



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 الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** microbiologie

**قسم :** بيولوجيا و علم البيئة

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Ecologie microbienne

Intitulé :

**Mise en évidence des lectines produites par *Pseudomonas aeruginosa***

**Présenté et soutenu par : - BOUSBIA Hania.**

**- CHERFIA Nour Elhouda.**

**Le : 26 /06/2018**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury : NECIB Youcef .(Pr. Université des Freres Mentouri Cne).**

**Rapporteur : BOULAHROUF khaled. (MA. Université des Frères Mentouri Cne).**

**Examineurs : OULMI Lamia. (MC.B. Université des Frères Mentouri Cne).**

**Année universitaire  
2017 - 2018**

## **Remerciements**

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Monsieur BOULLAHROUF Khalef Maître assistant au département de Microbiologie de l' Université des Frères Mentouri de Constantine pour avoir dirigé ce travail, pour toute la compréhension qu'il a montré, la disponibilité et la patience dont il a fait preuve à notre égard pendant notre parcours, pour sa générosité scientifique , sa gentillesse, ses conseils précieux et les encouragements qu'il nous a prodigué tout au long de ce mémoire.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions Monsieur **NECIB.Y** Professeur au département de Biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi à l'examineur de ce mémoire, Mme Lamia OULMI ép. KITOUNI Maître de conférence catégorie B l'Université des Frères Mentouri de Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez participé au jury de ce mémoire.*

*Nous voudrions également adresser un grand merci à Mlle LOUCIF Karima et à Mr Mohammed Es Seddik TOUMI doctorants au niveau du laboratoire chaaba erassas biopole pour leur grande aide, leur confiance, leur générosité et leur énorme soutien tout au long de notre travail.*

*Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tous ceux qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.*

**MERCI**

## *Dédicaces*

*Dieu tout Puissant merci pour le pouvoir et le courage que vous m'avait donné pour compléter ce travail.*

*A mon père : NAFAA*

*J'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension et soutien. Tes prières et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Trouve à travers ce modeste travail, récompense de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.*

*A ma mère : FIROUZ*

*Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit. Que tes sacrifices, tes peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Ce travail est également le fruit de ton amour, tes bénédictions et surtout ta bonne éducation.*

*A ma très chère sœur SOULEF et son mari SABER*

*A mon très chère frère AMAR HANI*

*Un énorme merci à vous trois pour votre soutien, votre aide et votre affection sans retenue*

*Un merci particulier à mon amie, ma partenaire, NOUR EL HOUDA qui sans elle ce travail n'aurait pas été aussi réussi, avec son sérieux, sa discipline, sa détermination mais aussi ses colères, aussitôt suivi de son sourire et de sa bonne humeur.*

*A mes chères amies : ASMA, HAOUA, IKRAM, RATIBA et SELMA.*

*A mon ami : ZINE EDDINE.K.*

*Un immense MERCI au reste de mes amis(es), et de ma famille, et à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide Un immense MERCI.*

*HANIA*

## *Dédicaces*

*Dieu tout Puissant merci pour le pouvoir et le courage que vous m'avait donné pour compléter ce travail.*

***A mon père : ABD ELALI***

*J'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension et soutien. Tes prières et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Trouve à travers ce modeste travail, récompense de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.*

***A ma mère : MALIKA***

*Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit. Que tes sacrifices, tes peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Ce travail est également le fruit de ton amour, tes bénédictions et surtout ta bonne éducation.*

*A mes très chères sœurs et frères SAMIR, IMED, KHADIDJA et ROKIA*

*A mes chers neveux et nièces RIHEM, SARA, HOUSSEM, YARA, AMIR et KACEM*

*A mes chers HASSINA et SAAD FAHEM*

*A mes chères cousines MERIEM, MAROUA, SAFA et HADIL*

*A mes chères amies OUEDJDANE, HALLA et FERIEL*

*Un énorme merci à vous pour votre soutien, votre aide et votre affection sans retenue.*

*Un merci particulier à mon amie, ma partenaire, HANIA qui sans elle ce travail n'aurait pas été aussi réussi, avec son sérieux, sa discipline, sa détermination mais aussi ses colères, aussitôt suivi de son sourire et de sa bonne humeur.*

*Un immense **MERCI** a mes amis(es), au reste de ma famille, et à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide un immense **MERCI**.*

***NOUR EL HOUDA***

## Liste des abréviations

<b>BN :</b>	Bouillon nutritif
<b>BSA :</b>	Bovine serum albumine
<b>CaCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de calcium
<b>CRD :</b>	Carbohydrate Recognition Domain
<b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> :</b>	Sulfate de fer
<b>Fuc :</b>	Fucose
<b>Gal :</b>	Galactose
<b>GalNAc :</b>	N-acétylgalactosamine
<b>GlcNAc :</b>	N-acétylglucosamine
<b>GE :</b>	Gralet modifié selon Eagon
<b>GN :</b>	Gélose Nutritive
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :</b>	Phosphate de potassium monobasique
<b>KNO<sub>3</sub> :</b>	Nitrate de potassium
<b>KOH :</b>	Hydroxyde de potassium
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de potassium
<b>LB :</b>	Luria Bertani
<b>Man :</b>	Mannose
<b>MgSO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de magnésium
<b>MnSO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de manganèse
<b>PBS :</b>	phosphate buffered saline
<b>Rpm :</b>	rotation par minute
<b>SA :</b>	Sulfate d'ammonium
<b>ZnSO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de zinc

## Liste des figures

**Figure 1 :** représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (Somers, et al. 2000).

**Figure 2 :** 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 et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets

**Figure 4 :** colonie de *Pseudomonas aeruginosa* après incubation de 24heures...

**Figure 5 :** test d'hémagglutination (extrait extracellulaire cultivé sur milieux GE et BN en présence d'érythrocytes de lapin.)

**Figure 6:** test d'hémagglutination (extrait intracellulaire du milieu GE en présence d'érythrocytes de lapin)

**Figure 7:** test d'hémagglutination (extrait intracellulaire du milieu BN en présence d'érythrocytes de lapin)

**Figure 8:** test d'hémagglutination (extrait intracellulaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, cultivée sur milieu GE, après dialyse en présence d'érythrocytes de lapin)

**Figure 9 :** purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de *Pseudomonas aeruginosa*

**Figure 10:** test d'hémagglutination de pic A et pic B

**Figure 11:** test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction active

**Figure 12(A) :** l'effet des différentes températures sur l'activité hémagglutinante de la fraction active

**Figure 12(B) :** l'effet des différents pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction active

**Figure 13 :** test d'activité antibactérienne de la fraction active sur quelques souches de la gamme ATCC

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** historique de découverte des Lectines

**Tableau 2 :** taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (BENABID, 2009).

**Tableau 3 :** caractéristiques des lectines de l'extrait brut après purification  
.préliminaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableeau 4 :** effet des différents sucres sur l'activité hémagglutinante de  
la fraction active.



## Résumé

Les lectines sont présentes dans tous les organismes vivants et sont utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Actuellement, les lectines microbiennes suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leurs diverses activités biologiques.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* conservée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine « Ibn Badis », a été utilisée afin de mettre en évidence la production des lectines de les caractériser de les purifier et d'étudier leur activité antibactérienne. La souche a été cultivée sur deux milieux liquides (BN et GE). Le pouvoir agglutinant des extraits extracellulaire et intracellulaire des deux milieux de culture est mis en évidence en présence d'un seul type d'érythrocytes de lapins.

Les deux extraits (intracellulaires et extracellulaires) de *Pseudomonas aeruginosa*, quel que soit le milieu, ont agglutiné. La plus forte agglutination a été obtenue avec l'extrait intracellulaire en présence d'érythrocytes de lapins avec le milieu GE. Cette dernière a été retenue. Pour purification et l'étude de l'activité antibactérienne

Les lectines, de la fraction intracellulaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa* a subi une première purification primaire par du sulfate d'ammonium à 60% et filtration sur gel G-50. La précipitation différentielle a montré une activité hémagglutinante de 228,57UM/mg. Après filtration, deux pics ont été observés (pics A et B) le pic A présente une activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 55,41 UH/mg, et 228,57 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 78,04UH/mg (picA), après filtration sur gel G-50. L'activité hémagglutinante de cette fraction persiste à des pH alcalins et montre une stabilité à des températures moyennes.

L'activité antibactérienne de la fraction active a été testée sur 5 bactéries tests de la gamme ATCC avec trois différentes concentrations mais celle-ci n'a montré aucune activité antibactérienne visible.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, lectine, glycoprotéine, agglutination, purification, chromatographie

## Abstract

Lectins are present in all living organisms and are used as tools in research and in the biomedical sector. Currently, microbial lectins are gaining increasing interest because of their various biological activities.

The strain of *Pseudomonas aeruginosa* preserved in the bacteriology laboratory of Constantine University Hospital "Ibn Badis", was used to highlight the production of lectins to characterize them to purify and study their antibacterial activity. The strain was cultured on two liquid media (BN and GE). The agglutinating power of the extracellular and intracellular extracts of the two culture media is demonstrated in the presence of a single type of erythrocytes (rabbit erythrocytes).

The two extracts (intracellular and extracellular) of *Pseudomonas aeruginosa*, regardless of the medium, agglutinated. The strongest agglutination was obtained with the intracellular extract in the presence of rabbit erythrocytes with GE medium. The latter has been selected for purification and antibacterial activity.

Lectins from the intracellular fraction of the *Pseudomonas aeruginosa* strain underwent a first primary purification by 60% ammonium sulfate and G-50 gel filtration. Differential precipitation showed a hemagglutinating activity of 228.57 UH / mg. After filtration, two peaks were observed (peaks A and B) peak A exhibits haemagglutinating activity. However, the specific activity of the crude extract was 55.41 UH / mg, and 228.57 UH / mg after ammonium sulfate precipitation, then 78.04 UH / mg (picA), after gel filtration. G-50. The haemagglutinating activity of this fraction persists at alkaline pH and shows stability at average temperatures.

The antibacterial activity of the active fraction was tested on 5 test bacteria of the ATCC range with three different concentrations but that showed no visible antibacterial activity.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, lectin, glycoprotein, agglutination, purification, chromatography

## ملخص

توجد اللكتينيات في جميع الكائنات الحية وتستخدم كأدوات في البحث وفي قطاع الطب الحيوي. حاليا ، تكتسب اللكتينيات الميكروبية اهتماما متزايدا بسبب أنشطتها البيولوجية المختلفة.

تم استخدام السلالة (*Pseudomonas aeruginosa*) المحفوظة في مختبر علم الجراثيم بمستشفى جامعة قسنطينة "ابن باديس" لتسليط الضوء على إنتاج اللكتينيات لتوصيفها لتنتقيتها ودراسة نشاطها المضاد للبكتيريا. تم استزراع السلالة على وسيطين ساتلين BN و GE. يتم إثبات قوة التراص للخلاصات الخارجية والداخلية الخلوية داخل وسطي الزرع في وجود نوع واحد من كريات الدم الحمراء (كريات دم حمراء للأرنب).

المقتطفان (داخل الخلوي وخارج الخلوي) ، بغض النظر عن الوسط ، احدثت تراص. تم الحصول على أقوى تراص مع خلاصة داخل الخلايا في وجود كرات الدم الحمراء للأرنب مع وسط الزرع الثاني و قد استعمل هذا الاخير للتنقية و دراسة النشاط المضاد للبكتيريا .

خضعت اللكتينيات للوسط الداخلي للخلايا البكتيرية لأول تنقية أولية بنسبة 60 ٪ من كبريتات الأمونيوم ثم بواسطة هلام الترشيح. بعد الترشيح، لوحظت ذروتان (ذروة القمتان ا و ب ) الذروة ا تمثل نشاط التراص.

كان النشاط المحدد للمستخلص الخام هو 55.41 وحدة تراص/مع ثم 228.57 وحدة تراص/مع بعد الترسيب بكيريت الامونيوم و 78.04 وحدة تراص/مع بعد استعمال هلام الترشيح. يستمر نشاط التراص لهذا المستخلص في درجة حموضة قلوية و يظهر ثبات عند درجات حرارة متوسطة.

بثلاث تراكيز مختلفة لكنها تم اختبار النشاط المضاد للجراثيم للجزء النشط على خمس من بكتيريا النطاق ATCC لم تظهر أي نشاط مضاد للبكتيريا

# Tables des matières

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé en Français

Résumé en Arabe

Résumé en Anglais

**Introduction**..... 1

## **Bibliographie**

1. Les lectines.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Historique.....	4
1.3. Structures.....	6
1.4. Propriété des lectines.....	6
1.4.1. Activité mitogène.....	6
1.4.2. Liaison avec les sucres.....	6
1.4.3. Agglutination des cellules.....	6
1.4.4. Toxicité des lectines.....	7
1.5. Utilisation des lectines.....	7
1.5.1. Dans le domaine biomédical.....	7
1.5.2. Dans le domaine agronomique.....	8
1.6. Distribution des lectines dans le mode vivant.....	9
1.6.1. Lectine de vertébrés.....	9
1.6.2. Lectines d'invertébrés.....	10
1.6.3. Lectines de plantes.....	11
1.6.4. Lectines de microorganismes.....	13
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
2.1. Morphologie et structure.....	17
2.2. Caractères cultureux.....	17
2.3. Caractères biochimiques.....	19
2.3.1. Métabolisme.....	19
2.3.2. Production de pigments.....	19
2.4. Facteurs de virulence.....	19
2.4.1. Facteur de virulence de surface.....	19
2.4.2. Facteur de virulence sécrété.....	19

## **Matériel et méthode**

### 1. Matériel biologique

1.1. Souche étudiée <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
1.2. Repiquage et vérification de la pureté de la souche.....	20
2. Mise en évidence des lectines.....	20
2.1. Fermentation.....	20
2.2. Extraction des lectines.....	21
a. Lectines extracellulaires.....	21
b. Lectines intracellulaires.....	21

2.3. Test d'hémagglutination et mise en évidence des lectines.....	21
2.4. Dosage colorimétrique des protéines.....	22
3. purification des lectines.....	22
3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	22
3.2. Dialyse.....	23
3.3. Chromatographie sur gel de filtration (Sephadex G-50).....	23
3.4. Test d'inhibition d'hémagglutination.....	23
3.5. Effet de température et de pH sur l'hémagglutination.....	24
4. Activité antibactérienne de la fraction active.....	24
4.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	24

## Résultats et discussion

1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante.....	25
1.1. Fermentation.....	25
1.2. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des fractions protéiques extraites...	26
2. Purification des lectines.....	29
2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	30
2.2. Chromatographie sur gel de filtration Sephadex G-50.....	31
3. Caractérisation de l'activité hémagglutinante de la fraction active.....	33
3.1. Inhibition de l'hémagglutination.....	33
3.2. Effet du pH et de la température sur la stabilité de l'activité hémagglutinante.....	35
3.3. Activité antibactérienne des molécules hémagglutinante.....	36

Conclusion- perspectives.....39

Références bibliographiques.....41

Annexes

# Introduction

## Introduction

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent, chez tous les organismes des virus aux animaux en passant par les bactéries, les plantes et les insectes. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes). Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes.

Les méthodes anciennement utilisées pour l'identification de ces dernières consistent à mélanger l'extrait à examiner (dérivé par exemple d'un tissu ou d'une plante) avec des érythrocytes en solution. L'agglutination, la précipitation ou l'agrégation des cellules indique que la solution analysée contient une ou plusieurs molécules agglutinantes.

Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle mais la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixantes. L'intérêt principal était motivé surtout par l'utilisation des lectines dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides, tels que les déterminants des groupes sanguins et les glycoconjugués, principalement les glycoprotéines.

Le nombre de travaux publiés sur les lectines a vu une grande croissance ceci est du, d'une part à l'abondance des lectines dans tous les organismes vivants, et d'autre part à une certaine facilité de leur purification.

Les propriétés biologiques des lectines végétales ont fait l'objet d'étude, depuis plusieurs années, dans la plupart des études réalisées dans ce domaine. Également, des données considérables ont été recueillies ces dernières années [72] sur la production de lectines par les bactéries pathogènes, et de leur rôle dans l'initiation et le développement du processus pathologique. Et, parmi ces bactéries pathogènes *Pseudomonas aeruginosa*, dont les lectines ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, ce pathogène opportuniste produit deux lectines différentes : la première (PA-IL) spécifique pour le galactose et la deuxième (PA-IIL) montre une très forte affinité pour le fucose [30].

Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais dans certaines conditions elles sont aussi présentes sur la surface de la membrane externe de la bactérie [80].

L'objectif de notre mémoire est de s'initier à l'isolement des lectines, à leurs caractérisations et à la mise en évidence de leurs activités antibactériennes. Pour cela nous avons retenu une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, isolée au niveau du CHU de Constantine.

# **Bibliographie**

## Les lectines

### 1.1. Définition

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, végétale ou animale, dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier [31]. Ces substances ont été successivement baptisées agglutinines, hémagglutinines, phytohémagglutinines et finalement lectines, du verbe latin *legere* qui veut dire **choisir** ou **sélectionner**, lorsqu'il fut découvert qu'elles avaient la capacité de distinguer les divers groupes sanguins humains.

Pour un certain nombre d'auteurs, la notion de lectine n'est plus basée sur le pouvoir agglutinant, mais seulement sur la reconnaissance spécifique par la protéine d'un motif saccharidique porté par la membrane d'une cellule (sanguine ou non). La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène.

La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation [63-32]. Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité [85].

L'abondance de ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

### 1.2. Historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes [73]. À partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1954, [9] ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné. Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin "*legere*" qui veut dire : sélectionner. Le (**Tableau 1**) montre l'historique de découverte des lectines.

**Tableau 1:** historique de découverte des Lectines

ANNEE	AUTEURS	DECOUVERTES
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine <i>d'Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	Stillmark	Activité hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erlich	Activité hemagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1891	Hellin	Activité hemagglutinante de la graine <i>d'Abrus Precatorius</i>
1897	Elfstrand	Introduction du terme d'hemagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hemagglutination par la Chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hemagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hemagglutinante dans les plantes non Toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes a Hemagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hemagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavalina A (Con A)
1926-27	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins

<b>1947-29</b>	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes a Hémagglutinines
<b>1949</b>	Liener	Toxicité des hemagglutinines de <i>Phaseolus Vulgaris</i>
<b>1949</b>	Jaffe	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>1952</b>	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
<b>1954</b>	Boyd& Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
<b>1960</b>	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>1965</b>	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
<b>1966</b>	Boyd	Lectines dans les algues
<b>1981</b>	Reinsner et al	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
<b>1990</b>	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

### 1.3. Structure

Les lectines des autres organismes sont composées d'une ou plusieurs sous-unités associées par des forces non covalentes en une molécule polymère. La mieux connue, la con A, est un tétramère dans lequel des ions métalliques interviennent dans l'assemblage des sous-unités et dans la configuration du site de liaison, configuration d'une grande importance pour son activité. Les lectines ont été classées selon leurs propriétés en agglutinines, en mitogènes, en toxiques, et en enzymatiques (chez *Vigna radiata*, une lectine purifiée possède une activité galactosidase). Certaines lectines des végétaux, très répandues, sont formées d'une simple chaîne polypeptidique.

### 1.4. Propriétés des lectines

#### 1.4.1. Activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation

lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T [5].

### **1.4.2. Liaison avec les sucres**

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine [55].

### **1.4.3. Agglutination des cellules**

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules.

Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination [59,87].

En outre, on s'est aperçu que 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 [87].

### **1.4.4. Toxicité des lectines**

Plusieurs lectines (con A, agglutinine du germe de blé, PHA du haricot, lectine du robinier...) sont toxiques pour les cellules animales. Leur toxicité est beaucoup plus faible que celle de la ricine, de l'abrine et de la modeccine isolée récemment des racines d'*Adenia digitata* (Passifloracée); ces trois lectines sont mortelles à faible dose. Leur toxine est généralement sélective et agit plus fortement sur les cellules tumorales. Des expériences sur l'utilisation thérapeutique de la ricine sur des cancéreux ont donné des résultats encourageants surtout depuis que l'on sait coupler la sous-unité toxique de la ricine avec des anticorps spécifiques de cellules tumorales. Les lectines ont été rendues responsables de la toxicité de diverses graines servant dans l'alimentation (haricots, soja, fève...). Mais, par trempage et cuisson des graines, ces effets néfastes sont supprimés.

## **1.5. Utilisation des lectines**

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements 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 [50]. Aujourd'hui, les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

### 1.5.1. Dans le domaine biomédical

- Hématologie

Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains [9] et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

- 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 [36].

Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapeutiques [41].

- Biologie cellulaire

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques [41]. Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires [4].

- Cancérologie

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules [34].

[43] 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.

### 1.5.2. Dans le domaine agronomique

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures [57]

Par exemple, la lectine de blé et celle de la graine de *Bauhinia purpurea* ont des effets létaux pour deux insectes (*Ostrinia nubilabis* et *Diabrotica undecimpunctata*) se nourrissant sur le maïs, l'action des lectines peut se faire à des concentrations relativement faibles [58].

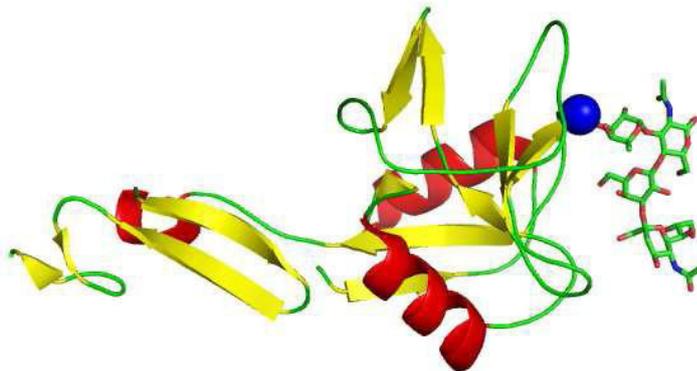
## 1.6. Distribution des lectine dans le monde vivant :

### 1.6.1. Lectines de vertébrés

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les *galectines*, les lectines de type-C et les *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins* (siglecs).

Les structures de galectines sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le  $\beta$ -galactose et plus précisément pour le lactose ( $\beta$ Gal1-4Glc) et le N-acétyle lactosamine ( $\beta$ Gal1-4GlcNAc) [48]. La première structure tridimensionnelle d'une galectine humaine (la galectin-7 (hGal-7)) a été obtenue dans sa forme native et complexée avec le galactose, le galactosamine, le lactose, et le N-acétyllactosamine [49].

Les lectines du type-C présentent un *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre [20]. Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est l'E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) [77], (**Figure 1**).



**Figure 1:** représentation graphique de la structure de l'E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) [70]. Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique [13]. Elles sont membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig) et adoptent un repliement de type immunoglobuline.

Les autres classes de lectines animales comprennent les lectines du type P qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CDMPR [62]. Les pentraxines qui sont une famille des lectines capables de se lier à des ligands de manière Ca<sup>2+</sup> dépendante [22].

D'autres types de lectines de vertébrés telles que les calnexines-calreticuline comme la lectine calnexine de l'espèce *Canis familiaris* [70] et les ficolines [25] ont récemment été mises en évidences.

La plupart des lectines de vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans la vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire. Par exemple, dans le processus de fécondation, un glycoconjugué de la surface de l'ovule interagit avec une lectine (spermadhésine) du spermatozoïde [82]. Il a été aussi montré que l'embryon exprime à sa surface cellulaire la L-sélectine six jours après la fécondation. En se liant aux sucres spécifiques de l'endothélium utérin, la L-sélectine détermine ainsi la première étape indispensable à la fixation du blastocyte à la surface de l'endomètre et permet le début de la grossesse [26].

### 1.6.2. Lectines d'invertébrés

La présence de lectines a été démontrée chez les invertébrés terrestres ou marins. Ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et présentent donc des spécificités pour les glucides présents à la surface d'organismes pathogènes.

Chez les invertébrés, les lectines sont distribuées dans toutes les classes et sous-classes étudiées. Nous pouvons donner en exemple : les gastéropodes avec la lectine d'escargot CHA-II de *Cepaea hortensis* [22], les échinodermes avec l'hémagglutinine de l'oursin *Hemicentrotus pulcherrimus* [91], les crustacés avec la lectine du crabe *Charybdis japonica* [84], et les insectes avec la lectine du sphinx du tabac *Manduca sexta* [92]. Les lectines présentent des localisations variées : système digestif, appareil de reproduction, hémolymphe ou branchies.

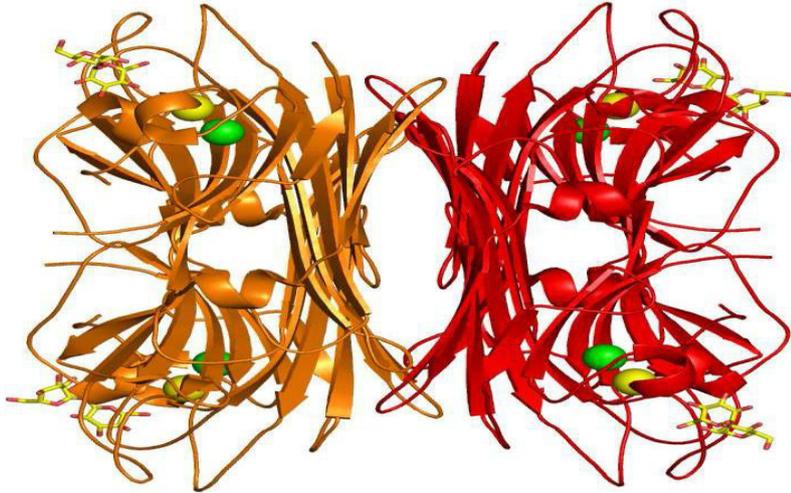
Un nombre limité de lectines d'invertébrés a été cristallisé. La codakine purifiée à partir des branchies de la palourde blanche *Codakia orbicularis* est une lectine de type-C qui a une forte spécificité pour des N-glycannes biantennés [33]. D'autres exemples de lectines de

type-C sont la lectine de tunicier *Polyandrocarpa misakiensis* [61] et la lectine I (CEL-I) du concombre de mer *Cucumaria echinata* [78]. Les structure 3D de lectines de type ricine ont, aussi, été obtenues telles que la lectine III (CEL-III) du même concombre [84] et la lectine du vers de terre *Lumbricus terrestris* [79], ces deux lectines présentant une spécificité pour le galactose. La limule, *Tachypleus tridentatus*, est un fossile vivant qui présente un grand nombre de lectines impliquées dans l'immunité innée. Les structures de la tachylectine 2, un  $\beta$ -propeller [7] et de la tachylectine 5A, une protéine de type fibrinogène [42] ont été résolues en complexe avec le GlcNAc. La structure de la lectine extraite de l'escargot *Helix pomatia* (HPA) [68] a permis de définir une nouvelle famille de lectine, le type H.

### 1.6.3. Lectines de plantes

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g, les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavoline A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 [21]. Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé « b jelly roll » formé par deux feuillets  $\beta$  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'assemblage macromoléculaires sous la forme de dimères ou de tétramères [76].

La (**Figure 2**) représente un tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose [17] 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 [52].



**Figure 2:** structure tétramérique de la lectine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) [17]. Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA [89].

La famille des Monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3D a été la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) [90] La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose tel que la jacaline isolée des graines d'*Artocarpus integrifolia* [69].

La famille Amaranthaceae contient la lectine ACA d'*Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée avec le Galb1-3GalNAc [83] La famille Euphorbiaceae englobe les lectines qui présentent une grande toxicité, un exemple de lectine de cette famille est la lectine RCA isolée des graines de ricin *Ricinus communis*. La ricine est un hétérodimère où la chaîne  $\beta$  constitue des CRD pour le galactose [66] La famille Solanaceae englobe les lectines de pommes de terre et des tomates mais aucune structure n'a encore été déterminée.

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides [12,65].

#### 1.6.4. Lectines de microorganismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital [38,71].

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands [88]. Elle est composée de deux polypeptides HA1 et HA2. La sous unité HA1 correspond à un domaine globulaire qui contient le site de liaison de la lectine.

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines *fimbriaes* (pili et flagelles), les toxines et les lectines *solubles* [37].

Les lectines fimbriaes sont trouvées dans des organelles de surface des bactéries (pili et flagelles) qui présentent diverses fonctions telles que la reconnaissance des glycanes de l'hôte et l'adhésion sur les surfaces de cellules cibles. Il existe trois types de pili : les types IV, les types I et les types P. Par exemple, la PapG est une adhésine du pili de type P trouvée chez les souches uropathogènes de la bactérie *Escherichia coli*. PapG présente une grande importance dans la phase d'adhésion sur les globoside (GbO4) des cellules humaines du rein lors des infections urinaires et la structure en complexe avec la partie tétra-saccharide du GbO4 a été résolue [19]. Les lectines de cette famille sur une structure allongée avec un repliement de type b-sandwich.

La famille des toxines est constituée par des protéines secrétées par les bactéries et qui exercent une activité toxique sur les cellules de l'hôte. Les toxines du type AB5 sont secrétées par différentes bactéries comme *Shigella dysenteriae*, *Borderella pertussis* et *Vibrio cholerae*. Le domaine lectine de la toxine sécrétée par le *Vibrio cholerae* est un b-pentamère et sa structure a été résolue complexée avec le penta-saccharide GM1 qui est un ganglioside présent sur les epithelia [53].

La famille de lectines solubles comprend des protéines cytoplasmiques telles que PA-II et PA-III de *Pseudomonas aeruginosa* respectivement spécifiques pour le a-D-galactose et le a-L-fucose. Elles présentent des structures tétramériques ou un ou deux ions calciums respectivement sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre [40].

## 2. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie versatile et ubiquitaire dans l'environnement. Elle est communément trouvée dans le sol et l'eau (eaux douces et marines) et sur les surfaces en contact avec ces milieux.

Etymologiquement, le mot issu du grec *pseudo* qui veut dire simili ou imitation et *monas* unité désignait les germes du début de la microbiologie.

Le mot *aeruginosa*, qui signifie vert de gris en latin, fait référence au pigment contenu par la bactérie qui donne à la colonie sa couleur caractéristique.

*Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*, composé de 12 autres membres [3]. La taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* est représentée dans le (Tableau 2)

**Tableau 2:** taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* [8].

<b>Règne</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Embranchement</b>	Prokaryota
<b>Division</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria
<b>Ordre</b>	Pseudomonadales
<b>Famille</b>	Pseudomonadaceae
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### 2.1. Morphologie et structure

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1 à 3 µm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement

unique, dépourvu de spores et de capsules. La paroi du bacille pyocyanique est caractéristique de celle des bactéries à gram négatif [67] (**Figure 3**).



**Figure 3:** photographie de *Pseudomonas aeruginosa* sous microscope électronique par balayage

### 2.2. Caractères cultureux

Le bacille pyocyanique est une bactérie aux besoins très limités. Croissant sur des milieux synthétiques simples, elle se développe facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie aérobie stricte mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies [74]. Elle est caractérisée par une odeur florale [23].

Un milieu sélectif à base cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) en bactériologie médicale [16].

Selon [18], trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

- colonies larges "la" de 2 à 3 mm de diamètre à bord irrégulier rugueuses une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques ;
- colonies plus petites lisses "S" bombées à bord régulier.
- colonies muqueuses "M" bombées coalescentes, filantes rencontrées chez les souches produisant un slim composé d'un polymère d'alginate.

## 2.3. Caractères biochimiques

### 2.3.1. Métabolisme

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède :

- une oxydase ;
- une nitrate-réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu'au stade de N gazeux) ;
- un métabolisme oxydatif des sucres appréciable sur milieu MEVAG (milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) ;
- une arginine-dihydrolase.

### 2.3.2. Production de pigments

D'après [16] *Pseudomonas aeruginosa* est la seule espèce à produire deux types de pigments diffusibles dans le milieu de culture qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A. Les pigments sont :

- pyoverdine, pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme, mis en évidence sur le milieu de culture King B.
- pyocyanine (phénazinique), pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme, mis en évidence sur le milieu de culture King A.

## 2.4. Facteurs de virulence

*Pseudomonas aeruginosa* est une espèce invasive en raison de la production de facteurs de virulence :

- de surface qui lui permettent de s'attacher, de coloniser et d'envahir les tissus ;
- secrétés qui endommagent les tissus et déclenchent des processus inflammatoires.

Il est souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en l'absence d'outil diagnostique adéquat [54].

### 2.4.1. Facteurs de virulence de surface

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, les LPS et l'alginate.

#### ➤ Le flagelle

*Pseudomonas aeruginosa* possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité de type "swimming" mais qui intervient également dans la mobilité de type "swarming" [45]. Le flagelle bactérien est une structure rotative actionnée par un moteur situé à la base, qui entraîne un filament agissant comme une hélice [6]. L'implication du flagelle

dans la pathogénicité de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Pseudomonas aeruginosa* est bien établie [56].

### ➤ **Les pili de type IV**

Le pili de type IV est la principale adhésine de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales [35]. Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type "switching" [86] et de type "swarming".

### ➤ **Le lipopolysaccharide (LPS)**

Le LPS, localisé dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif est, d'une part, connu pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et, d'autre part, pour son activité endotoxique. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de synthétiser deux formes de LPS A et B [46].

### ➤ **Alginate**

*Pseudomonas aeruginosa* produit l'alginate pour s'adapter dans certaines situations environnementales inappropriées au développement bactérien. C'est le cas des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose [11]. L'alginate est un exopolysaccharide mucoïde composé de polymères de l'acide mannuronique associé avec l'acide glucuronique.

## **2.4.2. Facteurs de virulence sécrétés**

Au cours de la phase d'adhésion, *Pseudomonas aeruginosa* est capable de sécréter un grand nombre de facteurs de virulence pour provoquer une lésion tissulaire.

### ➤ **La pyocyanine**

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie, qui est impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes [44]. La pyocyanine a un rôle crucial dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*.

### ➤ **Les lectines solubles**

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, deux lectines solubles ont été découvertes récemment. La première PA-IL (ou LecA), d'une taille de 13,7 kDa, montre une

spécificité pour le galactose, et la deuxième, PA-III (ou LecB) d'une taille de 11,7 kDa, montre une très forte affinité pour le fucose. Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais ont aussi été identifiées sur la surface de la membrane externe de la bactérie. Les deux lectines ne montrent aucune identité de séquence, mais sont toutes les deux dépendantes de la présence de calcium pour être actives.

# Matériel et méthodes

## Matériel et méthodes

Le travail expérimental a été effectué au laboratoire de « Génie Microbiologique et Applications » du Bio-pôle situé à Chaab ersass (Université des Frères Mentouri-Constantine1).

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Souche étudiée: *Pseudomonas aeruginosa*

Ce travail a été réalisé sur une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* conservée, isolée et identifiée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine « Ibn Badis ».

#### 1.2. Repiquage et vérification de la pureté de la souche

La souche a été repiquée en stries sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Cette opération est répétée jusqu'à obtention d'une souche pure. La pureté est vérifiée par l'aspect uniforme des colonies de la souche sur milieu gélosé et par la coloration de Gram.

### 2. Mise en évidence des lectines

#### 2.1. Fermentation

La mise en évidence de la production des lectines chez *Pseudomonas aeruginosa* est réalisée sur deux milieux de culture liquides : GE (Grelet modifié par Eagon) et un bouillon nutritif (BN). Ces deux milieux sont différents par leur composition (**Annexe 1**).

Des pré-cultures sur le milieu LB, répartis dans des tubes à essais de 10ml, sont effectuées à raison d'une colonie par tube. Les pré-cultures sont incubées à 37°C, et à une agitation orbitale fixée à 140 rpm (rotation par minute) pendant 48 heures. Après incubation, les pré-cultures sont transférées dans des Erlenmeyers de 1L contenant chacun 500ml de chaque milieu de culture soit 2 Erlenmeyers de GE et 2 Erlenmeyers de BN. Les deux milieux de culture sont incubés à 37°C et à 140 rpm pendant 48 heures.

### 2.2. Extraction des lectines

#### a) Lectine extracellulaire

L'extraction des lectines a été réalisée à partir de la culture liquide en phase exponentielle de croissance par centrifugation à 4500 g pendant 20 min, les surnageants sont récupérés et immédiatement soumis à un test d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence des lectines extracellulaires.

#### b) Lectine intracellulaire

Pour l'extraction des lectines intracellulaires, les culots bactériens sont lavés trois fois avec du tampon PBS, pH 7,2 (**Annexe 2**) puis mis en suspension dans 25 ml du même tampon. Les cellules bactériennes sont désintégrées par vibrations ultrasoniques en utilisant un sonificateur avec une sonde de 13mm de diamètre. Le traitement ultrasonique est appliqué à une amplitude de 75% avec un cycle de marche/arrêt de 5 secondes, pendant un temps total de sonification de 2 minutes. Les échantillons sont maintenus dans un bac de glace durant tout le processus de désintégration.

Après sonification, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 25000g pendant 15 minutes à 4°C, et les surnageants obtenus sont immédiatement soumis à un test d'hémagglutination.

### 2.3. Test d'hémagglutination et mise en évidence des lectines

Ce test repose sur l'observation de l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les deux surnageants de culture. L'agglutination est visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse. Parallèlement, la détermination du point d'équivalence, elle correspond à la concentration minimale du surnageant montrant une agglutination évidente. Nous pouvons utiliser des érythrocytes de différents mammifères (Lapin, humain, rat)

L'activité hémagglutinante des surnageants de culture de la souche *Pseudomonas aeruginosa* a été testée dans des microplaques de titration de 96 puits en présence d'érythrocytes de lapin (l'échantillon sanguin a été, obtenu à partir d'animaux élevés dans l'animalerie de l'université de Constantine) de cette manière :

50 µL de tampon PBS sont placés dans chaque puits d'une ligne de la microplaque, puis 50µL de chaque surnageant (ou extrait) sont ajoutés dans le premier puits, et une double

dilution en série est réalisée. Ensuite, 50 µL de la suspension d'érythrocytes à 4% v/v en solution saline (NaCl 150 mM) (**Annexe 3**) sont ajoutés et mélangés à chaque puits.

La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après 30 minutes d'incubation à 30°C, deux cas peuvent se présenter :

-dans le cas d'un résultat positif, les érythrocytes forment un tapis qui couvre le fond du puits de la plaque de microtitration.

-dans le cas d'un résultat négatif, tous les érythrocytes se précipitent au fond du puits, et un point rouge est observé.

### 2.4. Dosage colorimétrique des protéines

Le dosage colorimétrique des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford 1976, en utilisant le BSA (la *bovine serum albumine*) comme un standard pour établir une courbe d'étalonnage (**Annexe 4**). C'est une méthode rapide et très sensible, son seuil de détection est de 2 à 5 µg de protéines.

Dans un tube sec 100µl de l'extrait brut a été mélangé avec 4ml de réactif de Bradford et dans un autre tube 100µl de tampon PBS et un troisième tube contient 100µl de BSA mélangés toujours avec 4ml de réactif Bradford, laissé agir pendant 15 min et mesurer l'absorbance de chaque mélange.

## 3. Purification des lectines

### 3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

10.3 ml de extrait brut intracellulaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa* est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à une saturation de 60%. Cette saturation a été réalisée en ajoutant 3,71g du sulfate d'ammonium (361g pour 1litre) (**Annexe 5**) et laisser sous agitation pendant 30 min à 0°C. L'échantillon précipité est centrifugé à 4500g pendant 45 min à 4°C puis le culot (protéines précipitées) est solubilisé dans 5 ml de tampon PBS. La solution, ainsi obtenue, est dialysée dans une membrane de dialyse spectra-pro de 12Kda de rétention afin d'éliminer le sulfate d'ammonium.

### **3.2. Dialyse**

Les protéines précipitées sont récupérées dans 5ml du tampon PBS, l'ensemble est introduit dans un sachet de dialyse (boudin, limite d'exclusion=12KDa) et dialysé contre un litre du même tampon(PBS) sous une faible agitation à 4°C pendant 24 heures. L'activité hémagglutinante de la fraction protéique obtenue est testée (test d'hémagglutination).

### **3.3. Chromatographie sur gel d'exclusion (Sephadex G-50)**

Une colonne d'une dimension de (15 cm) possède un domaine de fractionnement situé entre (5 et 15KDa) a été préparée. La colonne est équilibré avec du tampon PBS (à pH 7,2 contient 150mM NaCl) jusqu'à stabilisation du débit à 0,5mL/min puis 2ml de dialysat sont déposés en haut de la colonne et élués à un débit constant, par une pompe péristaltique avec vitesse de 2 rpm des fractions de 2 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions Gilson TDC-80

L'absorbance de chaque fraction est mesurée à 280 nm et les fractions qui contiennent des molécules sont rassemblés et testés pour leur activité agglutinante.

### **3.4. Test d'inhibition de l'hémagglutination**

La mesure de l'inhibition d'hémagglutination est un test rapide et simple à réaliser en effet il permet d'évaluer les ligands solubles de façon comparative.

Pour ce test d'inhibition, nous avons utilisé un tampon PBS à pH=7,2 ainsi que six différents sucres préparés dans le même tampon PBS à PH=7,2.

Un volume de 25 µL de la solution tampon est déposé dans chaque puits, puis une gamme de concentrations de 50 µL de sucre est réalisée par dilutions en cascade dans les puits suivants. Un volume de 25 µL de la fraction active est ajouté à chaque puits contenant 25 µL de sucre/glycoprotéine à tester.

Après incubation 30min à 30°C, 50 µL d'une suspension d'érythrocytes de lapin à 4% v/v sont ajoutés à chaque puits.

La lecture de l'inhibition de l'hémagglutination est lue après 60 min d'incubation à 30°C

### 3.5. Effet de la température et du pH sur l'hémagglutination

L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante est déterminé en incubant la fraction active (2ml) dans le bain marie à différentes températures (40, 60, 80 et 100 ° C) pendant 45min. L'activité hémagglutinante est testée après chaque incubation (test d'hémagglutination).

Pour tester l'effet du pH, des échantillons de lectines sont dialysés pendant 24 h à 4°C contre différentes solutions tampons à différents pH [pH=3, pH=5, pH=9, pH=11]

(Annexe 4).

L'activité hémagglutinante est testée pour chaque pH (test d'hémagglutination).

## 4. L'activité antibactérienne de la fraction active

### 4.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Pour chaque bactérie-test, (*Staphylococcus aureus* ATCC 25239, *Staphylococcus aureus* ATCC 35, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 29322) un inoculum est réalisé à partir d'une culture jeune de 18 heures, mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile de telle manière à obtenir une densité optique comprise entre 0,1 à 0,2 pour une longueur d'onde de 620 nm (approximativement  $10^6$  UFC/ml).

Des disques de papier filtre Whatman N°3 stérile de 6mm de diamètre sont préparés en recevant 30 µl, 50 µl et 100 µl de la fraction active et séchés en température ambiante

Des boîtes de Pétri contiennent le milieu Mueller-Hinton sontensemencées par écouvillonnage avec les suspensions des bactéries-test.

Les disques sont déposés dans les boîtes ensemencées à raison de trois disques à concentration de (30 µl, 50 µl et 100 µl) dans chaque boîte. Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque bactérie-test, les boîtes sont laissées 3 heures à 4°C pour favoriser la diffusion

La lecture des résultats est réalisée après 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

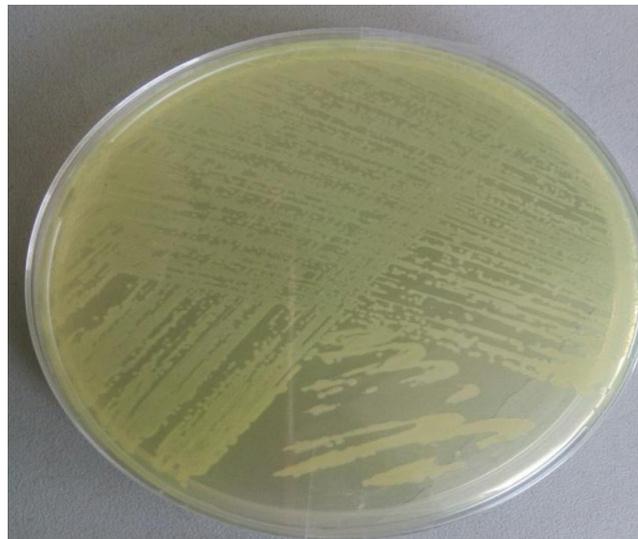
# Résultats et discussions

## Résultats et discussions

### 1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante :

#### 1.1. Fermentation :

Afin de mettre en évidence la production des lectines chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 4**) aussi bien en milieu extracellulaire qu'intracellulaire, deux milieux de cultures ont été choisis : GE (Grelet modifié par Eagon) et un bouillon nutritif (BN). Après incubation de 48 heures, une biomasse importante de *Pseudomonas aeruginosa* a été obtenue en culture dans le bouillon nutritif et dans le bouillon GE.



**Figure4** : culture des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, des milieux de culture influence énormément la capacité de production des lectines, chez de nombreux micro-organismes. Pour cette raison, nous avons testé la production de lectines sur deux milieux de culture favorable pour leur production. D'après [30] le milieu GE est, majoritairement, constitué d'extrait de levure qui favorise l'activité de la PA-I tandis que le bouillon nutritif est fortement riche en peptone et chlorure de sodium et favorise l'activité de la PA-II. Qui sont aussi bien des facteurs sur le plan qualitatif et quantitatif, pour l'obtention de ces glycoprotéines.

De nombreux travaux antérieurs ont montré que les *Pseudomonas aeruginosa* produisent deux types de lectines solubles : PA-IL (ou LecA) et PA-III (ou LecB) et que sont toutes les deux dépendantes de la présence de calcium pour être actives [30,80].

### **1.2. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante des fractions protéiques extraites :**

Après extraction des différentes fractions protéiques, un test d'hémagglutination a été réalisé en utilisant un seul type d'érythrocytes (lapin) pour les deux milieux de cultures.

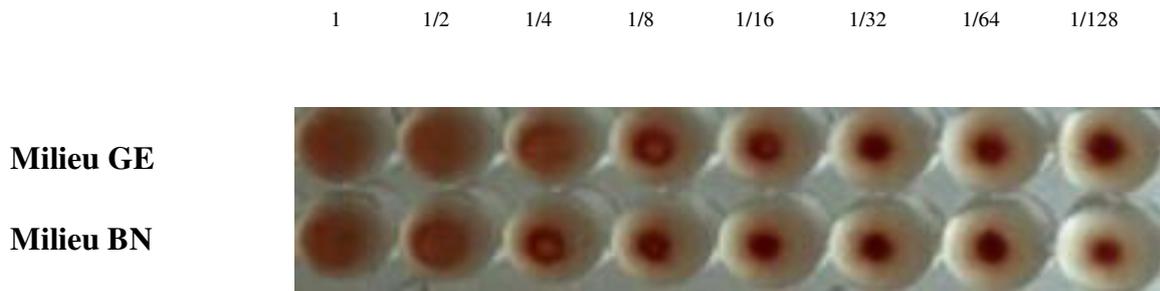
La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation [32 ,64]. Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes.

Ce test repose sur l'observation de l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse et sur la détermination de l'activité hémagglutinante. L'activité hémagglutinante des lectines a été réalisée dans des microplaques de titration.

Après 30 minutes, la lecture des microplaques nous a conduits aux résultats suivants :

Pour l'extrait extracellulaire :

\*\* Les puits agglutinés du milieu BN sont plus nombreux que ceux du milieu GE dont (4 puits montrant une agglutination) sur (12 puits) pour le milieu BN et 3 puits sur 12 pour le milieu GE, soit une limite hémagglutinante de 1/8 pour le premier milieu et de 1/4 pour le deuxième milieu (**Figure 5**)



**Figure 5** : test d'hémagglutination (extrait extracellulaire cultivé sur milieux GE et BN en présence d'érythrocytes de lapin.)

Pour l'extrait intracellulaire :

Les puits agglutinés du milieu GE sont plus nombreux que ceux du milieu BN dont (8 puits montrant une agglutination) sur (12 puits) pour le milieu GE soit une limite hémagglutinante de 1/128. (**Figure 6**)



**Figure 6**: test d'hémagglutination (extrait intracellulaire du milieu GE en présence d'érythrocytes de lapin).

Alors que pour le milieu BN on a observé une faible agglutination soit (3 puits agglutinés) sur 12 équivalents à 1/4 (**Figure 7**)



**Figure 7**: test d'hémagglutination (extrait intracellulaire du milieu BN en présence d'érythrocytes de lapin).

\*\* L'hémagglutination des érythrocytes de lapin se manifeste pour les deux milieux de culture.

Dans cette approche, pour une concentration de départ définie, l'unité d'hémagglutination (UH) est définie comme le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée. De ce fait. Les extraits extracellulaires et intracellulaires obtenus à partir de culture de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu GE et BN ont été testés pour leur activité hémagglutinante.

L'activité hémagglutinante est plus prononcée avec les extraits intracellulaires qu'extracellulaires. En effet, les extraits extracellulaires présentent une faible activité hémagglutinante. Et montrent aussi que l'hémagglutination est prononcée avec le milieu GE que le milieu BN soit 55,41 UH/mg pour le milieu GE comme le montre le tableau 4. Mais il y a une agglutination des érythrocytes de lapin avec tous les extraits. Cette différence d'activité est sûrement due à la teneur en protéines qui est plus faible dans les extraits extracellulaires.

D'après les résultats de notre test, les molécules recherchées sont bien présentes dans les deux milieux de culture et ont interagit avec les érythrocytes de lapin placés dans chacun des puits, en effet l'ajout de lectine permet la formation d'un réseau entre les globules rouges et les lectines qui se manifeste par une suspension gélatineuse homogène, ceci est le signe d'une hémagglutination évidente.

Ces résultats sont concordants avec ceux de [80] qui ont démontré la présence d'activité hémagglutinante dans les extraits protéiques intra et extracellulaires de la souche de *Pseudomonas aeruginos*, la plupart de ces activités ont été observées avec les hématies de rat et de lapin, Ils ont expliqué cette spécificité, par la richesse de la surface des hématies des rongeurs (rat, lapin, et souris) en protéines hautement glycosylées, par rapport aux hématies de type humain.

La meilleure activité a été observée avec l'extrait intracellulaire du milieu GE avec les érythrocytes de lapin. D'où le choix de continuer avec le milieu GE pour les étapes qui suivent.

## 2. Extraction des lectines

Afin d'analyser les hémagglutinines de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, une culture de deux litres sur milieu GE et BN a été réalisée pour l'extraction de la fraction protéique intracellulaire. Dans la littérature, la plupart des lectines sont purifiées en une seule étape sur des colonnes d'affinités couplées à différents ligands saccharidiques [57], notamment (Mannose, fucose, galactose N-acétyl glucosamine (GlcNac), N-acétylgalactosamine (GalNac), et l'acide sialique), ces monosaccharides et leurs dérivés sont les unités typiques des structures d'oligosaccharides sur les surfaces cellulaires, particulièrement celles des érythrocytes. Malheureusement aucune de ces colonnes n'existe au laboratoire.

Il n'existe pas de protocole standardisé pour la purification des lectines, la principale raison pour cela, est l'extrême hétérogénéité fonctionnelle et structurale de ces protéines qui sont généralement constituées de plusieurs sous-unités qui forment des dimères ou des polymères macromoléculaires, en plus de cela, elles peuvent présenter des affinités complexes, qui varient en fonction du pH et de la composition du milieu (présence de glucides, ions métalliques) [85]. La chromatographie d'affinité sur colonnes Sepharose couplées à différents sucres ou glycoprotéines est décrite par plusieurs auteurs comme la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la purification de ces protéines [94,95]. Cependant, cette méthode n'est pas adaptée à tous les types de lectines. Dans certains cas, l'affinité de ces protéines pour leur ligand est tellement forte qu'il est impossible de les purifier par cette méthode sans les dénaturer [60].

Des méthodes de fractionnement plus classiques, comme la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, la chromatographie échangeuse d'ions, et la chromatographie sur gel de filtration sont de bonnes alternatives pour la purification de lectines dont l'affinité est inconnue ou complexe [60].

Dans notre étude et afin de purifier ces molécules nous avons adopté une autre stratégie en utilisant une purification en deux étapes, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-50)

Afin d'analyser ces hémagglutinines, une culture de *Pseudomonas aeruginosa* dans les deux milieux de culture, précédemment décrits, a été réalisée suivie par l'extraction de la fraction protéique intracellulaire selon le protocole décrit par [75].

## 2.1. Précipitation sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium, a permis à ces protéines une rapide précipitation et l'obtention de molécules précipitées à une saturation de 60% [30].

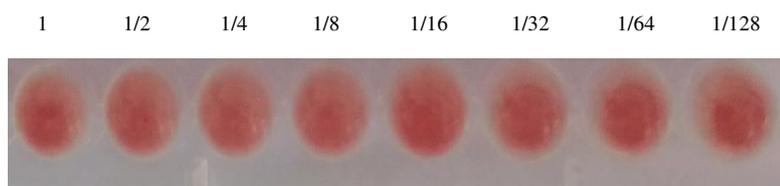
Les protéines sont toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles sont remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de séparer les protéines. Pour cela le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est le sel le plus utilisé, sa solubilisation ne dénature pas les protéines [30].

Cela ne montre toujours pas une absence totale de sulfate d'ammonium. car même après précipitation ces molécules contiennent toujours une grande quantité de sulfate et pour s'en débarrasser une dialyse s'impose.

En effet la dialyse est une technique de séparation basée sur le mouvement des molécules à travers une membrane semi-perméable (Boudin) du milieu plus concentré au moins concentré.

Seules les molécules dont la taille est inférieure au diamètre des pores de la membrane sont capables de diffuser de part et d'autre et d'atteindre l'équilibre avec le volume total de la solution dans le système, telles que celles du solvant, des sels et des petits métabolites. Par contre, les macromolécules comme les protéines ne sont pas diffusables où elles seront retenues dans le même compartiment de la membrane comme au début de l'expérience [85].

Après dialyse un test d'hémagglutination a été réalisé et la **Figure 8** montre le résultat de ce test.



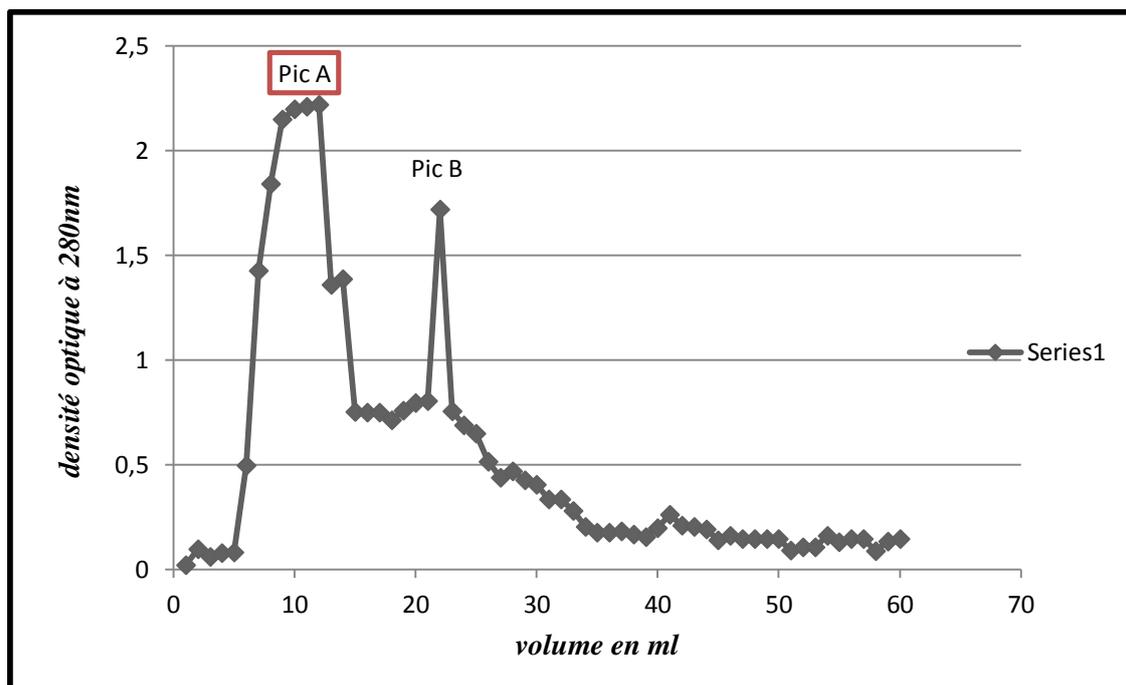
**Figure 8:** test d'hémagglutination (extrait intracellulaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, cultivée sur milieu GE, après dialyse en présence d'érythrocytes de lapin).

## 2.1. Chromatographie sur gel de filtration Sephadex (G-50)

Dans la chromatographie sur gel de filtration, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance hydratée spongiforme dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires.

La phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G-50 (Pharmacia). Le Sephadex G-50 possède un domaine de fractionnement situé entre (5 KDA et 15 KDA).

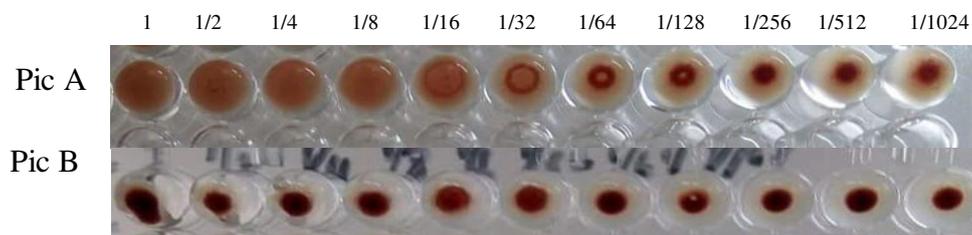
La mesure spectrale, à 280 nm, des fractions récupérées après chromatographie sur gel de filtration G-50 a révélé deux pics : pic A et pic B, ce dernier ne présente aucune activité hémagglutinante. (**Figure 9**)



**Figure 9** : purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de *Pseudomonas aeruginosa*

La figure met en évidence la fraction active après son passage à travers la colonne de la chromatographie. La valeur maximale d'absorbance à 280 nm est observée dans la première fraction qui se situe entre 6 et 16ml.

Pour la confirmation de la présence des lectines un test d'hémagglutination est établi avec toujours les hématies de lapin (**Figure 10**).



**Figure 10:** test d'hémagglutination de pic A et pic B.

Pour le pic A, l'activité spécifique de l'extrait brut est de 55.41 UH/mg, elle passe à 228.57 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium et à 78.04 UH/mg après chromatographie sur gel de filtration G-50. Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 1,40 avec un rendement assez faible de 0.43% (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** caractéristiques des lectines de l'extrait brut après purification préliminaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

Fraction	Volume (mL)	Protéines (mg)	Activité totale (UH) <sup>a</sup>	Activité spécifique (UH/MG) <sup>b</sup>	L'indice de purification <sup>c</sup>	Le rendement (%) <sup>d</sup>
Extrait brut	10.3	2.31	128	55.41	1	100
Sulfate d'ammonium	5	1.12	256	228.57	4.12	1.41
Sephadex G50	2	0.41	32	78.04	1.40	0.43

<sup>a)</sup> Activité hémagglutinante totale (titre). Les hématies de rat ont été utilisées pour ce test. <sup>(b)</sup> L'activité spécifique (UH/mg) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction (mg/mL). <sup>(c)</sup> L'indice de purification est définie comme le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines. <sup>(d)</sup> le rendement c'est le (%) de l'activité totale d'origine qui reste présent dans une fraction considérée.

### 3. Caractérisation des molécules hémagglutinantes de la fraction active.

#### 3.1. Inhibition de l'hémagglutination :

Afin de caractériser l'affinité de la molécule hémagglutinante contenue dans la fraction active pour certains ligands glucidiques et de comprendre les forces d'interaction mises en jeu, un test d'inhibition d'hémagglutination (HIA, Hemagglutination Inhibition Assay) a été réalisé.

Six sucres ont été utilisés (galactose, fucose, N-acétyl glucosamine, mannose, N-acétyl galactosamine, arabinose) et incubés avec la fraction active

Le test d'inhibition d'hémagglutination en présence d'un ligand saccharidique montre que la fraction active a une affinité plus forte pour le galactose et le N-acétyl galactosamine. (Tableau 4) et (Figure 11)

**Galactose**

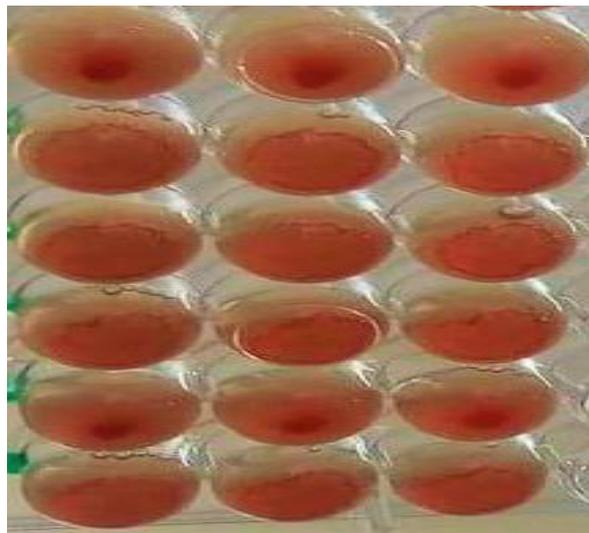
**Fucose**

**N-acétyl glucosamine**

**Mannose**

**N-acétyl galactosamine**

**Arabinose**



**Figure 11:** test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction active.

**Tableau 4** : effet des différents sucres sur l'activité hémagglutinante de la fraction active

Sucres	Inhibition de l'activité hémagglutinante
Galactose	+
Fucose	-
N-acétyle glucosamine	-
Mannose	-
N-acétyle galactosamine	+
Arabinose	-

(+) : présence d'inhibition

(-) : absence d'inhibition

L'affinité de la fraction active à ces deux sucres s'explique par le fait que la plupart des lectines sont des protéines **multivalentes**. D'après [47] les lectines 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 lectines solubles sont par définition toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie, d'origine non immunitaire, se liant spécifiquement à des glucides et ne montrant pas d'activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand [50].

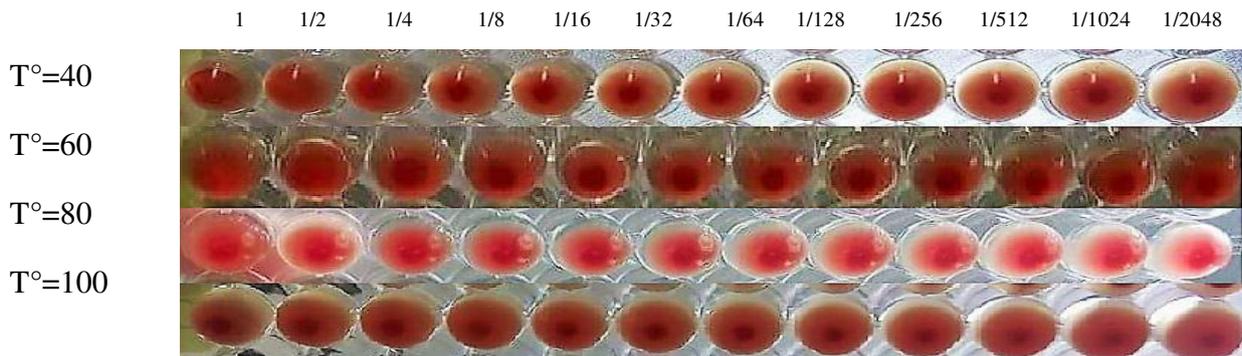
La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* produit deux lectines solubles PA-IL et PA-IIL respectivement spécifiques pour le  $\alpha$ -D-galactose et le  $\alpha$ -L-fucose. Elles présentent des structures tétramériques dont un ou deux ions calcium respectivement sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre [40].

Le PA-IIL, qui est situé dans la membrane externe bactérienne [80], présente une haute spécificité pour le L-fucose et ses dérivés. Cependant, aucune inhibition n'a pu être obtenue avec la co-incubation de D-galactose et PA-IIL. Indiquant que PA-IIL n'a pas de spécificité de chevauchement avec PA-IL [24]. Sur la base de ces données, la lectine de notre fraction active est de type : lectine PA-I.

### 3.2. L'effet du pH et de la température sur la stabilité de l'activité hémagglutinante :

La fraction active (Pic A) a été soumise à différentes températures (40°C, 60°C, 80°C et 100°C) et à différents pH (3, 5, 9 et 11).

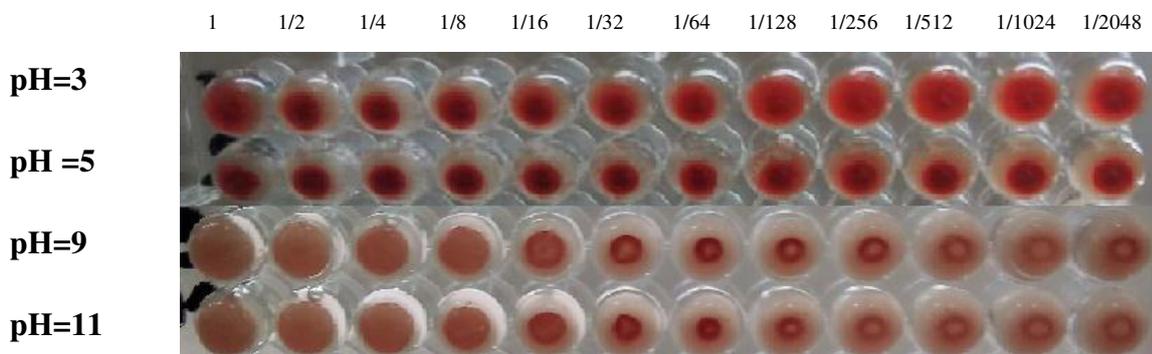
Les résultats du traitement thermique de la fraction active ont permis de conclure que l'activité agglutinante est importante à 40°C et moins importante à 60°C jusqu'à disparaître à 80°C et 100°C (**Figure 12 A**).



**Figure 12(A) :** l'effet des différentes températures sur l'activité hémagglutinante de la fraction active

D'après [60], les lectines bactériennes sont désignées comme étant des protéines thermostables contrairement à la notre qui présente une thermo-stabilité limitée dont l'activité hémagglutinante est conservée pour des températures moyennes.

L'activité hémagglutinante a été considérablement affectée par le pH acide (3 et 5) et se stabilise en allant du pH = 5 au pH=11(pH très alcalin) (**Figure 12 B**)



**Figure 12(B) :** l'effet des différents pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction active

Les lectines de notre cas d'étude, ne fonctionnent pas à des pH acides. Mais restent actives dans une large gamme de pH (de 5 à 11).

En conclusion, la stabilité de l'activité hémagglutinante des lectines, à des pH alcalins, observée chez *Pseudomonas aeruginosa* peut jouer les mêmes fonctions que ses homologues chez les végétaux. En effet, des études ont montré que les lectines végétales jouent un rôle important dans la protection et l'adaptation des plantes à leur milieu (Van Damme *et al.*, 2008).

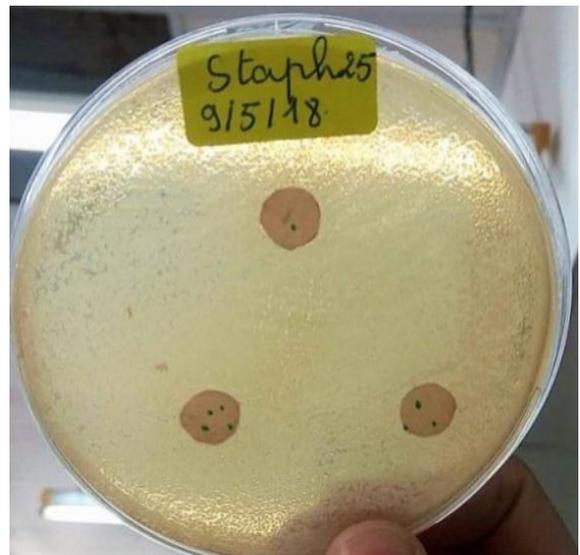
### 3.3. Activité antibactérienne des molécules hémagglutinantes :

L'activité antibactérienne de la fraction active a été testée à des différentes concentrations (30 µl, 50 µl, et 100 µl) sur cinq bactéries de la collection américaine ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 25239, *Staphylococcus aureus* ATCC 35, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 29322) en utilisant la technique de diffusion des disques sur gélose.

Les résultats de ce test n'ont montré aucune activité visible contre les souches bactériennes testées (**Figure13**). Ce qui suggère l'absence de molécules à activité antimicrobienne dans l'extrait.



*Staphylococcus aureus* ATCC 25239



*Staphylococcus aureus* ATCC 35



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC



*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



*Escherichia coli* ATCC 29322

**Figure 13:** test d'activité antibactérienne de la fraction active sur quelques souches de la gamme ATCC

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspective

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont commencé à s'intéresser à la lectine vu leur rôle leur grande importance et leur abondance dans tous les microorganismes.

A l'issue de ce travail nous nous sommes intéressés à la mise en évidence, extraction, et purification des lectines chez *Pseudomonas aeruginosa* et ces dernières nous ont conduit à une activité hémagglutinante évidente.

-Nous avons choisi comme souche *Pseudomonas aeruginosa* pour sa capacité à produire des lectines solubles que nous avons obtenues après le test d'hémagglutination en présence d'érythrocytes de lapin.

-Ce test a révélé une activité hémagglutinante aussi bien sur le bouillon nutritif que sur le milieu GE, en plus d'un résultat positif l'activité est aussi présente et plus prononcée dans les extraits intracellulaires qu'extracellulaires sur les deux milieux sachant que l'agglutination sur le GE est plus favorable que sur le bouillon nutritif en extrait intracellulaire.

- la purification de notre extrait, nous a permis l'obtention de deux pics (pic A, pic B) suite à une chromatographie sur gel de filtration Sephadex (G -50). Seule la fraction protéique du (pic A) a été regroupée puis testée avec les érythrocytes de lapin. Ce test a révélé la présence d'une agglutination.

-le test d'inhibition d'hémagglutination, montre un effet positif sur deux sucres (le galactose et le N-acetylgalactosamine) ce résultat confirme que notre lectine a une affinité avec le galactose et ses dérivés et nous révèle que la molécule présente dans notre extrait est la lectine PA-I.

- les lectines bactériennes sont désignées comme étant des protéines thermostables d'après [60], contrairement à la lectine obtenue dans notre travail celle-ci présente une thermo-stabilité limitée dont l'activité hémagglutinante est conservée pour des températures moyennes.

L'activité hémagglutinante par rapport au pH a connu une instabilité vis-à-vis des pH 3 et 5 en comparaison avec les deux autres Ph testés ou l'activité a commencé à se stabiliser en allant du pH = 5 au pH=11 (pH très alcalin).

L'étude de l'activité antibactérienne n'a donné aucun résultat vis-à-vis des souches bactériennes testées. Ceci est probablement dû à l'absence d'activité antibactérienne dans la fraction active envers les bactéries testées

Comme perspectives et dans l'immédiat, il est nécessaire :

- de s'intéresser aux lectines des bactéries
- d'utiliser d'autres milieux de fermentation et d'optimiser les propriétés physico-chimique de la production de lectines, notamment pour l'obtention d'extraits extracellulaires plus riches en protéines,
- d'améliorer l'extraction des protéines en utilisant des méthodes plus douces,
- de varier les types de chromatographies, de leurs gels et des différents tampons d'élution pour une meilleure séparation,
- de multiplier les ligands pour une meilleure purification des lectines,
- d'analyser structurellement les lectines purifiées,
- d'étudier l'activité antivirale et immunomodulatrice des lectines pures

# **Référence bibliographiques**

**Références bibliographiques**

1. 116.pdf.
2. BOU6904.pdf.
3. YETERIAN\_Emilie\_2010r.pdf.
4. Alencar, N. M. N. *et al.* 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 (2005).
5. Barbosa, T. *et al.* In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 673–678 (2001).
6. Bardy, S. L., Ng, S. Y. M. & Jarrell, K. F. Prokaryotic motility structures. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 295–304 (2003).
7. Beisel, H. G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R. & Bode, W. Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *EMBO J.* 18, 2313–2322 (1999).
8. Benabid, R., Belaouaj, A. & Université de Reims Champagne-Ardenne. *Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à Pseudomonas aeruginosa.* (s.n., 2009).
9. Boyd, W. C. & Shapleigh, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 119, 419 (1954).
10. Boyd, W. C. & Shapleigh, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 119, 419 (1954).

11. CARPENTIER. Infections à bacille pyocyanique. *EM-Consulte* (2003). Available at: <http://www.em-consulte.com/article/18578>. (Accessed: 17th June 2018)
12. Chrispeels, M. J. & Raikhel, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**, 1–9 (1991).
13. Crocker, P. R. & Zhang, J. New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics. *Biochem. Soc. Symp.* 83–94 (2002).
14. Damme, E. J. M. V., Peumans, W. J., Barre, A. & Rougé, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**, 575–692 (1998).
15. DELARRAS. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire (En 2 tomes) DELARRAS Camille. (2007). Available at: <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/microbiologie-pratique-pour-le-laboratoire-d-analyses-ou-de-controle-sanitaire/delarras/descriptif-9782743009458>. (Accessed: 17th June 2018)
16. DELARRAS. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire (En 2 tomes) DELARRAS Camille. (2007). Available at: <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/microbiologie-pratique-pour-le-laboratoire-d-analyses-ou-de-controle-sanitaire/delarras/descriptif-9782743009458>. (Accessed: 17th June 2018)
17. Delatorre, P. *et al.* 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 (2006).
18. Denis, F. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. (Elsevier Masson, 2007).
19. Dodson, K. W. *et al.* Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**, 733–743 (2001).
20. Drickamer, K. A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* **3**, 2–3 (1993).
21. Edelman, G. M. *et al.* The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2580–2584 (1972).
22. Emsley, J. *et al.* Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* **367**, 338–345 (1994).
23. FLANDROIS. Bactériologie médicale - Jean-Pierre FLANDROIS, Collectif - 9782729705671 Presses universitaires de Lyon, Azay Bactériologie - Virologie. (1997). Available at:

- [https://www.unitheque.com/Livre/presses\\_universitaires\\_de\\_lyon/Azay/Bacteriologie\\_medicale-43114.html](https://www.unitheque.com/Livre/presses_universitaires_de_lyon/Azay/Bacteriologie_medicale-43114.html). (Accessed: 17th June 2018)
24. Garlatti, V. *et al.* Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J.* **26**, 623–633 (2007).
  25. Genbacev, O. D. *et al.* Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* **299**, 405–408 (2003).
  26. Gerlach, D., Wagner, M., Schlott, B., Zähringer, U. & Schmidt, K.-H. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**, 61–68 (2002).
  27. Gilboa-Garber, N. Pseudomonas aeruginosa lectins. *Meth. Enzymol.* **83**, 378–385 (1982).
  28. Gilboa-Garber, N. Pseudomonas aeruginosa Lectins as a Model for Lectin Production, Properties, Applications and Functions. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* **270**, 3–15 (1988).
  29. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. What should be called a lectin? *Nature* (1980). doi:10.1038/285066b0
  30. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. What should be called a lectin? *Nature* (1980). doi:10.1038/285066b0
  31. Gourdine, J.-P. *et al.* High Affinity Interaction between a Bivalve C-type Lectin and a Biantennary Complex-type N-Glycan Revealed by Crystallography and Microcalorimetry. *J Biol Chem* **283**, 30112–30120 (2008).
  32. Guillot, J. *et al.* [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. *Bull Cancer* **91**, 141–158 (2004).
  33. Hahn, H. P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**, 99–108 (1997).
  34. Hirabayashi, J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.* **21**, 35–40 (2004).
  35. Imberty, A., Mitchell, E. P. & Wimmerová, M. Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 525–534 (2005).
  36. Imberty, A. & Varrot, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 567–576 (2008).
  37. Imberty, A., wimmerová, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221–228 (2004).

38. Imberty, A., wimmerová, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221–228 (2004).
39. Jaff, I. E. Toxic constituents of plant foodstuffs. *Proc Nutr Soc* **29**, 56–57 (1980).
40. Kairies, N. *et al.* The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13519–13524 (2001).
41. Kenoth, R., Raghunath Reddy, D., Maiya, B. G. & Swamy, M. J. Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichosanthes cucumerina* seed lectin. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5541–5549 (2001).
42. Kipnis, E. *et al.* Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock* **21**, 444–451 (2004).
43. Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechère, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**, 5990–5996 (2000).
44. Lam, M. Y. *et al.* Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 962–967 (1989).
45. Lee, Y. C. & Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research* **28**, 321–327 (1995).
46. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* **19**, 433–440 (2004).
47. Leonidas, D. D. *et al.* Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* **37**, 13930–13940 (1998).
48. Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674 (1998).
49. Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674 (1998).
50. Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 9–36 (1998).
51. Merritt, E. A. *et al.* Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* **3**, 166–175 (1994).
52. Mesaros, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 560–578 (2007).
53. Miyoshi, M. *et al.* The lethal protein from Kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as

- a lectin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **28**, 255–264 (1982).
54. Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C. & Holder, I. A. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun* **38**, 1296–1298 (1982).
55. Murdock, L. L. & Shade, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6605–6611 (2002).
56. Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109**, 347–352 (1995).
57. Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109**, 347–352 (1995).
58. Podgorskiĭ, V. S., Kovalenko, É. A., Karpova, I. S., Sashchuk, E. V. & Get'man, E. I. [Extracellular lectins from saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review)]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **50**, 256–263 (1992).
59. Poget, S. F. *et al.* The structure of a tunicate C-type lectin from *polyandrocarpa misakiensis* complexed with d-galactose<sup>11</sup>Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology* **290**, 867–879 (1999).
60. Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M. & Kim, J. J. Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* **93**, 639–648 (1998).
61. Rüdiger, H. Isolation of Plant Lectins. in *Lectins and Glycobiology* 31–46 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1993). doi:10.1007/978-3-642-77944-2\_4
62. Rüdiger, H. Isolation of Plant Lectins. in *Lectins and Glycobiology* 31–46 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1993). doi:10.1007/978-3-642-77944-2\_4
63. Rüdiger, H. & Gabius, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* **18**, 589–613 (2001).
64. Rutenber, E. *et al.* Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins* **10**, 240–250 (1991).
65. Sadoff, J. C. & Artenstein, M. S. The Outer Cell-Wall Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130**, S81–S93 (1974).
66. Sanchez, J.-F. *et al.* Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol. Chem.* **281**, 20171–20180 (2006).
67. Sankaranarayanan, R. *et al.* A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596–603 (1996).
68. Schrag, J. D. *et al.* The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control

- of protein folding. *Mol. Cell* **8**, 633–644 (2001).
69. Sharon, N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **408**, 1–8 (1996).
70. Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* **282**, 2753–2764 (2007).
71. Sharon, N. & Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R-62R (2004).
72. SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G. Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.
73. Singh, J., Ahluwalia, J., Kamboj, S. S. & Singh, S. Occurrence and characterization of lectins in actinomycetes. *Journal of Basic Microbiology* **33**, 207–211
74. Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M. & Surolia, A. Subunit assembly of plant lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 498–505 (2007).
75. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–479 (2000).
76. Sugawara, H. *et al.* Characteristic Recognition of N-Acetylgalactosamine by an Invertebrate C-type Lectin, CEL-I, Revealed by X-ray Crystallographic Analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 45219–45225 (2004).
77. Suzuki, R. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the C-terminal domain of galactose-binding lectin EW29 from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1895–1896 (2004).
78. Tielker, D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 1313–1323 (2005).
79. Tielker, D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 1313–1323 (2005).
80. Töpfer-Petersen, E. *et al.* Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**, 217–224 (1998).
81. Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. & Saper, M. A. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nature Structural*

- Biology* **4**, 779–783 (1997).
82. Uchida, T. *et al.* Crystal Structure of the Hemolytic Lectin CEL-III Isolated from the Marine Invertebrate *Cucumaria echinata* IMPLICATIONS OF DOMAIN STRUCTURE FOR ITS MEMBRANE PORE-FORMATION MECHANISM. *J. Biol. Chem.* **279**, 37133–37141 (2004).
83. Van Damme, E. J. M. History of plant lectin research. *Methods Mol. Biol.* **1200**, 3–13 (2008).
84. Wall, D. & Kaiser, D. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* **32**, 1–10 (1999).
85. Wang, H. & Ng, T. B. Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 143–146 (1998).
86. Weis, W. I., Brünger, A. T., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J. Mol. Biol.* **212**, 737–761 (1990).
87. Wright, C. S. Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* **141**, 267–291 (1980).
88. Wright, C. S. & Hester, G. The 2.0 Å structure of a cross-linked complex between snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding modes. *Structure* **4**, 1339–1352 (1996).
89. Yamada, Y. & Aketa, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 220–226 (1982).
90. Yu, X. Q. & Kanost, M. R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 37373–37381 (2000).

# **Annexes**

# Annexe 1

## Milieux de culture

### Milieu LB (Luria Bertani)

Tryptone .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Na Cl.....	10g
Eau distillé .....	1000 ml

pH=7.5

### Milieu GN (Gélose Nutritive)

Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure .....	2.5g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium .....	5g
Agar.....	15g
Eau distillé .....	1000ml

pH=7

### Milieu BN (Bouillon Nutritif)

Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure .....	2.5g
Peptone .....	5g
Chlorure de sodium .....	5g
Eau distillé .....	1000ml

pH=7

### Milieu GE (Gralet modifié selon Eagon)

KNO <sub>3</sub> .....	10g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.174g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	6.8g
MgSO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O) .....	0.123g

CaCl <sub>2</sub> (4H <sub>2</sub> O) .....	0.183g
MnSO <sub>4</sub> (4H <sub>2</sub> O) .....	2.23mg
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	20mg
ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	14,4mg
KOH .....	0,33g
Extrait de levure .....	4g
Eau distillé .....	1000ml

## Annexe 2

### Solutions

#### Tampon PBS

Na Cl (137mmol).....	8g
K Cl (2.7mmol) .....	0.2g
Na HPO <sub>4</sub> (10mmol) .....	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.76mmol) .....	0.24g
Eau distillé .....	1000ml

pH=7.4

#### Tampon Glycine-HCl (pH=3) :

Glycine-HCl (1mol).....	200ml
Eau distillé .....	800ml

Ajuster avec HCl pure jusqu'à avoir ph = 3

#### Tampon acétate (pH=5)

Solution (A)

Acide acétique .....	0.58ml
Eau distillé .....	100ml

Solution (B)

Acétate de sodium tri-hydraté.....	1.36g
Eau distillé .....	100ml

Pour 1litre :

Solution (A).....	14.8ml
Solution (B).....	35.2ml

Compléter avec l'eau distillée à 1000 ml

#### Tampon Glycine-NaOH (pH=9)

Glycine-NaOH (1mol).....	200ml
Eau distillé .....	800ml

Ajuster avec NaOH jusqu'à avoir pH=9

#### Tampon Glycine-NaOH (pH=11)

Glycine-NaOH (1mol).....	200ml
Eau distillé .....	800ml

Ajuster avec NaOH jusqu'à avoir pH=11

## **Annexe 3**

### **Suspension**

#### **Suspension d'hématies à 4%**

- Le prélèvement est centrifugé à 3000g pendant 10 min.
- Les culots d'hématies sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique (centrifuger 5min à 1200 g).
- Une suspension d'hématies à 4% v/v dans la solution saline à 150 mM (4ml du culot dans 96ml d'eau physiologique)
- Cette suspension peut être conservée jusqu'à cinq jours à 4C.

## Annexe 4

### Dosage des protéines (Bradford 1976)

#### Composition du réactif de Bradford

Bleu de comassie.....100mg

Ethanol absolu .....50ml

Acide Ortho-phosphorique .....100ml

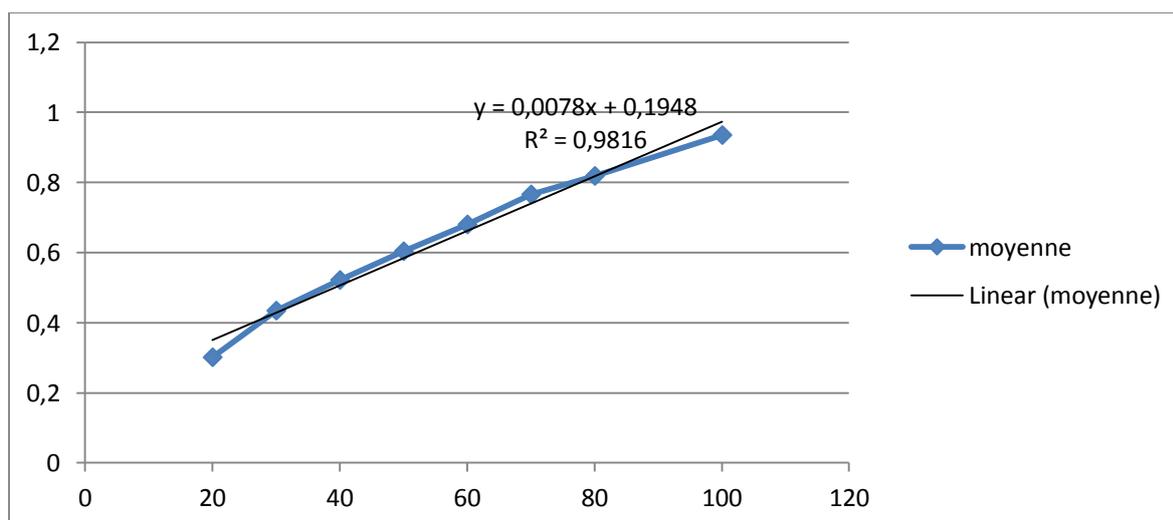
Compléter à 1000ml avec l'eau distillée

Filtrer 2 fois avec le papier de filtration

Conservation à 4°C à l'abri de la lumière pendant 3 à 4 semaines

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de BSA de 1mg/ml (10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 100 microlitre) ajuster à un volume final de 100 microlitre. Ajouter 4ml de réactif de Bradford et laisser agir pendant 15 min à température ambiante. Le principe de cette méthode est basé sur le changement d'absorbance dans une longueur d'onde de 595nm se manifestant par le changement de couleur du bleu de coomassie après liaison aux protéines.

#### La courbe d'étalonnage



## Annexe 5

### Précipitation au sulfate d'ammonium

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

**THÈME : MISE EN ÉVIDENCE DES LECTINES PRODUITES  
PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

**Résumé**

Les lectines sont présentes dans tous les organismes vivants et sont utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Actuellement, les lectines microbiennes suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leurs diverses activités biologiques.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* conservée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine « Ibn Badis », a été utilisée afin de mettre en évidence la production des lectines de les caractériser de les purifier et d'étudier leur activité antibactérienne. La souche a été cultivée sur deux milieux liquides (BN et GE). Le pouvoir agglutinant des extraits extracellulaire et intracellulaire des deux milieux de culture est mis en évidence en présence d'un seul type d'érythrocytes de lapins.

Les deux extraits (intracellulaires et extracellulaires) de *Pseudomonas aeruginosa*, quel que soit le milieu, ont agglutiné. La plus forte agglutination a été obtenue avec l'extrait intracellulaire en présence d'érythrocytes de lapins avec le milieu GE. Cette dernière a été retenue. Pour purification et l'activité antibactérienne

Les lectines, de la fraction intracellulaire de la souche *Pseudomonas aeruginosa* a subi une première purification primaire par du sulfate d'ammonium à 60% et filtration sur gel G-50. La précipitation différentielle a montré une activité hémagglutinante de 228,57UM/mg. Après filtration, deux pics ont été observés (pics A et B) le pic A présente une activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 55,41 UH/mg, et 228,57 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 78,04UH/mg (picA), après filtration sur gel G-50. L'activité hémagglutinante de cette fraction persiste à des pH alcalins et montre une stabilité à des températures moyennes.

L'activité antibactérienne de la fraction active a été testée sur 5 bactéries tests de la gamme ATCC avec trois différentes concentrations mais celle la n'a montré aucune activité antibactérienne visible.

**Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, lectine, glycoprotéines, agglutination, purification, chromatographie.****Laboratoire de recherche : laboratoire de génie microbiologique et applications**

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** NECIB Yousef**Rapporteur :** BOULAHROUF Khaled**Examineur :** OULMI Lamia

Pr. Université Freres Mentouri Constantine

MA. Université Freres Mentouri Constantine

MC.B Université Freres Mentouri Constantine

**Date de soutenance : 26/06/2018**