014**. 3(1): 44-51.

RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G. Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel*. *Biologie Structurale et Nanobiologie*. France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, **2011**. p: 11.

SHARON. N., LIS. H. Legume lectins-A large family of homologous proteins. *FASEB J*, **1990**. 4: 3198–3208.

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. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**. 14: 53-62.

Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M. and Surolia, A. (2007) Subunit assembly of plant lectins. *Curr Opin Struct Biol*, 17, 498-505.

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

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.

SZE S C W, Ho J C K, Liu W K. (2004). *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *J. Cell. Biochem.*y. 92, 1193-1202.

SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUEBARREIRA. M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, **2013**. 30:641-657.

Suzuki, T., Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi and H. Dohra et al, 2009. Purification characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens* biosci.

Topfer-Petersen, E., Romero, E., Varela, P.F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L. and Calvete, J.J. (1998) Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30, 217-224.

TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A.,

ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**. 106: 15633-15638.

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

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 diversebiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*.17(6), 575-692.

- Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (1987).** The structure and function of the hemagglutinin.
- Wu AM, Sugii S, Herp A. (1988).** A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, 819-847.
- WIMER. B. M.** Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm*, **1996**. 11: 57-75.
- Wang H, Ng TG. (1998).** Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*. 253, 143-146.
- Weiwei Zhang, Guotin tian, Xueran Geng, Yongchang Zhao, Tzi Bun Ng, Liyan Zhao et Hexiang Wang.** Isolation et caractérisation d'une nouvelle lectine à partir du champignon comestible *Stropharia rugosoannulata* 2014.
- Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao YR, Bi WJ, Zhao XF, Wang JX. (2014).** L-type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 397–405.
- YOUNG. N. M., OOMEN. R. P.** Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 924–934.
- Yr Li, QH Liu, HX Wang and TB Ng.** Une nouvelle lectine avec de puissantes activités inhibitrices de la transcriptase inverse anti tumorale, mitogène et du VIH-1 à partir de champignon comestible *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochemical and biophysical Acta (BBA)*, 2008 ; V.1780(1) : 51-57.
- Zitouni. A ;** Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de *Terfezia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara) 2014.

Annexes

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

Pour 1000ml de PBS

Réactif	Concentration	Quantité
Phosphate di-sodique (Na_2HPO_4)	10 mM	1,44g
Phosphate de mon potassium (KH_2PO_4)	2 mM	0,24g
Chlorure de Sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de Potassium (KCl)	2,7 mM	0,2g
Eau distillée		1L

Annexe 2 : Préparation de NaCl à 0.9%

Chlorure de Sodium (NaCl)	Eau distillée
0,9g	100ml

Annexe 3 : Préparation des monosaccharides

Sucre	NaCl
0.1g	1ml

Annexe 4 : Préparation des métaux

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

Annexe 5 : Solutions préparées pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

➤ **Solutions mère d'acrylamide à 40%**

Acrylamide	Eau distillée
40g	100ml

➤ **Solution mère de Bisacrylamide à 2%**

Bisacrylamide	Eau distillée
2g	100ml

➤ **Solution stock de SDS à 10%**

Sodium dodécylsulfate (SDS)	Eau distillée
10g	100ml

➤ **Solution d'Ammonium persulfate APS à 1%**

APS	Eau distillée
0,1g	10ml

➤ **Tampon Tris HCl pH = 8,8**

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

➤ **Tampon Tris HCl pH = 6,8**

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

➤ **Tampon d'électrophorèse**

Réactif	Quantité
Glycine	70,55g
Tris	15g

SDS	5g
Eau distillée	5000ml

Annexe 6 : Préparation du gel de séparation (T : 12,52% ; C : 0,97%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2,4
Eau ditillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	1
TEMED	0,02

Annexe 7 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1

Bisacrylamide 2%	0,3
Eau ditillée	10,2
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14
APS 1%	0,7
TEMED	0,014

Annexe 8 : Préparation d'une solution de Coloration pour le gel d'électrophorèse

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

➤ Solution mère de Bleu de coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	Ethanol 95°
5g	500ml

L'éthanol est soumis à une agitation, le bleu de coomassie est ensuite ajouté, afin qu'il ne prenne pas de masse, le laisser sous agitation au minimum deux heures, la solution est ensuite filtrée.

Annexe 9 : Absorbances et concentrations des cinquante fractions obtenues après purification des lectines sur colonne de DEAE-Cellulose

Fraction	Absorbance à 260nm	Absorbance à 280nm	Concentration (mg/ml)
1	1,627	0,372	1,014
2	1,378	1,014	0,524
3	2,01	1,901	1,418
4	1,802	1,696	1,259
5	1,848	1,676	1,194
6	1,284	1,11	0,744
7	1,076	0,84	0,484
8	1,083	0,843	0,483
9	0,97	0,67	0,301
10	0,68	0,491	0,244
11	0,778	0,506	0,52
12	0,297	0,419	0,423
13	0,514	0,563	0,482
14	0,504	0,387	0,216
15	0,494	0,362	0,35
16	0,466	0,34	0,172
17	0,459	0,345	0,185
18	0,398	0,318	0,19
19	0,419	0,327	0,188
20	0,34	0,301	0,208
21	0,42	0,287	0,131
22	0,384	0,281	0,144
23	0356	0,333	0,245
24	0,338	0,294	0,198
25	0,34	0,268	0,157
26	0,339	0,286	0,185
27	0,363	0,269	0,141
28	0,348	0,266	0,147

29	0,316	0,274	0,184
30	0,324	0,257	0,152
31	0,365	0,293	0,176
32	0,374	0,295	0,173
33	0,342	0,294	0,195
34	0,384	0,299	0,169
35	0,544	0,276	0,014
36	0,25	0,204	0,126
37	0,494	0,267	0,038
38	0,473	0,275	0,066
39	0,366	0,269	0,138
40	0,388	0,256	0,101
41	0,282	0,265	0,196
42	0,353	0,267	0,145
43	0,336	0,264	0,153
44	0,354	0,274	0,155
45	0,368	0,288	0,166
46	0,358	0,277	0,157
47	0,356	0,289	0,177
48	0,336	0,273	0,167
49	0,333	0,275	0,173
50	0,384	0,248	0,286

Le calcul des Concentration a été effectué selon la méthode de Warburg et Christian :

$$[\text{Protéine}] (\text{mg/ml}) = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$$

Année universitaire : 2016-2017

Présenté par : Abdi Nesrine

Caractérisation partielle des lectines extraites à partir des champignons de couche « *Agaricus bisporus* »

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

Les lectines sont des glycoprotéines ayant la capacité de se lier spécifiquement et de manière réversible aux hydrates de carbones des surfaces cellulaires. Elles sont multivalentes et provoquent dans certains cas l'agglutination des cellules, et sont trouvées dans pratiquement tous les organismes vivants.

Les champignons y compris les moisissures appartiennent à une importante division d'organismes et bénéficient actuellement d'un grand essor dans le domaine biomédical et diverses applications biotechnologiques. Notre objectif se situe dans la caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon « *Agaricus Bisporus* » dits champignons de couche ou champignons de Paris.

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, leur thermo-stabilité et leurs interactions et affinités avec les sucres et les métaux lourds. Elles ont ensuite été partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. L'évaluation de leur état de pureté est faite dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Mots Clés : Lectines ; Extraction ; Agglutination ; Affinité ; Purification.

Laboratoire : Biochimie

Membres du jury

Président du jury : Khelifi.D (Pr-UFM Constantine)
Rapporteur : Zitouni.A (MC-UFM Constantine)
Examineurs : Bellil.I (docteur-UFM Constantine)