



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire: قسم البيولوجيا و الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلية و الجزيئية
et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Intitulé :

**Purification et caractérisation partielles et effet anti-inflammatoire des lectines
extraites du champignon**

« *Agrocybe Aegerita* »

Présenté et soutenu par : *Ghomrani Manel*

Le : 03/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr Necib.Y

Professeur - UFM Constantine.

Encadreur : Mr Zitouni.A

Maitre de Conférence UFM Constantine

Examineurs : Mr *Hafi.A*

Maitre-Assistant. UFM Constantine

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant de m'avoir donné force, volonté, et patience qui m'ont permis d'achever cette modeste étude.

J'aimerais transmettre mes sincères remerciements et ma haute considération à :

En premier lieu : Monsieur Zitouni, mon encadreur que je remercie chaleureusement pour son sincère dévouement et à qui je dois toute ma reconnaissance et ma considération pour sa disponibilité, sa patience, son aide durant toute la période de ce travail et surtout son soutien professionnel et moral envers ma personne.

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

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury, le Professeur Necib Youcef, le Docteur Hafi Ammar pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant de présider et d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Mes remerciements s'étendent également à Monsieur Toumi Seddik-eddine pour m'avoir accordé de son temps, sa gentillesse et surtout de son savoir ainsi que ses précieux conseils qu'il m'a prodigué et son orientation ficelée tout au long de ma recherche.

Au Docteur Inès Bellil qui nous a encadré et permis de réaliser au sein de son laboratoire une technique d'électrophorèse, sans oublier également Monsieur Belbekri Nadir qui à toujours répondu présent quand on le sollicite.

A monsieur Bahri également pour son aide précieuse à l'animalerie.

Enfin je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ce travail.

Merci

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- ✓ A mes parents, ma raison de vivre, qui m'ont tant donné sans relâche, et sans lassitude depuis mon parcours d'étudiante à universitaire en me soutenant moralement et me prodiguant le courage dans mes travaux.

Ma mère pour qui je me dois la vie qui représente pour moi le Symbole de la bonté par excellence et la source de tendresse.

Mon cher papa qui m'a toujours poussé vers l'avant durant tout mon parcours d'études et pour qui, rien au monde ne vaut les efforts qu'il a fourni jour et Nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour moi.

Merci d'avoir été toujours là, pour moi.

- ✓ A mon seul et unique frère «Amine » qui m'a toujours soutenu et cru en moi, qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de courage et de générosité.
 - ✓ A mon fiancé « Zinou » pour sa présence à mes côtés, son soutien, ses conseils et pour l'attention qu'il m'apporte ; qui m'a toujours encouragé et poussé vers l'avant en supportant mes sauts d'humeur.
 - ✓ A mes chers collègues Oumeima et Khawla, en témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de Tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie Ce travail et je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.
 - ✓ A toutes mes amies (Ikram,Atfa,Sawssan,Rania) pour leur sincères dévouements à résoudre certains de mes soucis et pour leurs encouragements.
 - ✓ A toute ma famille et tous ceux qui ont participé de près et de loin à mon succès
- A tous ceux-là, je voudrais exprimer haut et fort, et en toute âme et conscience, ma gratitude et mes remerciements pour leur soutien permanent et infini.

Merci beaucoup,

Manel

Résumé

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, multivalentes de nature non-immunitaires qui sont capables de reconnaître et se lier spécifiquement et de manière réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexes sans modifier la structure covalente des ligands glycosylés reconnus, qui provoquent dans certains cas l'agglutination des érythrocytes.

Les champignons y compris les moisissures appartiennent à une division importante d'organismes et elles présentent un large éventail d'activités biologiques importantes pour le fonctionnement de la cellule et de l'organisme entier, et en raison de la haute spécificité de la liaison réversible aux hydrates de carbone, elles sont des outils précieux largement utilisés en biologie et en médecine et aussi en diverses applications biotechnologiques.

Ici, nous passons en revue et analysons avec une caractérisation partielle ce qui est actuellement connu sur les lectines isolées à partir du champignon « *AgrocybeAegerita* » dit Pholiote du peuplier, y compris leur localisation, leurs propriétés et leurs spécificités glucidiques.

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, leur thermo-stabilité et leurs interactions et affinités avec les sucres. Elles ont ensuite été partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur gel d'exclusion. La pureté de la lectine ensuite a été vérifiée par une (SDS-PAGE) dans des conditions dénaturantes.

Les effets anti-inflammatoires du champignon « *AgrocybeAegerita* » ont été évalués sur les rats wistar de poids allant de 200 à 220 grammes.

L'extrait brut du champignon est administré par voie intra péritonéale 30 minutes avant l'induction de l'inflammation (l'œdème du pied) par 0.1ml de formaldéhyde à 2%, la drogue de référence est un anti-inflammatoire le 'Diclofenac' 25mg.

Mots Clés : Lectines ; affinité ; Agglutination ; Purification.

ملخص

اللكتينات عبارة عن بروتينات متعددة الوجود أو جلايكوبروتينات ذات طبيعة غير مناعية قادرة على التعرف على الكربوهيدرات المعقدة من الكربوهيدرات المعقدة على نحو محدد وقابل للانعكاس، دون تغيير البنية التساهمية لرابطات الغليكوزيلات المعترف بها، والتي تسبب في بعض الحالات تراص الكريات الحمراء

تنتمي الفطريات بما في ذلك القوالب إلى تقسيم رئيسي للكائنات الحية وتعرض مجموعة واسعة من الأنشطة الحيوية المهمة للخلية ووظيفة الكائن الحي، وبسبب خصوصية عالية للارتباط القابل للعكس للكائنات. الكربوهيدرات، فهي أدوات قيمة تستخدم على نطاق واسع في علم الأحياء والطب وأيضا في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية المختلفة

هنا، نستعرض ونحلل بالتوصيف الجزئي ما هو معروف حاليًا عن الكرياتين « **Agrocybe Aegerita** » المعزولة من الفطر بما في ذلك خصائصها وموقعها وخصائصها الكربوهيدراتية

تم استخراج هذه البروتينات واخضاعها لعدة اختبارات من أجل البحث عن نشاط هيماتوغوتينيتي ، للإبلاغ عن pH ثباتها الحراري وتفاعلاتها وصلاتها مع السكريات. ثم تم تنقيتها جزئياً باستخدام كروماتوجرافيا الجل المستبعدة. ثم تم فحص نقاء اللقاح تحت ظروف غير طبيعية

تم تقييم الآثار المضادة للالتهابات من الفطريات "AgrocybeAegerita" على الفئران wistar وزن 200 حتي 220 غرام.

يتم إعطاء المستخلص الخام من الفطر البريتوني قبل 30 دقيقة من تحريض الالتهاب (وذمة القدم) بنسبة 0.1 مل من الفورمالدهيد بنسبة 2٪ ، والمخدر هو مضاد للالتهاب.Diclofenac"25mg

تقارب-تكتل اللكتينات-:الكلمات المفتاحية

Abstract

Lectins are multivalent ubiquitous proteins or glycoproteins of non-immune nature that are capable of specifically and reversibly recognizing and binding to carbohydrate moieties of complex carbohydrates without altering the covalent structure of recognized glycosylated ligands, which cause in some cases the agglutination of erythrocytes.

Fungi including molds belong to a major division of organisms and exhibit a wide range of biological activities important for cell and whole organism function, and because of the high specificity of reversible binding to organisms. Carbohydrates, they are valuable tools widely used in biology and medicine and also in various biotechnological applications.

Here, we review and analyze with partial characterization what is currently known about lectins isolated from the poplar "Phytee AgrocybeAegerita" fungus, including their location, properties and carbohydrate specificities.

These proteins were extracted and subjected to several tests in order to look for a haemagglutinate activity, to report their pHi, their thermo-stability and their interactions and affinities with the sugars. They were then partially purified using exclusion gel chromatography. The purity of the lectin was then checked by SDS-PAGE under denaturing conditions.

The anti-inflammatory effects of the "AgrocybeAegerita" fungus were evaluated on wistar rats weighing from 200 to 220 grams.

The crude extract of the fungus is administered intraperitoneally 30 minutes before the induction of inflammation (edema of the foot) by 0.1ml of formaldehyde at 2%, the reference drug is an anti-inflammatory the " Diclofenac"25mg.

Key Words: Lectins; affinity; Agglutination; Purification

Sommaire

I. Introduction.....	12
➤ Objectif de notre travail	13
II. Généralités sur les lectines	
1. Définition	15
2. Historique.....	16
3. Structure des lectines.....	18
3.1 Les lectines simples.....	18
3.2 Les lectines en mosaïque.....	19
3.3 Les assemblages macromoléculaires.....	20
3.4 Structure tridimensionnelle.....	20
4. Spécificité des lectines.....	20
➤ Le site de reconnaissance	21
5. Distribution des lectines dans le monde vivant.....	21
5.1 Les lectines présentes chez les plantes.....	22
1. Selon la spécificité osidique.....	23
2. Selon la structure quaternaire.....	24
a. Les mérolectines.....	24
b. Les hololectines.....	24
c. Les chimérolectines	24
d. Les superlectines.....	24
5.2 Les lectines des microorganismes.....	25
a. Les lectines bactériennes.....	25
b. Les lectines fongiques.....	25

c. Les toxines.....	26
d. Les lectines solubles.....	26
5.3 Les lectines de champignons.....	27
a. Caractéristiques.....	28
b. Rôles.....	28
5.4 Les lectines animales.....	28
a. Les lectines intracellulaires.....	29
b. Les lectines extracellulaires.....	29
6. Les propriétés des lectines.....	29
6.1 Les propriétés biologiques des lectines.....	29
1. Liaisons avec les sucres.....	29
2. L'agglutination cellulaire.....	29
3. L'activité mitogène.....	29
6.2 Les propriétés médicinales des lectines.....	29
1. Propriétés antivirales.....	30
2. Propriétés anticancéreuses.....	30
3. Propriétés antibactériennes.....	30
4. Propriétés antifongiques.....	30
5. Propriétés immunomodulatrice.....	30
6. Autres propriétés.....	30
7. Les utilisations et les applications des lectines.....	31
III. Généralités sur le champignon « <i>Agrocybe Aegerita</i> »	
1- Généralités sur « L'Agrocybe Aegerita ».....	34
2- Définition de « L'Agrocybe Aegerita ».....	35
3- Historique.....	35

4- Classification scientifique du Pholiote du peuplier.....	35
5- Morphologie, reproduction et développement.....	35
6- Culture.....	37
7- Fructification « d'Agrocybe Aegerita » sur copeaux de hêtre	37
8- Propriétés médicinales	
IV. Matériels et Méthodes	
1-Récolte du champignon.....	40
1.1Lavage.....	40
1.2Séchage.....	40
1.3 Concassage et broyage.....	40
2- Extraction et fractionnement des protéines.....	41
3-dosage des protéines.....	42
4-Tests d'héماغglutination.....	42
➤ Préparation des hématies à 3%.....	43
➤ Réalisation du test d'héماغglutination.....	43
➤ Test de la limite d'héماغglutination.....	43
➤ Effet de la température sur l'agglutination.....	44
➤ Effet de la température sur la limité d'héماغglutination.....	44
➤ Test d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines ...	44
➤ test de la limite d'héماغglutination.....	44
➤ tests d'inhibition de l'héماغglutination	44
➤ Test de la limite d'inhibition de l'héماغglutination par des saccharides et des glycoprotéines.....	46
5- Précipitation au sulfate d'ammonium.....	46
➤ Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.....	46
➤ Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammoniu.....	47
6-Dialyse.....	47
➤ Méthode.....	47

7-L'effet du pH sur l'agglutination :	48
➤ Limite d'agglutination après effet du pH.....	48
8-Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50.....	48
➤ La préparation de la colonne de Sephadex G50.....	49
➤ TEST D'HEMAGGLUTININ APRES COLONNE	49
9-Concentration des protéines.....	49
10-La lyophilisation.....	50
11-Electrophorèse SDS-PAGE.....	50
12-ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON	
« AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR :	51
12-1-Matériels biologiques et conditions d'élevage	51
12-2- L'induction de l'inflammation par le formaldéhyde	52
V. Résultats et discussions	
1-Dosage des protéines.....	58
2-Résultats des tests d'hémagglutination.....	58
➤ Résultat du test de la limite d'hémagglutination.....	59
➤ Résultats du test de l'effet de la température sur l'hémagglutination.....	60
➤ Résultat du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination.....	61
➤ Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et glycoprotéines	63
➤ Résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine.....	65
3-Résultats après précipitation au sulfate d'ammonium.....	68
4-Résultats de la dialyse de la fraction active (40-80%).....	68
5-Résultats de la purification des protéines par Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50.....	69

➤ Test d'hémagglutination après chromatographie.....	70
6-Résultat de l'effet du pH sur l'hémagglutination.....	72
7-Résultats de la Concentration des protéines.....	74
8-Résultats de la lyophilisation	74
9-Résultats SDS-PAGE.....	75
10-RESULTATS DE L'ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR :.....	78
➤ Analyses statistiques.....	79
➤ Criblage de l'activité anti-inflammatoire	80
VI- Conclusions générales.....	82
➤ Perspectives.....	83
Références bibliographiques.....	84
Annexes.....	91

Liste des figures

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

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

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

Figure 4 : L-Fucose dans le site de liaison de la lectine PA-III (Gianluca, 2006).

Figure 5 : Tétramère de la protéine ConM de « *Canavaliamaritima* » complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorreet *al.*, 2006).

Figure 6 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH complexé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)

Figure 7 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)

Figure 8 : Champignon « *Agrocybe Aegerita* »

Figure 9 : Pholiote du Peuplier (Photo : Atlas des champignons)

Figure 10 : Chapeau d'*Agrocybe Aegerita* (mycorance.free.fr)

Figure 11 : Pied d'*Agrocybe Aegerita* (mycorance.free.fr)

Figure 12 : Culture de l'*Agrocybe aegerita* (Black Poplar Mushroom; Live Culture by World Seed Supply)

Figure 13 : Primordial d'*Agrocybe aegerita*

Figure 14 : Empreinte de spores d'*Agrocybe aegerita* (Champignons comestibles 2018/WordPress & Thème Graphene)

Figure 15 : *Agrocybe frais*

Figure 16 : *Agrocybe sec*

Figure 17 : Broyage par l'azote liquide

Figure 18 : Poudre d'*Agrocybe Aegerita*

Figure 19 : Schéma d'extraction des lectines à partir de la Poudre du champignon « *Agrocybe Aegerita* »

Figure 20 : Pompe à vide utilisée pour la filtration

Figure 21 : Membrane dialyse

Figure22 : Dialyse á froid sous agitation

Figure23 : Membrane de Dialyse

Figure24 : Dialyse du test du Ph

Figure 25 : Tube concentrateur des protéines

Figure26 : Rats Wistar utilisés

Figure27 : injection intra-péritonéale des rats

Figure28 : injection dans l'aponévrose plantaire des rats

Figure29 : Mesure de l'œdème du pied du rat

Figure 30 : Courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction du volume d'éluion des différentes fractions protéiques

Figure 31 : Résultats de la concentration des protéines

Figure 32 : Poudre obtenue après lyophilisation

Figure33 : profil électrophorétique de quatre autres échantillons dans des conditions dénaturantes

Figure34 : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes d'Agrocybe Aegerita

Figure 35 : histogramme de l'évolution de volume de l'œdème en fonction du temps

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques lectines importantes sont énumérées dans le

Tableau 2 : Historique et propriétés des lectines les plus connues (Renato DE A, Moreira. 1991).

Tableau 3 : Quelques structures tridimensionnelles des lectines (Karoline S.A, 2008)

Tableau 4 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato *et coll.*, 1991).

Tableau 5 : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme *et al.* 1998).

Tableau 6 : Lectines bactériennes solubles

Tableau7 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)

Tableau8 : Domaines d'applications des lectines

Tableau9 : classification scientifique de l'Agrocybe Aegerita

Tableau 10 : Tableau des saccharides et glycoprotéines du test d'inhibition de l'hémagglutination

Tableau 11 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al.*, 1989).

Tableau 12 : résultats du dosage des protéines

Tableau 13 : résultats du test d'hémagglutination des quatre surnageants

Tableau14 : Résultats du test de la limite d'hémagglutination

Tableau 15 : Dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm et 260nm

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

Tableau 17 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination

Tableau18 : Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

Tableau 19 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine

Tableau 20 : Résultats du test d'agglutination des fractions précipités par le sulfate d'ammonium

Tableau21 : résultats du dosage des protéines après dialyse de la fraction active

Tableau 22 : Résultats du dosage des 82 fractions obtenues après purification des protéines

Tableau 23 : résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics obtenues après chromatographie

Tableau24 : Résultats de l'effet du pH sur l'hémagglutination de la fraction 40-80% dialysée du champignon « Agrocybe Aegerita »

Tableau25 : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse

Tableau 26 : Dépôt des échantillons sur le gel d'électrophorèse

Tableau27 : Variation du volume de l'œdème chez les rats témoins et traités

Tableau 28 : inhibition de l'œdème provoqué par le formaldéhyde. Chez différents lots de rats, suite à un prétraitement, par voie (ip), par l'extrait brut, la molécule de référence en l'occurrence le diclofénac et un lot témoin.

Tableau29 : Résultats des statistiques significatives Anova de l'œdème

Liste des abréviations

A : Absorbance

ConA : Concanavaline A lectin

ConM : Canavalia Maritima

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

DiscI; DiscII : Discoidine 1 et 2

DEAE-C : Cellulose diéthyl-aminoéthyle

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

Fuc : L-fucose

Gal, GalNAc : D-galactose, N-acethylgalactosamine

Gal: galactose

Glc, GLCNAC : D-glucose, N-acétylglucosamine

KDa : kilo Dalton

PBS : Phosphate buffer saline

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

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PA-IIL: *Pseudomonas aeruginosa* lectin II

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TrFBL1 et 2 :Terfezia Boudieri Fruiting Body Lectin1 et 2

TSA: Thermal Shift Assay

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

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

PREMIERE PARTIE :

INTRODUCTION

1 Introduction

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, capables d'interagir spécifiquement avec des saccharides pour former des liaisons non covalentes et de provoquer l'agglutination des cellules animales (érythrocytes).

Ces substances ont été successivement baptisées agglutinines, hémagglutinines, phytohémagglutinines et finalement lectines (du verbe latin *legere* = choisir). 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 première lectine identifiée est connue sous le terme d'hémagglutinine, extraite à partir du pois «*Canavaliaensiformis*», découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 (**Université de Dorpat, Russie**). Le composé actif purifié, est la concanavoline A. Une autre lectine populaire est la ricine, très toxique, obtenue à partir des graines de ricin.

Les lectines ont été redéfinies par Peumans & Van Damme (1995) en tant que protéines possédant au moins un domaine non catalytique, qui se lie de façon réversible à un mono ou oligosaccharide spécifique. Toutefois, selon Cummings (1997), des protéines à activité enzymatique liées à des hydrates de carbone ne peuvent être considérés comme des lectines.

En conséquence de leurs propriétés chimiques, elles sont devenues un outil dans plusieurs domaines de la recherche biologique (immunologie, biologie cellulaire, structure de la membrane, recherche sur le cancer et le génie génétique). Les lectines sont présentes dans un large éventail d'organismes de la bactérie aux animaux, étant présentes dans toutes les classes et les familles, mais pas dans tous les genres et espèces (**Lis et Sharon, 1994**).

Elles se sont aussi révélées être des outils très utilisées au laboratoire dans les techniques préparatives ou analytiques. L'intérêt était, leurs utilisation dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides, tels que les déterminants de groupes sanguins et de glycoconjugués surtout des glycoprotéines, on peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité osidique :

- Il y'a celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique, et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Sharon & lis, 2003**).

Elles possèdent aussi la propriété d'agglutiner des cellules (comme les érythrocytes) en se fixant sur les polysaccharides membranaires ou les glycoprotéines présents dans les matrices extracellulaires, ou dans les fluides biologiques comme le sérum. (**HerrmannStillmark, 1888**). Les plantes, les champignons sont les groupes les plus étudiés pour leurs lectines et ont attiré l'attention en raison de leurs activités biologiques prometteuse (**Singh R.S ET AL., 2010**).

Certaines lectines possèdent des propriétés biologiques comme les activités antimicrobiennes (antibactériennes, antifongiques et antivirales) (**Swanson M.D., 2010**).

L'intérêt accordé à la recherche sur les lectines repose aujourd'hui sur leur capacité unique à décrypter l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont les récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clés dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de

signalisation cellulaire. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (Wiley, 1987).

Dans notre étude, nous avons travaillé sur un champignon pour analyser s'il a un fort rendement en lectines. Pour cela, on a testé un champignon "AgrocybeAegerita". L'extraction des lectines a été réalisée dans un tampon PBS après une macération de 24h.

Notre travail se répartie en :

- ❖ Une étude bibliographique sur les lectines.
- ❖ Le matériel et méthodes utilisés lors du travail expérimental.
- ❖ Les résultats et les discussions.

➤ **Objectif du travail**

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

Le protocole expérimental et les méthodes utilisées sont les suivants :

- Extraction et Fractionnement des protéines à partir des champignons broyés dans l'azote liquide et dilués dans un tampon phosphate (PBS) suivis de filtrations et de centrifugations.

- Test d'hémagglutination sur les érythrocytes de lapin afin de déterminer l'activité hémagglutinante des protéines.

-Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium suivie d'un dessalage par dialyse.

- Purification par chromatographie sur colonne.

- Test de la température et des effets du PH sur l'hémagglutination en présence de ces protéines afin de déterminer leur thermo-stabilité et leur PH optimum.

- Test d'inhibition d'hémagglutination en présence de différents monosaccharides et de glycoprotéines pour déterminer leur spécificité.

- Concentration suivie d'une lyophilisation de l'extrait protéique.

- Contrôle de la pureté et estimation des poids moléculaire par SDS-PAGE.

-Effet anti-inflammatoire de ce même extrait sur des rats de laboratoires.

DEUXIEME PARTIE :
GENERALITÉS SUR LES LECTINES

1 Définition

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines. Qui sont d'origine animale, végétale, virale ou bactérienne, non immunitaire et dépourvues d'activité enzymatique vis-à-vis de leurs ligands. Se lient spécifiquement à des sucres ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (**Irwin J. Goldstein et al, Molecular Biology, An international series of Monographs and Text books, 1980**).

L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis (**Karolin, S, 2008**). Les lectines sont de petites protéines, leurs masses moléculaires étant comprises entre 50 et 120 KD ; habituellement formées de deux (dimères) ou quatre (tétramères) sous-unités identiques (**Ghopkins et Evrard, 2003**).

Les lectines sont majoritairement multivalentes car elles possèdent au moins deux sites de reconnaissance par molécule, ce qui permet d'expliquer pourquoi elles vont précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (**Liener et al., Molecular Biology, An international series of Monographs and Text books, 1986**). c'est pour cela qu'elles ont d'autres appellations 'Agglutinines, hémagglutinines ou bien phyto-hémagglutinines,' qui est un aspect très important de ses dernières qui ont la capacité d'agglutiner les cellules comme les érythrocytes et les glycoconjugués ; La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides avec une plus grande affinité que pour certains oligosaccharides (**Gianluca Cioci, 2006**).

Elles interagissent également à des systèmes biologiques et développent une cascade d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants, ces interactions sont d'un grand essor car elles sont impliquées dans divers processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis & Sharon, 1998**).

Les lectines provoquent l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas et l'atrophie de la rate et de thymus. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés par leur traitement thermique dont l'efficacité dépend de la température et de la durée de traitement (**Meiteet al, 2006**). il existe aussi des lectines thermorésistantes (**Guillaume, 1993**).

Tableau 1 : Quelques lectines importantes sont énumérées dans le

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

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

2 Historique

Au début du XXe siècle, les premières lectines furent identifiées chez les plantes mais ce n'est qu'après la nativité de la glycobiologie dans les années soixante que la communauté scientifique débute de s'y intéresser, Les scientifiques étaient préoccupés par l'utilisation des lectines dans la détection, l'isolation et la caractérisation des oligosaccharides.

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui a 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 (**Sharon and Lis 2004**). D'autres substances d'origine végétales possédant une activité hémagglutinine ont ainsi été découvertes, Ensuite P. Ehrlichea découvert la même activité dans l'extraits du pois rouge (*Abrus precatorius*).

Des chercheurs ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd and shapleigh, 1954**).

En 1919, James B. Sumner, de l'université Cornell (Ithaca, New York), isola à partir du pois (*Canavalia ensiformis*) la première hémagglutinine pure, la concanavaleine A (Sumner, 1919). Il fallut patienter presque vingt ans et les travaux de Sumner et Howell en 1936 pour que la spécificité de ces protéines pour les sucres soit mise en évidence avec l'inhibition de l'hémagglutination de la concanavaleine A par des saccharoses (**Sumner et Howell, 1936**). En 1954, Boyd & Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné (**Boyd et Shapleigh, 1954**). L'étape importante dans l'histoire des hémagglutinines est la découverte que certaines d'entre elles agglutinent les globules rouges appartenant uniquement à un groupe sanguin donnée (système ABO) sans affecter les cellules sanguines des autres groupes. Cette découverte amène Boyd à remplacer le terme d'hémagglutinine par celui de lectine (de latin, legere : choisir – préférer) (**Sharon et Lis, 2007**).

Tableau 2 : Historique et propriétés des lectines les plus connues (Renato DE A, Moreira. 1991).

Année	Auteurs	Découvertes
1884	Warden & Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine <i>d'Abrus precatorius</i>

1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i> .
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de « <i>Ricinus communis</i> » Toxicité de la graine de « <i>Croton tiglium</i> »
1890	Erlich	Utilisation de l'abrine et de la ricine dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d'« <i>Abrus precatorius</i> »
1897	Elfstrand	Introduction du terme hémagglutinine
1902	Landsteiner	La réversibilité de l'hémagglutination par la Chaleur
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1907	Landsteiner & Raubitschek	Activité Hémagglutinante dans les plantes non toxiques
1908	Landsteiner & Raubitschek	La spécificité des espèces de plantes à hémagglutinines
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Summer	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A
1926-7	Marcusson- Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins
1947-9	Boyd & Reguera /Renkonen	Spécificité groupe de sang des plantes à hémagglutinines
1949	Liener	Toxicité des hémagglutinines de « <i>Phaseolus Vulgaris</i> »

1949	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de « <i>Phaseolusvulgaris</i> »
1952	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples ; démonstration à l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupes sanguins
1954	Boyd&Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de « <i>Phaseolusvulgaris</i> »
1965	Agrawal &Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi&Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>E.Coli</i>

3 Structure des lectines :

Les lectines sont classées en 3 grandes classes :

1-3.1. Les lectines simples

Cette catégorie des lectines est formée de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire en général ne dépasse pas 40KDa. Elle comprend presque toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifique pour le galactose) (**Lenka, 2006**) (**figure 01**)

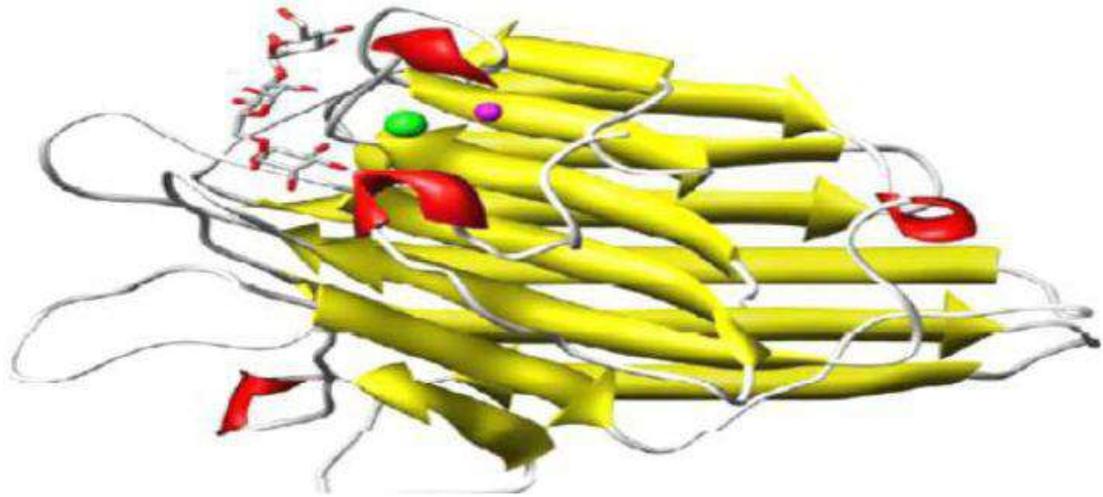


Figure 1 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de « *canavaliaensiformis* » en complexe avec le tri-mannosoïde (Lenka *et al.*, 2006).

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

3.2. Les lectines en mosaïque

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

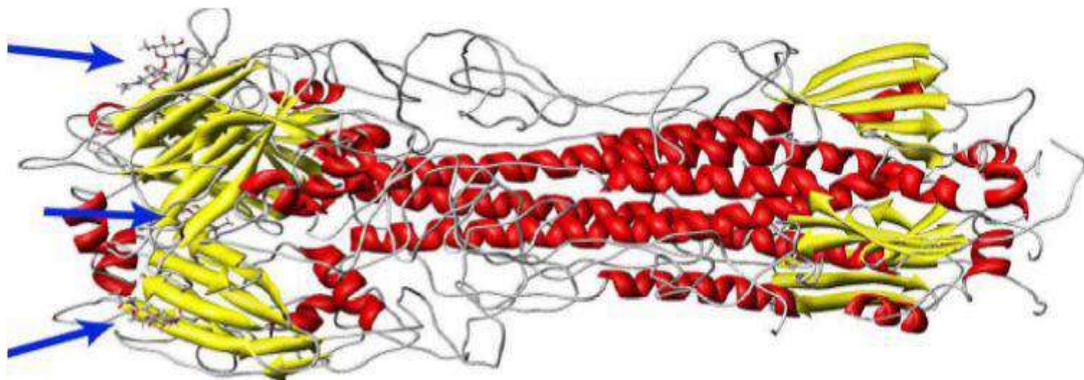


Figure 2 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus influenza complexé à l'acide sialique (Lenka *et al.*,2006).

3.3. Les assemblages macromoléculaires

Ces lectines sont le plus souvent rencontrées chez les bactéries au niveau des fibrilles, où des structures filamenteuses de 3 à 7 nm sont formées de diamètre de 100nm de longueur, appelées fimbriae ou pili (s'intègrent dans la structure du filament).

La plus grande partie d'un filament fimbrial est formée par la polymérisation d'une unité prédominante, qui ne jouent qu'un rôle structural. Seul un type d'unités, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006) (Figure 03).

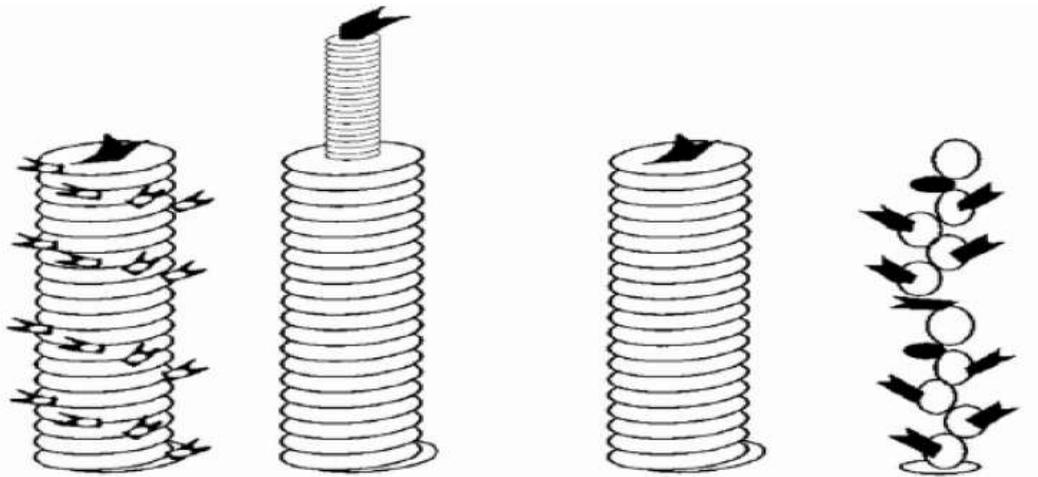


Figure 3 : Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia Coli* (Lenka, 2006)

3.4. Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle des lectines est constituée de feuilles β reliés par un nœud et formant des chaînes antiparallèles avec des hélices α , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon & Lis, 1990). Le site de liaison avec les carbohydrates (CRD) peut regrouper jusqu'à trois régions chevauchantes, la région centrale est constituée par les résidus d'interactions et les ions métalliques (Mn^{2+} et Ca^{2+}) nécessaires à ces interactions, et entourée par des résidus aromatiques, cette région fournit l'énergie nécessaire pour l'interaction : lectine-carbohydate. (Sharon & Lis, 1990 ; Young et Oomen, 1992).

4 Spécificité et affinité des lectines

La majorité des lectines sont spécifiques à un petit nombre de sucre, ses sucres sont généralement présents sur la surface des cellules sous la forme glycoconjugués surtout. En se référant sur la spécificité des lectines on peut identifier deux classes : Celles qui reconnaissent un monosaccharide et celles qui reconnaissent des oligosaccharides (Sharon, 2003). Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man),

Le Galactose(Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acétylneuraminique, NeuAc) (**Lis and Sharon 1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines.

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park et coll., 2008**). Par exemple, en utilisant les techniques du test ELLA (Enzyme LinkedLectinAssay) et du test« Glycansarray » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel.

➤ **Le site de reconnaissance**

Les liaisons hydrogènes et ioniques entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et directionnelles, ce qui leur permet d'avoir une bonne affinité et spécificité (**Gianluca, 2006 ; Dam et Brewer, 2002**).

Les sites de liaisons sont généralement sous forme de creux peu profonds sur la surface de la protéine chez les lectines spécifiques aux monosaccharides, Par contre, chez les lectines spécifiques aux oligosaccharides, les sites de liaisons sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction enzyme-substrat (**Gianluca, 2006**) (**Figure 7**).

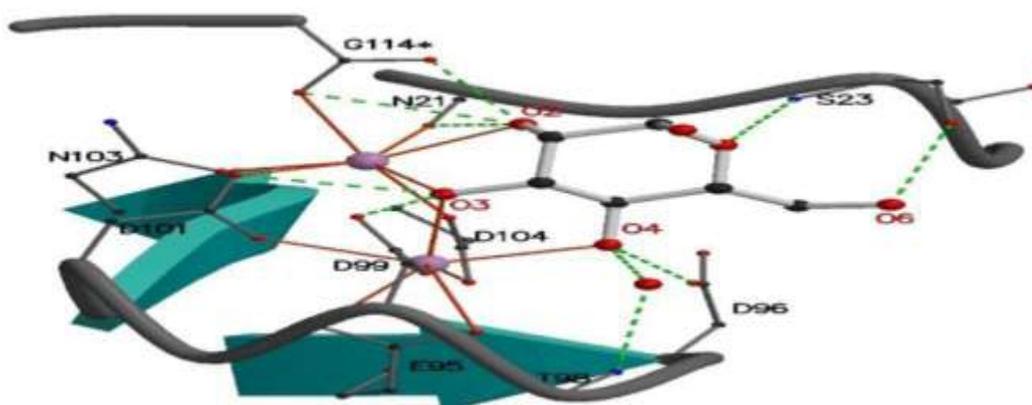


Figure 4: L-Fucose dans le site de liaison de la lectine PA-III (Gianluca, 2006).

5 Distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants.

De nos jours, on connaît la structure tridimensionnelle de plus de 1000 lectines et leurs nombre de structures cristallographiques est toujours en développement. Leurs banque de données en contient de diverses familles structurales (**KarolineS.A., 2008 : Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de Dictyosteliumdiscoideum**).

Tableau 3 : Quelques structures tridimensionnelles des lectines (Karoline S.A, 2008)

Origines	Exemples de Lectines	Native	Complexé	Total
Plantes	ConA	106	201	307

	Ricine			
Bactéries	PA-IL de pseudomonas Toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin Helix pomatia agglutinin	80	152	232
Virus	Hemagglutinin de virus Capside de rotavirus	43	25	68
Champignons	Lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9

5.1 Les lectines présentes chez les plantes

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

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g. les lectines de légumineuse, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquences et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (**Edelman *et al.*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**) (**Figure 05**). La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (Con A) a été déterminée en 1972 (**Edelman *et al.*, 1972 ; Hardman and Ainsworth, 1972**).

Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé « β jelly roll » formé par deux feuillets β superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variété d'assemblages macromoléculaires sous forme de dimères ou de tétramères (**Sinha *et al.*, 2007**). **La Figure 5** représente un tétramère de la protéine Con M de *Canavaliamaritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose (**Delatorre *et al.*, 2006**).

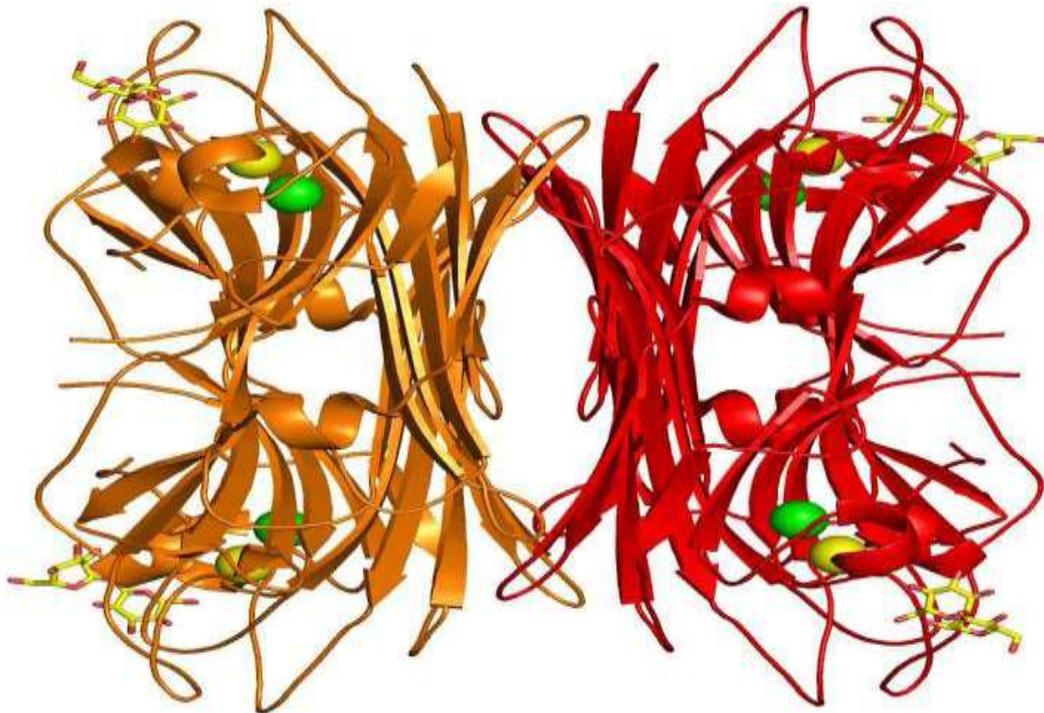


Figure 5: Tétramère de la protéine ConM de « *Canavaliamaritima* » complexée avec le Tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorreet *al*, 2006).

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

1) Selon la Spécificité osidique

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

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

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

Tableau 4 : La spécificité osidique de certaines plantes à lectines (Renato *et coll.*, 1991).

Espèces	Spécificité
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adeniadigitata</i>	Gal
<i>Aleuriaaurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavaliabrasilensis</i>	Man >Glc
<i>Canavaliaensiformis</i>	Man >Glc
<i>Dolichosbiflorus</i>	GalNAc
<i>Phaseolusvulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulexeuropaeus I</i>	L Fuc
<i>Momordicacharantia</i>	GalNAc
<i>Cytissussessilifolia</i>	GlcNAc>Fuc>Gal
<i>Datura stramonium</i>	GalNAc

2) Selon la structure quaternaire

Peumans et Van Damme (1995) indique qu'il existe quatre types majeurs de lectines sont présents chez les plantes :

a. Les mérolectines

Les mérolectines sont de petits peptides qui sont constitués d'une seule chaîne polypeptidique qui ne possèdent qu'un seul domaine de liaison aux glucides par exemple : (héveine, protéine d'Orchidées). Ils sont incapables de faire une agglutination avec les cellules.

b. Les hololectines

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

c. Les chimérollectines

Les chimérollectines sont des protéines de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique, car ils possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides, ainsi qu'un domaine avec une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison (**Van Damme et al., 1998**).

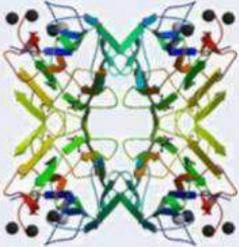
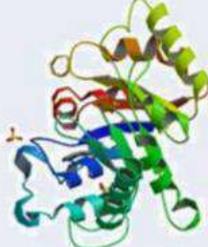
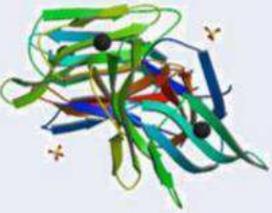
Selon le nombre de liaisons aux glucides, les chimérollectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip « *RibosomInactivatingProteine* » : Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine).

d. Les superlectines

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

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

Tableau 5 : classification structurale des lectines des plantes (Van Damme *et al.* 1998).

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

5.2 Les lectines des microorganismes

Dans la nature, les lectines participent à la reconnaissance des cellules de l'hôte par les microorganismes pathogènes (Bouchara et Trouchin, 2003). L'adhérence aux tissus constitue une étape cruciale dans le développement de l'infection (Bouchara et Trouchin, 1999).

a. Les lectines bactériennes

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

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

b. Les lectines fimbriales

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

Les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues jusqu'à aujourd'hui appartiennent aux pili de type 1 ou de type p et montrent que les domaines lectines adoptent des repliements similaires, basés sur une structure allongée de type β -sandwich. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un côté du domaine lectine. (Figure 6).

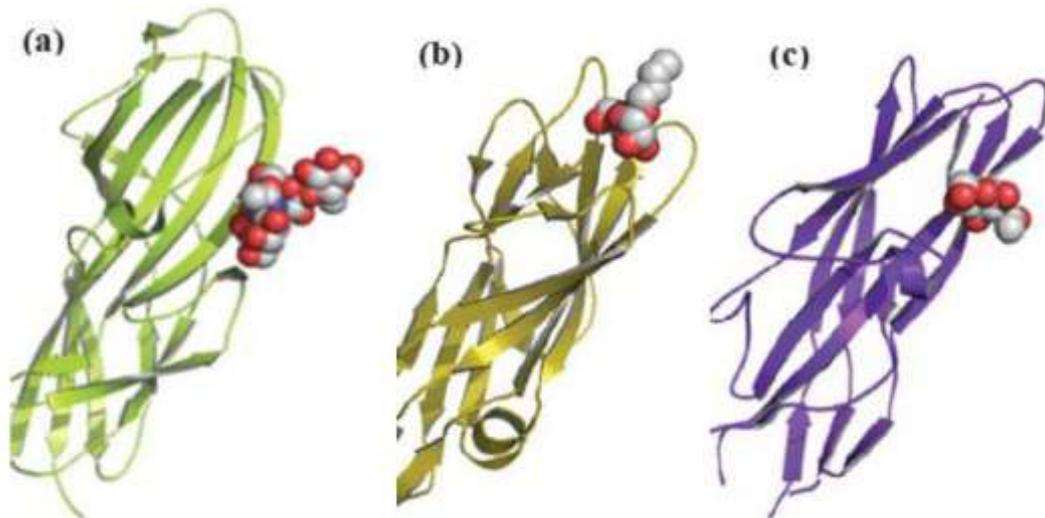


Figure 6 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b),FimHcompléxé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectinefimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)

C Les toxines

Les bactéries secrètent les toxines qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. La rupture de la paroi cellulaire endommage la cellule par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines de type AB sont secrétées par différents microorganismes tels que « *Vibrio cholerae* », certaines souches d'*E. coli* (ETEC), « *Shigella dysenteriae* » et « *Borderella pertussis* ». Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B (**Figure 7**).

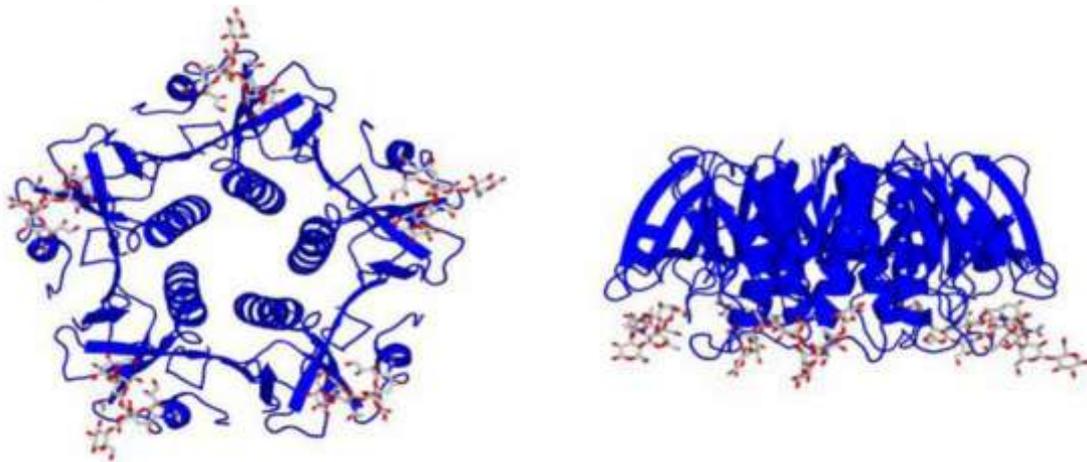


Figure 7 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra complexée avec le GM1 (pdb 3chb) (Merritt, 1995)

d Les lectines solubles

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

Tableau 6 : Lectines bactériennes solubles

Nom	Type	Spécificité	Caractéristique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-II	Pathogène humain	Galactose	Lectine cytotoxique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-III	Pathogène humain	Fructose/Mannose	Très haute affinité vers le fucose
<i>Cromobacterium violaceum</i> CV-III	Pathogène humain	Fructose/Mannose	Très haute homologie avec PA-III
<i>Burkholderia cenocepacia</i> BCLx	Pathogène humain	fucose/mannose	Gènes identifiés homologues à PA-III
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS-III	Pathogène végétal	mannose/fucose	Très haute homologie avec PA-III
<i>Ralstonia solanacearum</i> RSL	Pathogène végétal	Fucose	Similaire à « <i>Aleuria aurantia</i> lectin », une lectine de champignon

5.3 Les lectines de champignons

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

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

L'abondance des lectines dans les champignons est remarquable, des tests d'hémagglutination réalisés sur plus de 411 spécimens ont permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés. (Tableau 7)

Tableau7 : Lectines de champignons connues (Pemberton 1994)

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
<i>Aleuriaaurantia</i> (AAL)	2003	Fucose β -propeller à 6 lames
<i>Flammulinavelutipes</i> (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
<i>Xerocomuschrysenderon</i> (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
<i>Coprineuscinerea</i> (CGL2)	2004	Gal Galectine
<i>Agrocibecylindracea</i> (ACG)	2005	Gal Galectine
<i>Agaricusbisporus</i> (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
<i>Laetiporussulphureus</i> (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
<i>Psathyrellavelutina</i> (PVL) 3116	2006	GlcNAc/NeuNAc β -propeller à 7 lames

a)Caractéristiques :

Les lectines de champignons qui ont été caractérisées et purifiées jusqu'à présent dévoilent des caractéristiques très vaste, soit en terme de taille (12-190 KDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre de sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. Leurs spécificité pour les sucres est très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines.

b) Rôle

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

5.4. Les lectines animales

Elles sont 13 familles qui se divisent en deux groupes :

a. Lectines intracellulaires

Les lectines intracellulaires se composent de quatre groupes : les lectines de type M, P et L et les calnexines . ces lectines interagissent dans le trafic intracellulaire, l'adressage des glycoprotéines ou encore dans leur dégradation (**Chabrol et al., 2012**).

b. Lectines extracellulaires

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

6. Les propriétés des lectines

6.1 Les propriétés biologiques des lectines

Elles sont multiples et variées :

1. Liaison avec les sucres

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

2. L'agglutination des cellules

C'est l'affirmation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. 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) pour qu'elles se produisent. Les lectines monovalentes ont un seul site de reconnaissance n'agglutine pas avec les cellules (**Peumans et coll., 1995 ; Wang et coll., 1998**).

3. L'activité mitogène

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

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

6.2 Les propriétés médicinales des lectines

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

1 Propriété antivirale

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

2. La propriété anticancéreuse

Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses (Poiroux, 2009). Egalement elles inhibent leur migration (Banwell, 1983).

3 La propriété antibactérienne

Les lectines ont la capacité de réguler la migration et l'adhésion des cellules bactériennes (Tanne *et Neyrolles*, 2010). Pour cette raison, plusieurs lectines ont une activité antibactérienne, telle que l'EUL et le calnexin A qui ont une action antibactérienne contre *Xanthomonas oryzae* et *P. syringae* respectivement (Qiu *et al.* 2012 ; Atalah *et al.*, 2014). Les lectines animales comme les lectines réceptrices des kinases (LecRKs) sont aussi impliquées dans la résistance aux bactéries (Singh *et al.*, 2012). Exemple : les lectines de type C qui résistent à la bactérie « *Listeria monocytogenes* » (Mukherjee *et al.*, 2014).

4 La propriété antifongique

Les lectine de *Phaseolus vulgaris* cv ont une activité fongicide contre *Valsa mali* (Lamet Ng, 2010). La même propriété est présentée par les lectines de *Tinospora mentosa* qui inhibe la croissance du champignon *Aspergillus niger* (Reponet *et al.*, 2014).

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

5 Propriété immuno-modulatrice

Diverses lectines exercent des activités immuno-modulatrices au temps de la première interaction avec les glycanes présentent à la surface des cellules immunitaire (Abdeljalil *et al.*, 2014). Les lectines forment des signaux de production des cytokines (Souza *et al.*, 2013) comme est le cas des lectines isolées à partir de *Viscum album L* qui ont une activité immuno-modulatrice pour les macrophages, et elles médient la réponse immunitaire par amélioration des cytokines (IL-3, IL-23 et TNF- α) (Lee *et al.*, 2007).

6 Autres propriétés

Les lectines manifestent de diverses activités biologiques telles que l'activation de la voie alterne du complément, la précipitation des glycoprotéines et l'agrégation des immunoglobulines (Oppenheim J.D, 1980), l'induction de la libération de l'histamine à partir

des cellules basophiles et des mastocytes (**Gomes J.C, 1994**), les effets pro et anti inflammatoires (**Assreury A.M.S, 1997**), l'induction de l'apoptose (**Kulkarni G.V, 1998**).

7. Les utilisations et les applications des lectines

Les lectines ont la capacité d'interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité de fonctions et d'événements dans ces organismes vivants. Ces interactions jouent un rôle important car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (**Lis and Sharon, 1998**).

Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche, dans le secteur biomédical et dans le domaine agronomique.

Tableau 8 : Domaines d'applications des lectines

Domaine	Application	Références
Biomédical		
Hématologie	Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains et sont utilisées dans les banques de sang pour leur identification ou leur typage	(Boyd et Shapleigh, 1954)
Immunologie	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 immun thérapeutiques	(Jaffe, 1980).
Biologie cellulaire	étudier la nature, la structure et la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques	(Jaffe, 1980)
Cancérologie	-marqueurs histochimiques puisque le cancer est associé à une modification des glycanes présents sur les cellules -transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses	(Gillot et coll., 2004) (Kenoth et ses collaborateurs en 2001)
Agronomique		
	la lutte contre les agents pathogènes des plantes tels que les insectes, les nématodes du	(Murdock et Shade, 2002)

	sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans les cultures	
biochimie et protéomique		
	outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps , cytokines , hormones , facteur de croissance , enzymes , récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité , une fois couplés à un support chromatographique) ;pour les détecter (une fois marqué par un fluorophore ou un enzyme , immuno-blotting , immuno-précipitation ...)	(Dole.A.et Lindeberg . S. ,2005)

TROISIÈME PARTIE :

GENERALITÉS SUR LE CHAMPIGNON ‘AgrocybeAegerita’

1-Généralités sur l'AgrocybeAegerita :

En français le **Pioppini** est appelé **Agrocybe Aegerita**. Dans la nature, on trouve les **Agrocybes** du Peuplier au pied des peupliers. Mais vous les trouverez également sous les sureaux, les ormes et les muriers ; Ils poussent en touffes.

Ce sont des champignons essentiellement lignicoles. On distingue 4 groupes principaux : les Pholiotés vraies (avec anneau et lignicoles), les Gymnopiles ou Flammules (sans anneau et lignicoles), les Rozites (avec anneau membraneux et terricoles), les Agrocybes (à anneau inconstant, terricoles ou lignicoles). Les Pholiotés comptent parmi elles quelques bons comestibles, mais la palme revient à la Pholioté du peuplier, déjà appréciée et cultivée dans l'Antiquité. Un grand nombre d'entre elles est inconsommable en raison de son amertume (*Biochem. J.* 2012, 443, 369–378).



Figure 8 : Champignon "AgrocybeAegerita"



Figure9 : Pholioté du Peuplier (Photo : Atlas des champignons)

2. Définition de l'Agrocybe Aegerita :

Elle correspond à un champignon saprophyte qui se développe sur le vieux bois d'arbre, comme les espèces : le saule, le peuplier, l'orme et l'érable (**Giovannini, 2006, Wasser et Weis 1999**). Il est principalement distribué dans les zones où l'humidité relative est élevée, principalement en Asie, en Europe et en Amérique du Nord (**Lau, 2001**).

Ce champignon correspond à l'une des espèces les plus couramment cultivées en Chine pour leurs effets anti-tumorales, propriétés antifongiques (**Zang et al, 2003**), leur agent diurétique (**Hobbs, 1996**) ; la présence de polysaccharides à activité hypoglycémique avec une marque a été étudiée pour sa capacité à inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (**Tadashi et al., 1994**).

3. Historique

C'est un champignon grégaire d'un chamois velouté, déjà connu des Grecs anciens pour ses qualités gastronomiques. Surtout présent dans le sud de l'Europe, il fait encore l'objet d'une culture traditionnelle en Provence, sous le nom de pivoulade.

(**Giovannini, 2006 ; Wasser and weis, 1999**)

4. Classification scientifique du Pholiote du Peuplier

Tableau9 : classification scientifique de l'Agrocybe Aegerita

Division	Basidiomycota
Classe	Agaricomycètes
Famille	Bolbitiaceae
Genre	Agrocybe
Espèce	A.Aegerita
Nom binomial	A.Aegerita
Nom commun	Champignon du peuplier

5. Morphologie, reproduction et développement



Figure10 : Chapeau d'Agrocybe Aegerita (mycorance.free.fr)



Figure11 : Pied d'Agroclybe Aegerita (mycorance.free.fr)

Chapeau : de 4 à 12/15 cm, globuleux devenant convexe puis s'aplanissant, éventuellement déprimé dans la vétusté ; revêtement piléique, lisse, velouté, parfois craquelé, ridulé, crevassé avec l'âge et par temps sec, à peine gras à l'humide ; brun à presque noir très jeune pour s'éclaircir à crème blanchâtre voire blanc en vieillissant tout en conservant un disque plus foncé, puis reprend des teintes brunes sales dans la vétusté ; marge enroulée puis s'étalant devenant ondulée, festonnée.

Lames : assez serrées, inégales, adnées à légèrement décurrentes par une dent, blanc crème devenant beige puis brun clair.

Pied : jusqu'à 15 cm, cylindrique à légèrement renflé au centre, atténué vers la base, flexueux et fibreux, rayé dans sa longueur, blanchâtre pour se tacher de beige brun clair. Anneau ample, épais, descendant, bien développé mais se dégradant ou fugace, haut sur le pied, blanchâtre, vite brun sur le dessus par les spores.

Chair : blanche dans le chapeau, grisâtre dans le pied avec tendance à brunir vers la base ; bonne odeur fruitée jeune, plus acide et un peu moins agréable ensuite rappelant le vieux tonneau à vin.

Sports : sporée brun chocolat ; spores elliptiques à cylindriques, pore germinatif petit, 9-12 x 5-6 μm .

Comestibilité : Très bon comestible.

Exhalaison : fruitée à farineuse à l'état juvénile, virant au "vieux bois" ou la "vinasse" en vieillissant.

Période de cueillette : à partir de la fin du printemps et jusqu'à l'automne.

Biotopes : souches de feuillus, surtout de peupliers et saules mais aussi ormes et sureaux.

La chair est blanche dans le chapeau et grisâtre dans le pied avec tendance à brunir. Les spores sont brunes. Cette espèce se développe en touffes plus ou moins importantes, parfois sur les hauteurs d'arbres morts restés debout. Elle est probablement la première à avoir fait l'objet d'une

culture artisanale en Europe, sur bois de peuplier "ensemencé de mycélium" enterré sous une couche de terreau ou de terre puis remis à l'air libre pour provoquer la fructification. Surtout connu dans le Sud, ce champignon à la saveur de noisette est un très bon comestible (**ChampYves le site aux mille champignons crée le 07/11/2002 - Copyright JYB Unltd 2002**).

6. Culture de l'Agrocybe

Sa culture s'effectue sur billes (rondelles d'environ 6/8 centimètres d'épaisseur) de peuplier frottées de la lame de pholiotes mûres puis enterrées sous une couche de terre légère ou mieux, de terreau qui conserve plus longtemps et plus régulièrement l'humidité..., pas mal de patience, attendre la période du "cèpe" (l'automne), et avec un peu de chance => vous croquerez vos propres pholiotes du peuplier. Cette culture nécessite tout de même que vos billes, une fois bien contaminées par le mycélium de la pholiote, voient le jour pour démarrer ses "fructifications".

Agrocybe Aegerita est un champignon visible surtout dans la moitié sud de la France, du mois de mai au mois d'octobre (plus tard dans l'hiver en région méditerranéenne, où elle est encore plus fréquente), sur feuillus morts ou mourants de peupliers mais aussi saules, chênes, platanes, ormes, sureaux.. Mais on pourra aussi trouver cette pholiote directement à terre, sur reste racine traçante ou bois enterrés des mêmes essences (**ChampYves le site aux mille champignons crée le 07/11/2002 - Copyright JYB Unltd 2002**).



Figure 12: Culture de l'Agrocybe aegerira (Black Poplar Mushroom; Live Culture by World Seed Supply)

7. Fructification d'Agrocybeaegerita sur copeaux de hêtre

Toujours dans la série des substrats composés de copeaux de hêtre, voici la *fructification d'Agrocybeaegerita*, la *pholiote du peuplier*. C'est vraiment une petite fructification, la température était loin d'être idéale. De plus j'ai essayé d'utiliser une couche de gobetage sur la surface du substrat. Cette étape est optionnelle pour cette espèce mais elle est censée

augmenter le nombre de champignons bien que mon essai ne soit pas un exemple de productivité



Figure13 : Primordial d'*Agrocybeaegerita*



Figure14 : Empreinte de spores d'*Agrocybeaegerita* (Champignons comestibles 2018/WordPress & Thème Graphene)

8-Propriétés médicinales

Ce champignon correspond à l'une des espèces les plus cultivées en Chine pour ses propriétés anti tumorales et antifongiques (**Zang et al., 2003**), diurétique (Hobbs, 1996), présence de polysaccharides à activité hypoglycémique marquée (**Tadashi et al., 1994**). a été étudié pour son potentiel à inhiber les enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (**Kang et al, 2001**), les activités au niveau de COX-1 impliquées dans la régulation de l'homéostasie et COX-2 impliquées dans la douleur et l'inflammation (Blobaum et Lawrence, 2007), et l'activité antioxydante(**Zhang et al., 2003**).

QUATRIÈME PARTIE :
Matériels et Méthodes

1-Récolte du champignon

Notre champignon a été récolté au début du mois de mars au niveau de la région de Djbel el Athmania.



Figure 15 : *Agrocybe frais*



Figure 16 : *Agrocybe sec*

1.1Lavage

Le champignon *Agrocybe Aegerita* a été lavé par l'eau de robinet pour éliminer les grosses particules (la poussière) présentes dans ce champignon récolté, puis rincé à l'aide de l'eau distillée pour éviter la présence des impuretés.

1.2Séchage

Le séchage du champignon a été réalisé dans un endroit sec à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant un mois (jusqu'à l'obtention d'une matière vraiment sèche).

1.3 Concassage et broyage

Trente-huit grammes (38 g) d'échantillon sont concassés puis rendus en poudre fine en présence d'azote liquide.



Figure17 : Broyage par l'azote Liquide



Figure18 : Poudre d'Agrocybe Aegerita

2- Extraction et fractionnement des protéines

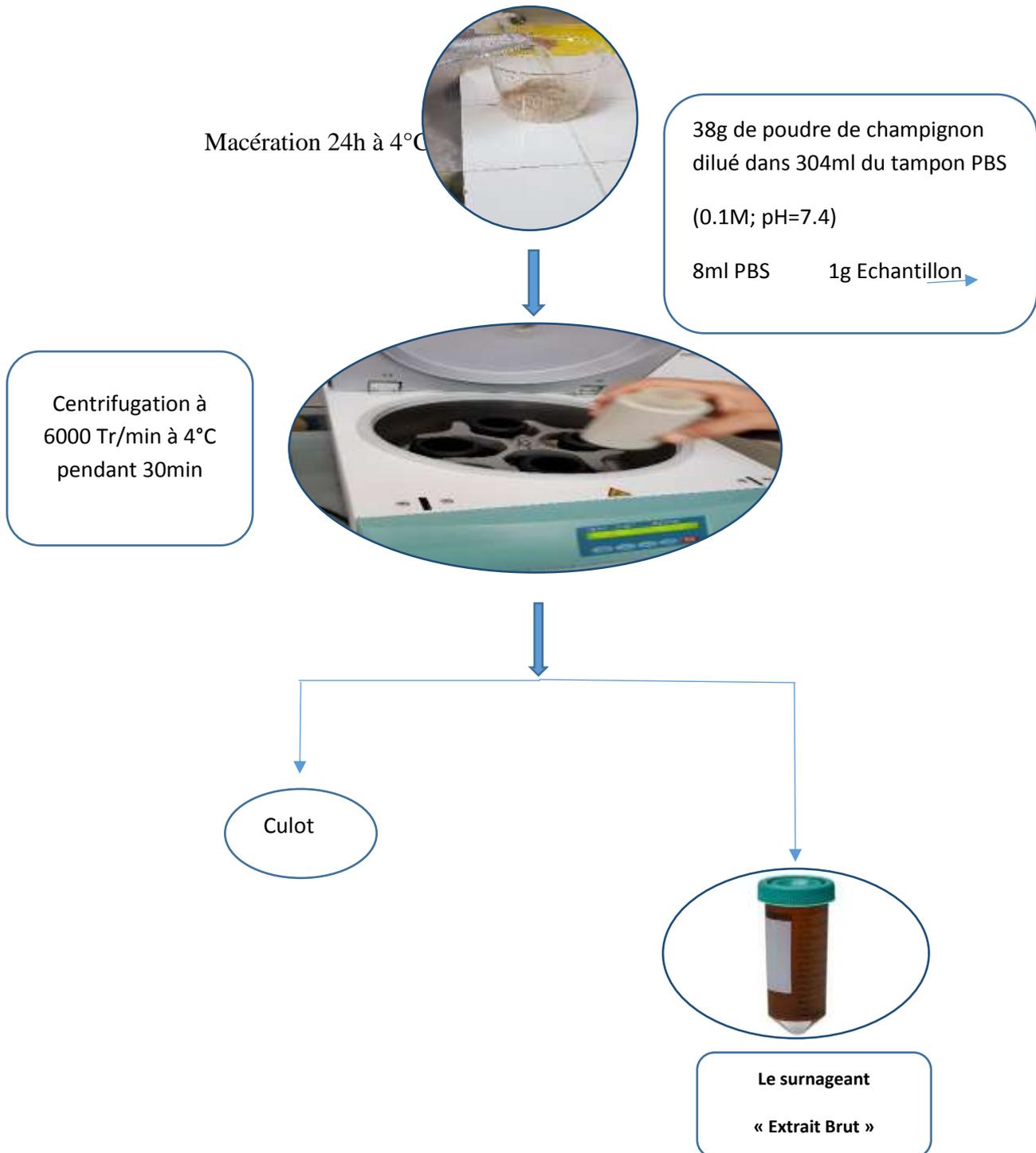


Figure 19 : Schéma d'extraction des lectines à partir de la Poudre du champignon« Agrocybe Aegerita »

Le travail a été réalisé sur le de champignon ‘**Agrocybe Aegerita**’ qu’on a séché 1mois à l’abri de la lumière dans un endroit assez chaud qui a été ensuite broyé par l’azote liquide. 38g de la poudre obtenue sont dilués dans 304ml du tampon phosphate (PBS 0.1M pH 7.4). Le mélange est homogénéisé grâce à un blender ultra-turax, soumis à une macération pendant 24h sous agitation à froid pour assurer une meilleure extraction des protéines, puis filtré grâce à une pompe à vide afin d’éliminer les grosses molécules.



Figure20 : Pompe à vide utilisée pour la filtration

Le filtrat est ensuite soumis à une centrifugation à 12000tr/min pendant 30 minutes à 4°C. Surnageant et culot vont subir un test d’hémagglutination afin de déterminer l’absence ou la présence de lectines
Seul le surnageant qui a révélé une activité hémagglutinante a été récupéré dans des tubes falcons et conservé à 4°C.

3-dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé sur un spectrophotomètre UV-Visible.

L’absorbance a été mesurée à 280nm pour les protéines et à 260nm pour les acides nucléiques qui pourraient éventuellement contaminer nos solutions. L’étude des propriétés spectrales de ces deux macromolécules a abouti au développement d’une méthode permettant de déterminer la concentration protéique d’une solution qui contient une proportion donnée en acides nucléiques (**Warburg et Christian, 1941**) Les valeurs obtenues peuvent alors s’intégrer à l’équation suivante : **[Protéines] (mg/ml) =1.55 A₂₈₀ – 0.76 A₂₆₀**

4-Tests d’hémagglutination

Ces tests sont réalisés à différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d’activité hémagglutinante est le test d’interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein 1980 ; Rüdiger 1993**). Cette technique repose sur la capacité des lectines à former un réseau avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de surface.

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

Dans chaque puits d'une microplaque, 50 µl d'extrait brut de notre champignon+ 50µl du tampon PBS ont été déposés tout en ajoutant 50 µl des hématies du lapin.

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

➤ **Préparation des hématies à 3%**

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

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

➤ **Réalisation du test d'hémagglutination**

Dans les quatre premiers puits de la 1ère ligne de la microplaque, on dépose à l'aide d'une micropipette 50µl du tampon PBS + 50µl de notre extrait et on rajoute 50µl d'hématies à 3%. Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs composés chacun de 50µl de solution tampon (PBS) et de 50µl d'hématies à 3% (dépourvus d'échantillons).

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

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

On vise par ce test la plus basse concentration en lectines pour laquelle une hémagglutination est encore visible c'est le point d'équivalence et la concentration en lectines de ce puits, et une limite d'hémagglutination.

Dans chaque puits, 50 µl de tampon phosphate ont été déposés suivis de 50 µl de l'extrait brut puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits qui suivent. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits.

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

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

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

Le traitement thermique a été réalisé sur un tube dont on a versé 2ml d'extrait brut, ce dernier a été incubé à des degrés différents de température (30, 40, 60, 80 et 100°C) dans un bain marie durant 1h de temps.

Une activité agglutinante est testée pour l'extrait qui a été soumis à des degrés différents de température (50µl d'extrait+50µl d'hématies).

Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs.

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

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

On implique la méthode de double dilution pour un volume de 50 µl du tampon PBS(0,01M) plus 50 µl de l'extrait soumis au bain marie et 50 µl d'hématie du lapin fixé à 3% qui est testée pour chaque température en réservant à chaque fois trois puits pour le témoin négatif de chaque extrait sont respectivement composés de 50µl de notre extrait + 50µl de tampon phosphate ayant aussi été incubé dans le bain marie à chaque température (30°C, 40°C, 60°C, 80°C et 100°C) et de 50µl d'hématies de lapin.

La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines :**

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

Avant de faire ce test on réalise d'abord un test de la limite de l'hémagglutination de notre extrait qui nous permet de connaître le facteur de dilution qui correspond aux sucres.

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

Dans une microplaque on dépose dans la première ligne 50µl de tampon PBS+ 50µl d'hématies de lapin plus 50µl d'échantillon dans le premier puits et une cascade de doubles dilutions est faite jusqu'au 12ème puits, on réserve les 3 puits de la 2ème ligne pour le témoin (50µl de tampon PBS +50µl d'hématies).

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

Après avoir obtenu le facteur de dilution on exerce les tests d'inhibition de l'hémagglutination par les sucres et les glycoprotéines.

➤ **tests d'inhibition de l'hémagglutination**

Pour réaliser ce test on a choisi 19 sucres et 6 glycoprotéines :

Tableau 10 : Tableau des saccharides et glycoprotéines du test d'inhibition de l'hémagglutination

Type de sucre	Les noms	Poids moléculaire g/mol
Disaccharides	Maltose	323.3
	Lacotse	342.3
	Cellulose	324.3
	Sacharose	342.3
Monosaccharides	Glucosamine (hcl)	179.17
	Glucose	180.156
	Galactose	180.156
	Fucose	164.1563
	Inositol	180.16
	Rhamnose	164.14
	Xylitose	150.13
	Fucopyranoside	
	Melibiose	342.2965
	Galactopyranoside	329.73
	Sorbose	180.16
	Manopyranoside	194.18
	Mannose	180.156
	Sucrose	342.3
	Raffinose	504.42
Glycoprotéines	Mucine	
	BSA	66.3KDA
	Ovalbumine	45KDA
	Fetuine	38.2KDA
	Caséine	
	Inuline	373.7966

Le test est réalisé comme suit :

Dans une microplaque on dépose 50µl de notre fraction active + 50µl du sucre et faire une cascade de double dilution dans les deux puits qui suivent (chaque 3puits contiennent un sucre ou une glycoprotéine).

Après incubation 30min à 37°C, 50µL d'une suspension d'érythrocytes de rat à 4% sont ajoutés à chaque puits.

L'inhibition de l'hémagglutination est lue après une heure d'incubation à température ambiante.

➤ **Test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines**

Ce test est effectué avec les sucres qui inhibent l'agglutination, il est réalisé afin de déterminer la concentration minimale à laquelle a lieu l'inhibition de l'agglutination. Dans chaque puits de la microplaque, 50µl d'homogénat sont déposés, et c'est uniquement dans les premiers puits relatifs à chaque sucre que sont rajoutés 50µl de chaque inhibiteur, une gamme de concentrations par doubles dilutions est réalisée dans les puits suivants, le mélange est incubé pendant une heure de temps à température ambiante. Au final 50µl d'hématies à 3% sont ajoutés dans chaque puits. L'observation de l'hémagglutination est faite à l'œil nu après une heure d'incubation à température ambiante.

5-Précipitation au sulfate d'ammonium

➤ **Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium**

Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

Le tableau ci-dessous donne les quantités de (NH₄)₂SO₄ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

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

L'extrait brut de la souche « *AgrocybeAegerita* » est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation à différents paliers (0-40%, 40-80%), afin de séparer les protéines en différentes fractions. Une saturation initiale à 40% a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d'ammonium à l'extrait brut placé dans un bécher à 0°C, sous agitation constante.

Après centrifugation à 4500 Tr/min pendant 45min, les protéines précipitées sont récupérées dans 5mL de tampon PBS (0.1M ; pH = 7.4) ensuite on réalise un test d'agglutination et on le conserve à 4c°.

Cette solution représente la première fraction protéique F1 (0-40%). Le surnageant obtenu est resoumis pour une autre précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation de 40 à 80% en suivant la même procédure.

➤ **Limite d'agglutination après précipitation au sulfate d'ammonium**

On ajoute 50 µl du tampon PBS puis 50 µl de l'extrait précipité (culot 0-40% ; culot 0-80%) dans le 1er puits, puis une gamme de concentration par double dilution a été réalisée dans les puits qui suivent. Ensuite, 50 µl des hématies du lapin ont été ajoutés dans tous les puits. L'observation de l'activité agglutinante a été effectuée à l'œil nu après 1 h d'incubation à une température ambiante (25° C).

6. Dialyse

Cette étape est réalisée pour le dessalage en éliminant les traces de sulfate d'ammonium et améliorer la pureté de la lectine.

➤ **Méthode**

La fraction la plus active est placée dans une membrane semi-perméable (Spectral/port ; 20mm ; limite d'exclusion : 12kDa) et mise dans un bécher et inonder avec 1L du tampon PBS (0.01M, pH 7.4), ensuite est soumise à une agitation à froid pendant une nuit.



Figure21 : Membrane dialyse



Figure22 : Dialyse à froid sous agitation

7. L'effet du pH sur l'agglutination :



Figure23 : Membrane de Dialyse



Figure24 : Dialyse du test du pH

Pour tester l'effet du pH, des échantillons de lectines sont dialysés contre des solutions tampons à différents pH [3-11] pendant 24 h. Différents tampons ont été utilisés pour cela (selon la gamme de pH) : 20 mM de tampon citrate phosphate (pH 3.0 à 6.0), 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 7.0 à 9.0), et 20 mM de tampon Glycine-NaOH (pH 10.0 à 11.0).

2ml de dialysat de notre extrait sont mis dans un sac de dialyse, et baignant dans un 1L des différents tampons à différents pH (3-4-5-6-8-9-10-11) et laisser une nuit sous agitation à froid. Après 24h, on récupère la membrane de dialyse de chaque tampon à différents pH et on l'introduit dans 1L du tampon PBS pendant 4h.

➤ Limite d'agglutination après effet du pH

Afin de déterminer l'effet du pH sur la limite d'hémagglutination, le test est réalisé comme suit : Dans chaque premier puits de chaque première ligne de la microplaque, sont déposés 50µl de l'extrait (soumis aux effets du pH) et 50µl de tampon phosphate (0.1M pH = 7.4) dans tous les autres puits et pas uniquement au premier, une cascade de doubles dilutions est ensuite réalisée dans les puits suivants, l'opération est répétée pour tous les autres extraits.

Trois puits de la microplaque sont réservés aux témoins négatifs (50µl tampon PBS)

Les hématies de lapins sont rajoutées à tous les puits et la lecture est faite après une heure d'incubation à température ambiante.

8-Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50

Afin de purifier les lectines produites par « l'Agrocybe Aegerita », et de choisir la meilleure procédure de purification, une chromatographie sur gel filtration Sephadex G50 a été réalisée en raison de l'intervalle de fractionnement adéquat avec les poids moléculaires relatés par la bibliographie.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G50. Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 1500 à 30000 Da.

➤ **La préparation de la colonne de Sephadex G50**

9g de Sephadex G50 sont mis en suspension dans 150 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7,4). Le mélange est incubé pendant 48 h à température ambiante, ensuite dégazé et coulé dans une colonne (1cm/10cm).

(Intégrer à ce niveau le nombre de fractions recueillies, leurs volumes et le débit de la colonne). Toutes les fractions recueillies feront l'objet d'un dosage en protéines à 280 nm et 260 nm et serviront au tracé d'un graphe mettant en évidence un profil d'élution.

➤ **TEST D'HEMAGGLUTININ APRES CHROMATOGRAPHIE**

Ce test est réalisé pour la mise en évidence de la présence des lectines dans les tubes choisis en raison de la présence de protéines.

les premiers puits de chaque ligne de la microplaque sont réservés aux tubes concentrés (du 4^{ème} jusqu'au 8^{ème}) contiennent 50µl de chaque extrait des fractions avec 50µl de tampon phosphate, des cascades de double dilution sont ensuite réalisées dans la ligne entière.

Et les trois dernières lignes, chaque trois puits de la microplaque contiennent 50 µl de chaque tube + 50 µl de tampon PBS + 50µl d'hématies de lapin.

les témoins négatifs sont faits de la même manière précédente, les hématies de lapin sont rajoutées juste après. La lecture est effectuée après une heure d'incubation à température ambiante.

9-Concentration des protéines



Figure 25 : Tube concentrateur des protéines

On cherche à concentrer une protéine qui est trop diluée. On a un système avec un tube collecteur au-dessus duquel on place une membrane qui possède des pores. On verse sur la membrane le tampon contenant la protéine, puis on centrifuge : la protéine trop grosse ne passe pas au travers des pores de la membrane tandis que le tampon la traverse et tombe dans le tube. On peut répéter l'opération ainsi jusqu'à l'obtention de la concentration voulue pour la protéine.

Suite aux tests et résultats précédents obtenus ; on mélange les tubes qui ont agglutinés avec les érythrocytes après chromatographie dans un tube concentrateur et on le fera subir à une centrifugation pendant 10min à 6000tr/min

10-La lyophilisation

C'est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés.

Les échantillons congelés dans des boîtes de pétries sont placés les uns à côté des autres dans la chambre de lyophilisation sous vide sans qu'ils ne se touchent.

Les paramètres de lyophilisation sous vide ont été les suivants :

- Pression : 1.5 mbar
- Température de la surface de rangement : -20°C
- Température du condensateur : -80°C

Le séchage complet des échantillons par lyophilisation sous vide a pris deux jours. A leur sortie de l'appareillage les échantillons paraissent légers et cassants, changement de propriétés qui indique une perte d'eau considérable. Ils présentent également une teinte plus claire ; décoloration d'autant plus prononcée sur les échantillons congelés sous azote liquide qui sont devenus pratiquement blancs. Après lyophilisation les échantillons sont conservés.

11-Electrophorèse SDS-PAGE

Afin d'analyser la pureté des fractions ayant montré une forte agglutination, déterminer les fractions contenant la protéine d'intérêt et estimer la masse moléculaire de nos protéines, une électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du lauryl sulfate de sodium ou SDS-PAGE (sigle anglophone de *sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) est réalisée, Ce concept permet d'analyser les protéines et les séparer en fonction de la masse moléculaire de la chaîne peptidique, C'est une technique dénaturante qui dissocie les complexes protéiques non-covalents. A un pH donné, les protéines acquièrent une charge électrique négative ou positive selon leur point isoélectrique, cette propriété leur confère la possibilité de migrer sous l'influence d'un champ électrique (certaines migrent vers l'anode, d'autres vers la cathode), dans cette technique, les protéines sont d'abord incubées avec un agent réducteur, le β -mercaptoethanol qui rompt les liaisons disulfures, et aussi avec le SDS qui est un détergent fort et qui, via sa longue chaîne hydrocarbonée forme des interactions hydrophobes avec les chaînes peptidiques des protéines de telle sorte à leur procurer une charge nette négative, dès lors elles migrent toutes dans la même direction à travers le gel de polyacrylamide et ne sont séparées qu'en fonction de leurs masses moléculaires.

On utilise deux types de gel : un gel dense à pourcentage élevé en acrylamide 12%, permettant la séparation suivant la taille, précédé d'un gel de concentration (ou gel de focalisation) 4%, moins dense permettant au préalable de concentrer l'échantillon avant d'entrer dans la partie de séparation, ce qui permet d'obtenir des bandes de protéines bien focalisées.

Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 70µl par puits, la migration est effectuée à 50mA par gel dans un tampon Tris (pH = 8,8). Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au bleu de coomassie sous agitation continue pendant 24h. La décoloration avec l'eau de robinet est faite le lendemain plusieurs fois.

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 à 250 KDa. Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électrophorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad(**Precisionplus,proteinunstained,Biorad**).

12-ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR (Pharm. Méd. Trad. Afr. 2001, VoU 1, pp. 1-11,ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA RACINE DE *PLUCHEA oVALIS* (PERS.) DC.(ASTERACEAE) CHEZ LE RAT)

Nous avons utilisé le dispositif de (**Bhatt et al, 1977**) modifié pour évaluer le volume du pied des rats.

- ❖ L'objectif de cette partie a été focalisé sur l'étude de l'effet anti-inflammatoire des lectines partiellement purifiées à partir du champignon « **AgrocybeAegerita** » sur l'inflammation induite par le formaldéhyde afin d'évaluer et de valoriser l'utilisation de ce champignon.

12-1 Matériels biologiques et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 20 rats blancs *Rattus* de la souche *Wistar*, provenant de l'institut de pharmacie Constantine. Agés de 2mois, d'un poids vif moyen de 200 g.Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux mois environ, aux conditions de l'animalerie de Chaaba l'université de frères Mentouri Constantine, à température moyenne ou égale à 24 °C, avec une humidité relative de 70% ; La photopériode est de 12/24 heures. Les animaux reçoivent la nourriture et l'eau à volonté.

Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées, la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation et ils ont été pesés chaque deux jours.

Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le **tableau11**.

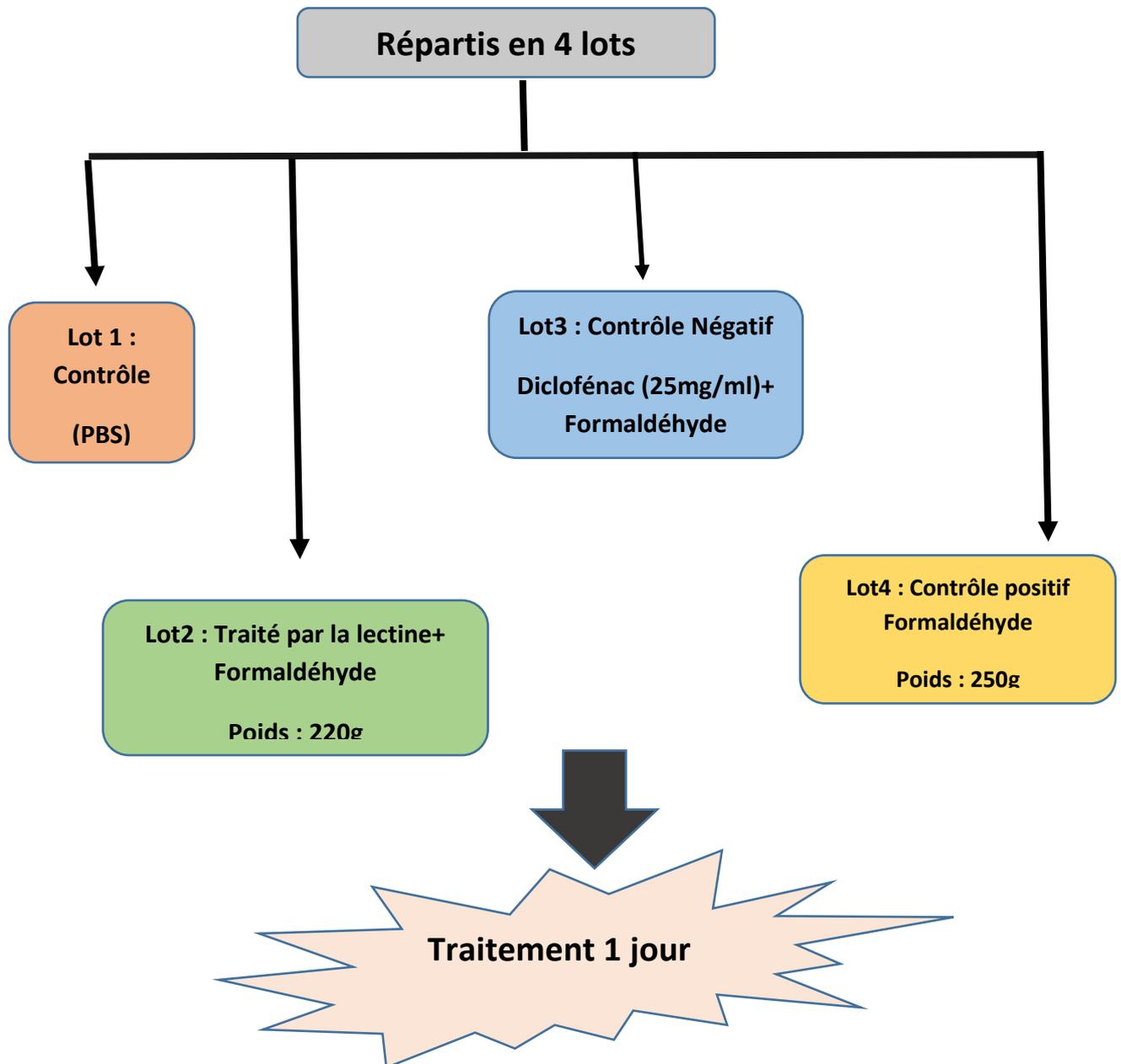
Tableau 11 : Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upretiet *al*, 1989)

Matière alimentaire	Quantité en g/Kg d'aliment	Pourcentage(%)
Mais	420	42
Saccharose	210	21
Son	60	6
Huile	20	2
Soja	260	26
VMV	30	3

12-2 L'induction de l'inflammation par le formaldéhyde



Figure26 : Rats Wistar utilisés



L'étude est réalisée sur 20 rats répartis en 5 lots pendant une journée :

1. Le premier lot est le lot contrôle qui ne reçoit aucun traitement (lot témoin).
 2. Le deuxième lot est traité par la lectine+formaldehyde.
 3. Le troisième par le diclofenac+formaldehyde.
 4. Le quatrième par le formaldéhyde uniquement (lot témoin négatif).
- L'œdème est provoqué par l'injection de 80µl de l'extrait (la lectine) par voie intrapéritonéale aux rats du 2^{ème} lot 30 minutes avant l'injection du formaldéhyde à raison de 10µL /25g de poids corporel.



Figure27 : injection intra-péritonéale des rats

30 minutes après ce traitement on injecte sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite des rats 80 μ l d'une solution de formaldéhyde à 2% pour provoquer l'inflammation (Sen et Nag, 1991) modifié.



Figure28 : injection dans l'aponévrose plantaire des rats

La classification de la réponse douloureuse est basée sur l'échelle suivante :

0 : les rats marchent ou s'appuient fermement sur la patte traitée et ne sentent aucune douleur.

1 : la patte traitée est partiellement levée.

2 : la patte traitée est franchement levée et semble douloureuse.

3 : le rat lèche, mâchonne ou agite la patte traitée et semble avoir mal.

- Les animaux sont placés dans une enceinte qui permet d'observer la patte traitée, l'effet anti-inflammatoire est déterminé selon le volume de l'œdème.

- Le 3^{ème} lot est traité par le Diclofénac, un anti-inflammatoire qui est utilisé comme référence à notre lectine, une demi-heure avant l'injection du formaldéhyde de la même façon que le 2^{ème} lot. Le 4^{ème} lot subira quant à lui seulement une injection sous le

coussinet plantaire de la patte arrière droite du rat du formaldéhyde pour provoquer l'inflammation.

Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0 ; 30 ; 60 ; 120 et 180 minutes après l'injection du formaldéhyde.



Figure29 : Mesure de l'œdème du pied du rat

Le volume du pied est déterminé par immersion dans une petite éprouvette en verre avec un diamètre interne de 2cm et une hauteur de 5cm fixée dans une boîte de pétri de 20cm de diamètre qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Le volume du pied qui correspond à la quantité d'eau déplacée qui déborde est directement lu sur les petites seringues.

Le volume de l'œdème VT à un temps t donné est :

$$VT = Vt - V_0$$

- V0 : le volume initial du pied,

- Vti: le volume du pied au temps t .

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est selon (Szekely et al., 1997) :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (VT_f - VT_a) / VT_f$$

- VTf: le volume de l'œdème chez les rats témoins ayant reçu uniquement le formaldéhyde,

- VTa : le volume de l'œdème chez les rats traités avec les extraits d'Agrocybe Aegerita.
Le nombre de rats utilisés pour chaque dose est de 5.

Cinquième PARTIE :
Résultats et Discussion

1-Dosage des protéines

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

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

Tableau 12 : résultats du dosage des protéines

	Absorbance (nm)		Concentration
	280	260	
S1	0.520	0.228	0.632
	F = 1/100	F = 1/100	

S1 : surnageant 1

F : facteur de dilution

Nos résultats montrent que notre surnageant présente une concentration en protéines non négligeable.

2-Résultats des tests d'hémagglutination

La plupart des lectines sont capables d'interagir avec des globules rouges. Si une solution des hématies est placée dans un puits, la sédimentation naturelle conduit à un dépôt des hématies au fond du puits. L'ajout d'une lectine permet la formation d'un réseau entre les hématies et les lectines, ces interactions forment une suspension gélatineuse homogène, ceci correspond au phénomène d'hémagglutination.

Afin de tester l'activité lectinique de notre champignon, des expériences d'hémagglutination sur des érythrocytes de lapin ont été réalisées :

Tableau 13 : résultats du test d'hémagglutination de l'extrait brut

	Extrait Brut				T-		
A							
Lecture	+++	+++	+++	+++	-	-	-

(+++): Très forte agglutination

(-): Pas d'agglutination

La lettre A marque le début de la microplaque de titration.

T- : témoin négatif

Les résultats obtenus montrent clairement la présence des substances ayant une activité hémagglutinante sur les hématies de lapin dans l'extrait brut soumis au test.

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

Afin d'évaluer l'activité hémagglutinante de l'extrait brut, on réalise un test de la limite d'hémagglutination. Approximativement, pour une concentration de départ précise, l'unité d'hémagglutination (UH) est définie comme étant le facteur de dilution à partir de laquelle l'hémagglutination n'est plus observée.

Tableau14 : Résultats du test de la limite d'hémagglutination

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Homogénat	A												
Lecture		+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-
T	B												
Lecture		-	-	-									

(+++) **: Très forte agglutination**

(++) **: Forte agglutination**

(+) **: Faible agglutination**

(-) **: Absence d'agglutination**

Ces résultats démontrent une très forte agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines de l'homogénat au niveau du premier puits (dilution 1/2) et du deuxième puits (1/4) ainsi que le 3ème et le 4ème puits (dilution 1/8 et 1/16) avec des concentrations de : (316µg/ml ; 158 µg/ml ; 79 et 39.5 µl/mg).

Elle diminue ensuite un peu au niveau du cinquième (dilution 1/32), du sixième (dilution 1/64) et du septième puits (1/128) avec respectivement des concentrations de : 19.75µg/ml ; 9.875µg/ml ; 4.937µg/ml. L'agglutination continue à diminuer mais persiste comme même jusqu'au huitième puits (dilution 1/256) avec une concentration de : 2.468µg/ml.

Cependant, l'activité hémagglutinante disparaît au niveau du neuvième puits (dilution 1/512) avec une unité hémagglutinante (UH) de : 1.234µg/ml.

Les résultats montrent que ces glycoprotéines possèdent des propriétés d'hémagglutination assez intéressantes puisqu'elles peuvent causer une hémagglutination des érythrocytes de lapin jusqu'à : 2.468 µg/ml.

Ces résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines contenues dans le champignon

« **TérfeziaBoudiéri** » appelé truffe blanche (champignon du Sahara algérien), ces dernières ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes jusqu'à 3,5µg/ml (**Zitouni et al., 2014**).

Tableau 15 : Dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm et 260nm

Dilution	Homogénat	Dilution	Homogénat
2	0.326	128	0.0049375
4	0.158	256	0.00246875
8	0.079	512	0.0012343775
16	0.0395	1024	0.0006171875
32	0.01975	2048	0.0003085938
64	0.009875	4096	0.0001542969

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

L'homogénat est incubé à 5 degrés différents de température (30°C ; 40°C ; 60°C ; 80°C ; 100°C), un test d'hémagglutination est ensuite effectué afin de voir jusqu'à quel degrés de température les lectines présentes dans l'homogénat peuvent-elles résister.

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

T°	Homogénat									Témoin négatif				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
30°C														
Lecture	++ +	+++										-	-	-
40°C														
Lecture	++	++										-	-	-
60°C														
Lecture	++ +	+++										-	-	-

80°C												
Lecture	++	++							-	-	-	
100°C												
Lecture	+	+							-	-	-	

T° : Température

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : Absence d'agglutination

Le traitement thermique de l'extrait brut « **d'AgrocybeAegerita** » à différentes températures de 30°C, 40°C, 60°C, 80°C, 90°C pendant une heure n'est pas vraiment suffisant pour inactiver totalement l'activité hémagglutinante. Ce résultat indique que nos hémagglutinines sont très résistantes à la température (thermorésistante).

Ces résultats indiquent que notre extrait contient des lectines qui peuvent résister à des degrés élevés de température pouvant aller jusqu'à 80°C. On remarque une forte agglutination à 30°C, 40°C et à 60°C et une diminution de cette dernière à 80°C.

A 100°C, il y'a une absence partielle d'activité hémagglutinante, ce qui veut forcément dire que les lectines présentes dans l'homogénat ont commencé à être dénaturées lors de ces incubations, ceci confirme que les lectines sont des molécules thermorésistantes.

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

Le test de la limite d'hémagglutination réalisé avec l'homogénat récemment incubé à 30°, 40°C ; 60°C ; 80°C (les températures auxquelles les lectines ont résisté).

Tableau 17 : Résultats du test de l'effet de température sur la limite d'hémagglutination

T°		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/12 8	1/25 6	1/52 1	1/10 24	1/20 48	1/40 96
30° C	H												
Lecture		+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
40° C	H												
Lecture		++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
60° C	H												
Lecture		+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
80° C	H												
Lecture		++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 °C	H												
Lecture		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T													
		-	-	-									

H : Homogénat

(+) : Faible agglutination

T : Témoin négatif

(-) : absence d'agglutination

(++) : Forte agglutination

A 30°C, il y'a une très forte agglutination dans les trois premiers puits qui diminue ensuite dans le quatrième, cinquième, sixième et septième puits et qui commence à disparaître dans le huitième puits (dilution 1/256) correspondant à la concentration : 3.824µg/ml.

A 40°C, il y a une forte agglutination au niveau des quatre premiers puits qui diminue au niveau du cinquième puits jusqu'au huitième et elle disparaît au niveau du neuvième puits (dilution 1/521) avec une concentration de : 1.8790µg/ml.

A 60°C, il y a une très forte agglutination au niveau du premier puits qui commence à diminuer au niveau du 2^{ème} et 3^{ème} puits et qui diminue totalement dans le 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} puits puis disparaît au niveau du 6^{ème} puits (dilution 1/64) avec une concentration de : 15.2968µg/ml.

A 80°C, le premiers puits montre une faible agglutination qui disparaît aussitôt dans le deuxième puits (dilution 1/4) correspondant à la concentration : 244.75µg/ml.

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

Du coup on déduit que la température optimale de la lectine de **l'AgrocybeAegerita** est : 100°C

Les lectines présentes dans le champignon **Agrocybe Aegerita** sont similaires aux lectines du champignon « Ganodermacapense », ces dernières ont une thermo-stabilité (thermo-résistance) spectaculaire, leur activité hémagglutinante n'est pas affectée même après exposition à 100°C pendant 60 minutes. (**Patrick H.K Ngai, 2004**).

➤ **Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et glycoprotéines**

Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinantes contenues dans la fraction active, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé.

Après avoir choisi le facteur de dilution, un test d'inhibition de l'hémagglutination est réalisé et représenté sur le tableau suivant :

Tableau18 : Résultats du test d'inhibition de l'hémagglutination par des saccharides et des glycoprotéines

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Di-sac	Lactose			Cellulose			Maltose			Saccharose		
												
Lecture	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyco-P	Fétuine			Inuline			BSA			Mucine		
												
Lecture	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyco-P	Ovalbumine			Caséine			Sorbose (mono-sac)			Monopyranoside (mono-sac)		
												
Lecture	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mono-sac	Raffinose			Inositol			sucrose			Xylitol		
												
Lecture	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mono-sac	Fucopyranoside			Galactose			Galactopyranoside			Fucose		
												
Lecture	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mono-sac	Glucosamine			Mannose			Glucose			Rhamnose		
												
Lecture	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
T												

Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T													
Lecture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Di-sac : disaccharides

Mono-sac : Monosaccharides

Glyco-p : Glycoprotéines

T : Témoin

L'échantillon a été incubé avec différents monosaccharides, disaccharides et glycoprotéines (21 sucres et 6 glycoprotéines).

D'après les résultats obtenus, L'ovalbumine , le Raffinose , l'inositol et le Mannose ont influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines provenant des champignons « **Agrocybe Aegerita** » en inhibant l'hémagglutination des hématies en fixant eux-mêmes les sucres présents au niveau de ces dernières et ont empêché l'action hémagglutinante de nos lectines car ils présentent probablement une meilleure affinité pour les sucres présents à la surface cellulaire des érythrocytes.

Ils sont attachés aux lectines et ont occupé le/les sites actifs (domaines de reconnaissance) censés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, sur ce, les lectines présentent une affinité pour ces sucres.

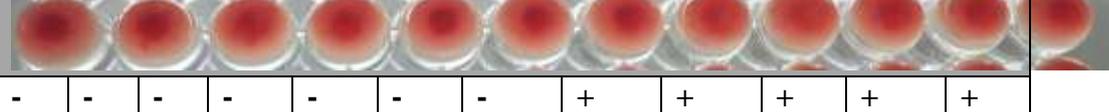
Quant aux autres sucres et glycoprotéines, ils n'ont pas influencé l'agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines provenant des champignons « **Agrocybe Aegerita** » ,ceci veut dire que ces dernières n'ont aucune affinité pour ces saccharides, par contre le saccharose, le ribose, l'arabinose ont inhibé l'agglutination des hématies, ceci dit, ces derniers se sont attachés aux lectines et ont occupé le/les sites actifs (domaines de reconnaissance) censés être occupés par les sucres présents sur la surface cellulaire des érythrocytes, sur ce, les lectines présentent une affinité pour ces sucres.

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

Afin de déterminer la concentration minimale à laquelle l'inhibition de l'agglutination n'est plus observée et de déduire par cela avec quel sucre nos lectines présentent une plus grande

affinité, un test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides (Raffinose, Inositol, Mannose) et l'Ovalbumine (glycoprotéine) est réalisé, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : résultats du test de la limite d'inhibition de l'hémagglutination par les saccharides et une glycoprotéine

		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
Ovalbumine	H												
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Raffinose	H												
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
Inositol	H												
Lecture		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Mannose	H												
Lecture		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
T													
Lecture		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

T : Témoin négatif

(+) : Présence d'agglutination

(-) : Absence d'agglutination 'inhibition'

Dans le cas du raffinose, on remarque une agglutination qui a lieu au niveau du dixième puits (dilution 1/1024) [raffinose] = 0.009mg/ml, ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que le raffinose présente une bonne affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines contenues dans notre homogénat. Ceci **indique que nos lectines ont une forte affinité avec le raffinose.**

L'inosite quant à lui présente une moindre affinité vis-à-vis des lectines par rapport à l'ovalbumine, l'agglutination apparait au niveau du huitième puits (dilution 1/256) avec une concentration égale à : 0.014mg/ml et s'accroît dans les quatre puits restants.

Concernant le Mannose, l'agglutination a lieu dans le huitième puits (dilution 1/256), [Mannose] = 0.014 mg/ml, ceci **indique que nos lectines ont une moindre affinité avec le Mannose.**

Sur ce, parmi les 21 saccharides utilisés, nos lectines présentent une affinité pour seulement trois d'entre eux, ceci dit, le degré d'affinité pour chacun d'entre eux est différent, **nos lectines sont donc spécifiques pour le raffinose** car c'est celui avec lequel elles présentent une plus forte affinité.

Ainsi que parmi les glycoprotéines utilisées, l'Ovalbumine a inhibé l'agglutination jusqu'au dernier puits (dilution 1/4096) avec une concentration de : 0.46mg/ml, ceci confirme nos résultats précédents qui montrent que l'Ovalbumine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines contenues dans notre homogénat.

Nos résultats ne sont pas similaires aux lectines AAL extraites à partir de « l'Agrocybe Aegerita » qui n'ont pas été inhibés par les saccharides utilisés : l'Inositol, le Raffinose, le Mannose mais elles ont présentées une grande affinité avec le Lactose ; Elles ont une forte affinité avec la glycoprotéine caséine qui n'est pas le cas dans nos résultats qui ont montrés une forte affinité avec l'Ovalbumine. **(Hui Sun, Chen Guang Zhao, Xin Tong and Yi Peng Qi, School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, China, 14 November 2002).**

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

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

3-Résultats après précipitation au sulfate d'ammonium

Tableau 20 : Résultats du test d'agglutination des fractions précipités par le sulfate d'ammonium

	F (0-40%)			F (40-80%)		
F						
Lecture	++	+	+	+++	+++	+++
T-						
Lecture	-	-	-	-	-	-

F : Fraction

T- : Témoin négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : absence d'agglutination

Deux niveaux de saturation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ont été utilisés pour purifier partiellement l'extrait brut ,le test dévoile la présence des lectines dans les deux fractions et cela montre que le sulfate d'ammonium a précipité différemment dans notre champignon « **Agrocybe Aegerita** »,mais la fraction (40-80%) est la plus active de l'extrait.

* Notre lectine de « **l'Agrocybe Aegerita** »à un taux de saturation par le sulfate d'ammonium similaire à la lectine AAL purifiée de la même espèce de champignon « **Agrocybe Aegerita** » précipitée également à 80% (**Chen Guang Zhao et al ,School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, China,2002**).

- Donc pour la suite du travail, nous avons opté pour poursuite la purification avec la fraction la plus active à savoir la fraction précipitée à 40-80%.

Cette fraction la plus active est dialysée par la suite afin d'éliminer toute trace de sulfate d'ammonium et d'impuretés avant de l'administrer dans la colonne de chromatographie.

4-Résultats de la dialyse de la fraction active (40-80%)

- Dosage des protéines

Après dialyse de la fraction active pendant 24h afin de purifier notre extrait, d'éliminer la trace du sulfate d'ammonium et toutes impuretés, un dosage des protéines par spectrophotomètre est réalisé.

Tableau21 : résultats du dosage des protéines après dialyse de la fraction active

	Absorbance (nm)		Concentration
	280	260	
Dialysat	0.485	0.318	0.510

5-Résultats de la purification des protéines par Chromatographie sur gel d'exclusion Séphadex G50

La chromatographie sur colonne de Séphadex G50 nous a permis de purifier notre échantillon et d'en extraire 82 fractions.

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

Tableau 22 : Résultats du dosage des 82 fractions obtenues après purification des protéines

F	Volume	Abs									
1	2	0.029	22	44	0.179	43	86	0.018	64	128	0.014
2	4	0.067	23	46	0.129	44	88	0.011	65	130	0.014
3	6	0.725	24	48	0.087	45	90	0.022	66	132	0.014
4	8	0.723	25	50	0.093	46	92	0.032	67	134	0.014
5	10	0.879	26	52	0.070	47	94	0.010	68	136	0.044
6	12	0.763	27	54	0.069	48	96	0.006	69	138	0.016
7	14	0.548	28	56	0.056	49	98	0.013	70	140	0.016
8	16	0.443	29	58	0.046	50	100	0.013	71	142	0.015
9	18	0.365	30	60	0.035	51	102	0.012	72	144	0.029
10	20	0.318	31	62	0.035	52	104	0.004	73	146	0.015
11	22	0.287	32	64	0.019	53	106	0.010	74	148	0.015
12	24	0.229	33	66	0.037	54	108	0.004	75	150	0.015
13	26	0.238	34	68	0.030	55	110	0.003	76	152	0.005
14	28	0.178	35	70	0.030	56	112	0.004	77	154	0.004
15	30	0.215	36	72	0.030	57	114	0.011	78	156	0.027
16	32	0.142	37	74	0.031	58	116	0.011	79	158	0.001
17	34	0.465	38	76	0.030	59	118	0.011	80	160	0.008
18	36	0.560	39	78	0.017	60	120	0.011	81	162	0.007
19	38	0.325	40	80	0.033	61	122	0.003	82	164	0.006
20	40	0.279	41	82	0.007	62	124	0.014			
21	42	0.231	42	84	0.008	63	126	0.014			

F : fraction

Abs : Absorbance

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

DO : f(x)

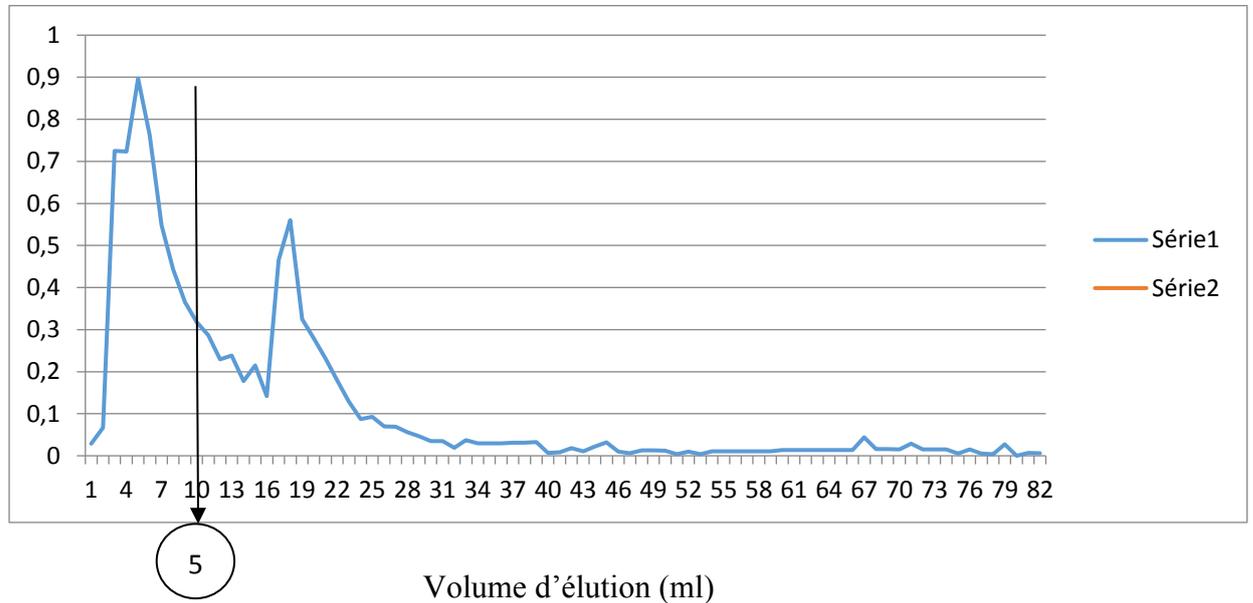


Figure 30 : Courbe représentant le profil d'éluion de l'absorbance en fonction du volume d'éluion des différentes fractions protéiques

Test d'hémagglutination après chromatographie

En se référant sur notre chromatogramme, un test d'hémagglutination est réalisé sur les tubes du premier pic majeur désigné par la flèche correspond en principe à une lectine élué de la 3^{ème} fraction a la 13^{ème} entre les volumes d'éluion de (6-8-10-12-14-16-18-20-22- 24-26ml).

Et le 2^{ème} pic de concentrations protéiques moyennes élué aux fractions (17-18-19 -20-21).

Tableau 23 : résultats du test d'hémagglutination réalisé avec les fractions des pics obtenues après chromatographie

F												
4												
Lecture	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

5												
Lecture	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
6												
Lecture	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
7												
Lecture	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
8												
Lecture	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	3				9				10			
Lecture	+++	+++	+++		++	++	++		++	++	++	
F	11				17				18			
Lecture	+++	+++	+++		-	-	-		-	-	-	
F	19				20				21			
Lecture	-	-	-		-	-	-		-	-	-	
T												
	-	-	-									

F : fraction

T : témoin négatif

Les résultats de ce test confirment ceux obtenus après dosage des 82 fractions, effectivement le pic d'absorbance obtenu au volume d'éluion de 10ml (fraction 5) correspond bien à une lectine.

On remarque une hémagglutination dans les fraction (3-4-6-7-8-9-10-11) dont le volume d'éluion correspond (6-8-12-14-16-18-20 et 22ml), on en déduit que ces dernières contient aussi une lectine.

Elles feront donc l'objet d'un test de pureté, de concentration, d'une lyophilisation et lors de l'utilisation de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

➤ **Résultat de l'effet du pH sur l'hémagglutination**

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau24 : Résultats de l'effet du pH sur l'hémagglutination de la fraction 40-80% dialysée du champignon « Agrocybe Aegerita »

pH		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/6 4	1/1 28	1/2 56	1/5 12	1/1 02 4	1/20 48	1/40 96
3	E												
Lecture		++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	E												
Lecture		+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
5	E												
Lecture		+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
6	E												
Lecture		+++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	E												
Lecture		+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+
9	E												
Lecture		+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
10	E												
Lecture		+++	+++	+++	+++	+++	++ +	++	++	++	++	+	-

11	E												
Lecture		+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
T-													
Lecture		-	-	-									

E : Extrait

T- : Témoin Négatif

(++) : Forte agglutination

(+) : Faible agglutination

(-) : absence d'agglutination

D'après les résultats obtenus :

* A pH = 3, il y'a une forte agglutination dans les deux premiers puits qui s'affaiblit dans le troisième puits jusqu'au septième, elle atteint sa limite dans le huitième puits (dilution 1/256) avec une concentration en lectines égale à : 1.99mg/ml, cette dernière ne change presque pas à pH = 4 où elle atteint sa limite dans le neuvième puits (dilution 1/512) avec une concentration en lectines égale à : 0.99mg/ml

*A pH = [5 ; 6] l'activité hémagglutinante atteint ses limites respectivement dans le septième (dilution : 1/128) et le huitième (dilution : 1/256) puits avec des concentrations égales à : 3.98mg/ml et 1.99mg/ml.

Cette dernière est à son apogée à pH = 8 qui montre une agglutination dans les douze puits et qui commence ensuite à diminuer progressivement à pH = [9 ; 10] avec la même agglutination dans les onze puits qui disparaît au niveau du douzième puits (dilution : 1/4096) avec une concentration de 0.12mg/ml.

* A pH = [11] l'agglutination de notre lectine persiste comme même jusqu'au neuvième puits qui disparaît au niveau de dixième (dilution : 1/1024) avec la concentration de 0.49mg/ml. Les pH très acides (entre 3, 4,5) affectent considérablement l'activité hémagglutinante, cependant au-delà d'un pH de 8, l'activité se stabilise, même à des pH très alcalins (pH 11). Ces résultats suggèrent fortement que notre lectine a un pHi basique se rapprochant de 8.

Ces résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec les lectines du même champignon « **Agrocybe Aegerita** », L'activité hémagglutinante d'AAL n'était presque pas changée après l'exposition à hauts pH. La résistance d'AAL au traitement de pH extrême a donné des résultats intéressants qui méritent d'autres études (**Hui Sun et al, 2002**).

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

7-Résultats de la Concentration des protéines

Après la centrifugation du tube concentrateur on obtient deux phases dans notre tube : une phase supérieure qui est nos protéines concentrées et purifiées, et une phase inférieure au fond du tube qui contient le tampon auquel les protéines ont été diluées.



Figure 31 : Résultats de la concentration des protéines

Les protéines concentrées sont ensuite versées dans une boîte de pétrie et on les conserve au congélateur à 4°C pour l'étape suivante : la lyophilisation.

8-Résultats de la lyophilisation

Après avoir concentré nos protéines et les avoir placés dans une boîte de pétrie au congélateur ; une lyophilisation est recommandée.

Nous avons procédé à la lyophilisation de l'extrait concentré pour éviter leur détérioration lors de la conservation et pour poursuivre notre purification avec le lyophilisat par une électrophorèse.

On a placé notre boîte de pétrie dans le lyophilisateur pendant 4h environ, on récupère notre boîte, on gratte le lyophilisat, on pèse notre poudre obtenue et la bien conserve dans un tube sec au congélateur.



Figure 32 : Poudre obtenue après lyophilisation

Nos résultats ont été comparés avec les résultats (d'ALI ; 2006).

9-Résultats SDS-PAGE

Les échantillons soumis à l'électrophorèse sont : le lyophilisat dilué, le mélange des neuf tubes avant lyophilisation, l'extrait brut et le dialysat, leurs concentrations sont reprises dans le tableau.

Tableau25 : Concentrations des échantillons soumis à l'électrophorèse

	Concentrations (mg/ml)
Lyophilisat	0.460
Mélange	0.482
Extrait Brut	0.632
Dialysat	0.510

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a donné le profil électrophorétique suivant :

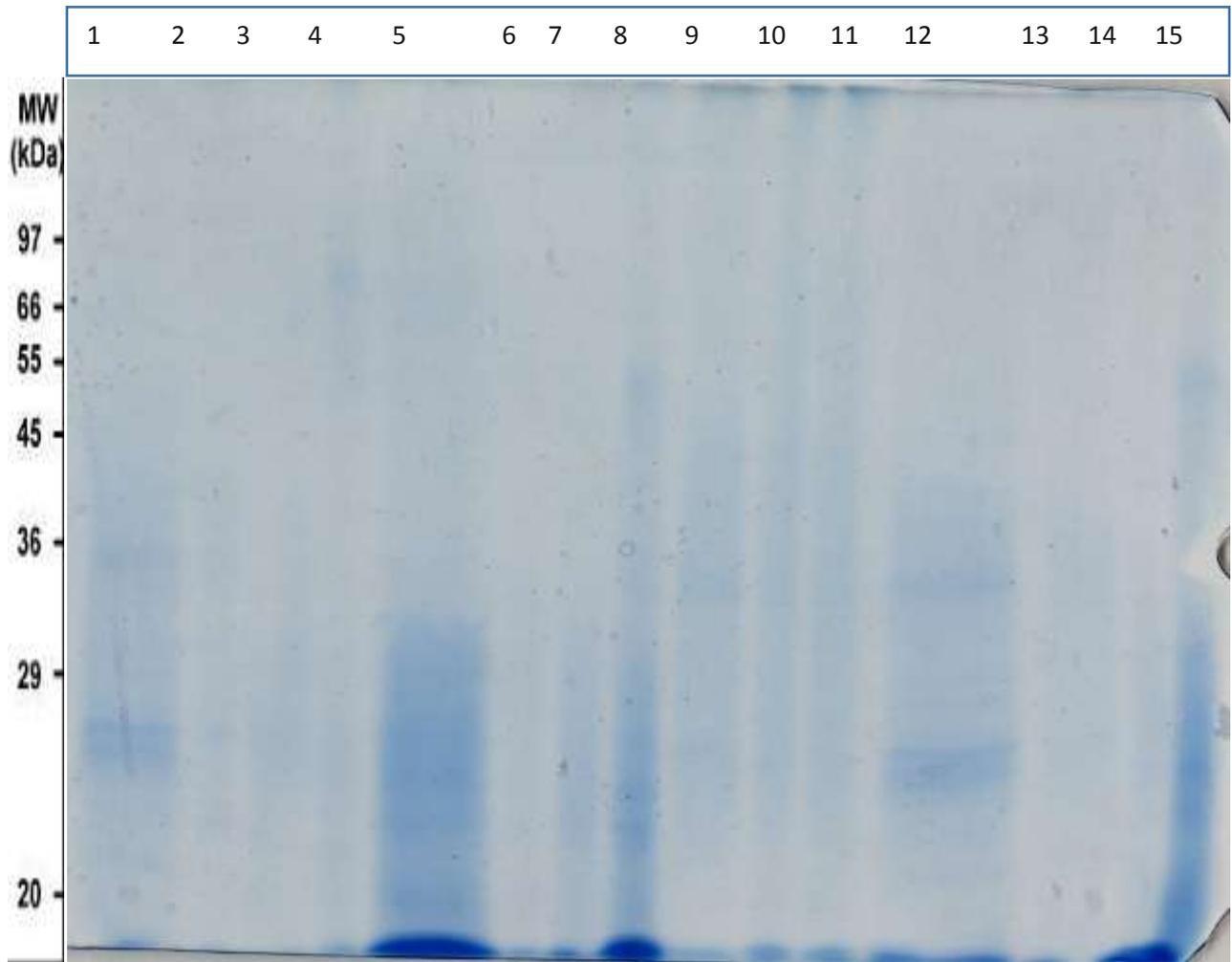


Figure33 : profil électrophorétique de quatre autres échantillons dans des conditions dénaturantes

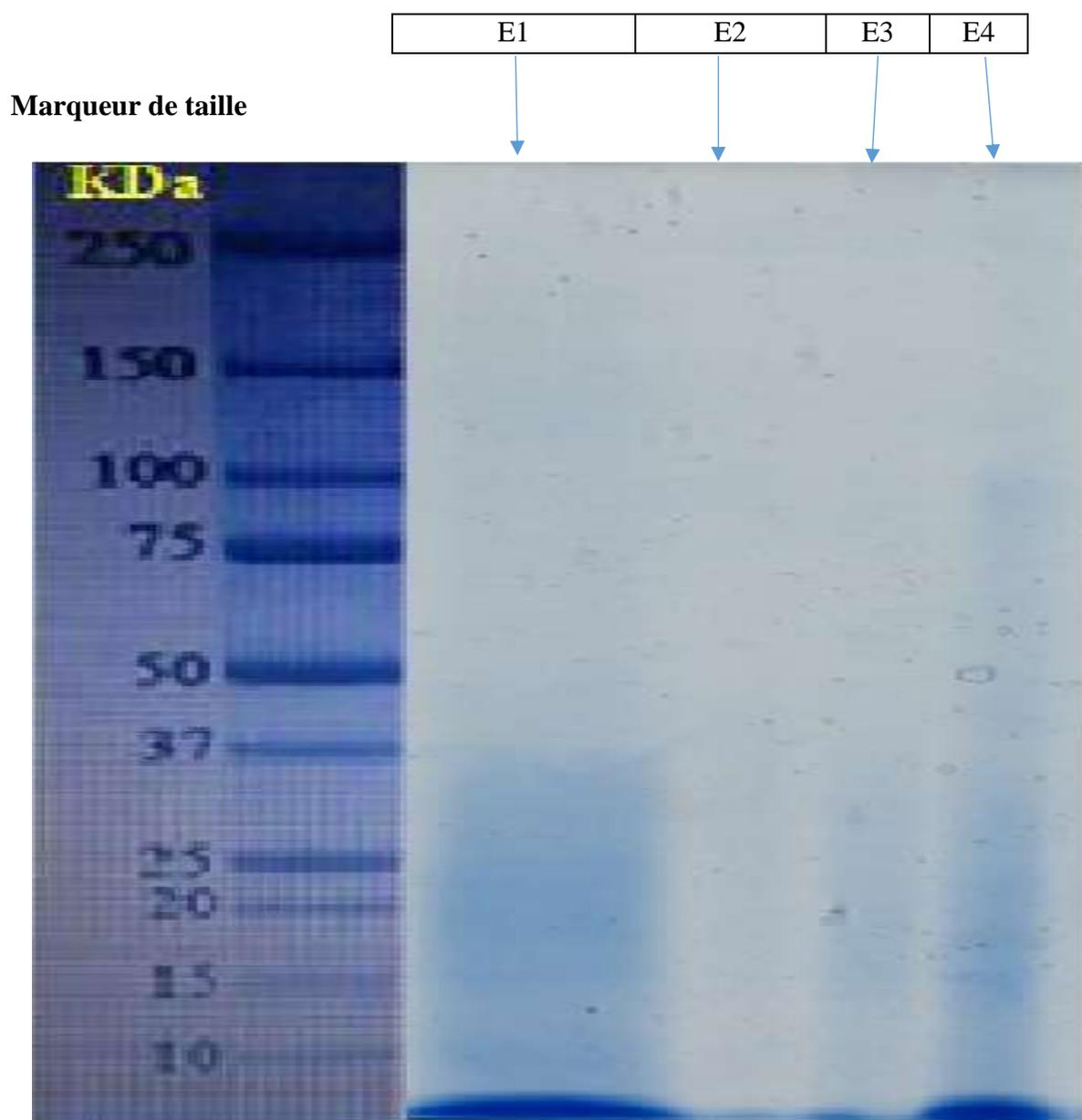


Figure34 : profil électrophorétique des échantillons dans des conditions dénaturantes d'Agrocye Aegerita

Tableau 26 : Dépôt des échantillons sur le gel d'électrophorèse

E1	Lyophilisat
E2	Mélange avant lyophilisation
E3	Extrait Brut
E4	Dialysat

La lecture de cet électro-phorégramme a pour but de relever la mobilité des bandes qui sont apparues en estimant les distances parcourues par chacune d'elles dans le gel de séparation, ceci permet d'évaluer la pureté et la masse moléculaire de chaque protéine en comparant avec la

migration électrophorétique et la masse moléculaire d'un standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire connu (**Précision Plus, protéine non colorée, Biorad**).

Le premier puits semble avoir une bande localisée à environ 100KDa qui disparaît dans le lyophilisat et ceci est logique après une étape de purification relative à la chromatographie d'exclusion moléculaire sur séphadex G50. Finalement il ne reste que cinq bandes certes difficilement observables avec tout de même une bande tranche à 8KDa qui est commune à toutes les lectines appartenant aux 4 échantillons analysés, et les quatre autres correspondent respectivement à des PM : 18, 20,25 et 36KDa.

Il en ressort finalement que nos lectines soient composées de cinq sous unités complètement hétérogènes. Une électrophorèse sans agent dénaturant serait souhaitable pour conclure à une structure composée d'un dimère et un trimère ou autres.

Ses résultats sont presque similaires à ceux obtenus avec des lectines extraites du champignon comestible « **Agrocybe Aegerita** » qui révèlent que les poids moléculaires des protéines des marqueurs sont : 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 14,4 kDa (**Hui Sun et al, School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, China, 14 November 2002**).

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

10-RESULTATS DE L'ETUDE DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DU CHAMPIGNON « AGROCYBE AEGERITA » CHEZ LE RAT WISTAR :

Tableau27 : Variation du volume de l'œdème chez les rats témoins et traités

Lot	Temps	Rats				
		1	2	3	4	5
Témoin	0 min	1	1	1	1	1
Formaldéhyde	30 min	2.5	2.6	2.5	2.6	2.5
	60min	3	2.8	2.7	2.4	2.5
	120min	3	3.1	3	3	2.6
Diclofénac + Formaldéhyde	30min	2.5	2.7	2.1	2	2.1
	60 min	2.3	2.3	2.2	2.3	2.1
	120min	2.1	2.4	2	1.9	2.4
Lectine+ Formaldéhyde	0min	1	1	1	1	1
	30min	0.1	0.2	0.4	0.4	0.3
	60 min	0.5	0.9	0.9	0.6	0.5

	120min	0.1	0.4	0.5	0.1	0.4
	180min	0	0.2	0.4	0.4	0.4

➤ **Analyses statistiques :**

Des comparaisons multiples entre les groupes ont été exécutées par des mesures répétées ANOVA.

Tableau 28 : inhibition de l'œdème provoqué par le formaldéhyde. chez différents lots de rats, suite à un prétraitement, par voie (ip), par l'extrait brut, la molécule de référence en l'occurrence le diclofénac et un lot témoin.

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Ligne 1	5	5	1	0
Ligne 2	5	12,7	2,54	0,003
Ligne 3	5	13,4	2,68	0,057
Ligne 4	5	14,7	2,94	0,038
Ligne 5	5	11,4	2,28	0,092
Ligne 6	5	11,2	2,24	0,008
Ligne 7	5	10,8	2,16	0,053
Ligne 8	5	5	1	0
Ligne 9	5	1,4	0,28	0,017
Ligne 10	5	3,4	0,68	0,042
Ligne 11	5	1,5	0,3	0,035
Ligne 12	5	1,4	0,28	0,032

Tableau29 : Résultats des statistiques significatives Anova de l'œdème

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Source de variation en groupe	58,5818333	11	5,3256212	169,51579	1,7565E-34	1,99458001
A l'intérieur	1,508	48	0.0314166			

des groupes			7
Total	60,0898333	59	

Résultats :

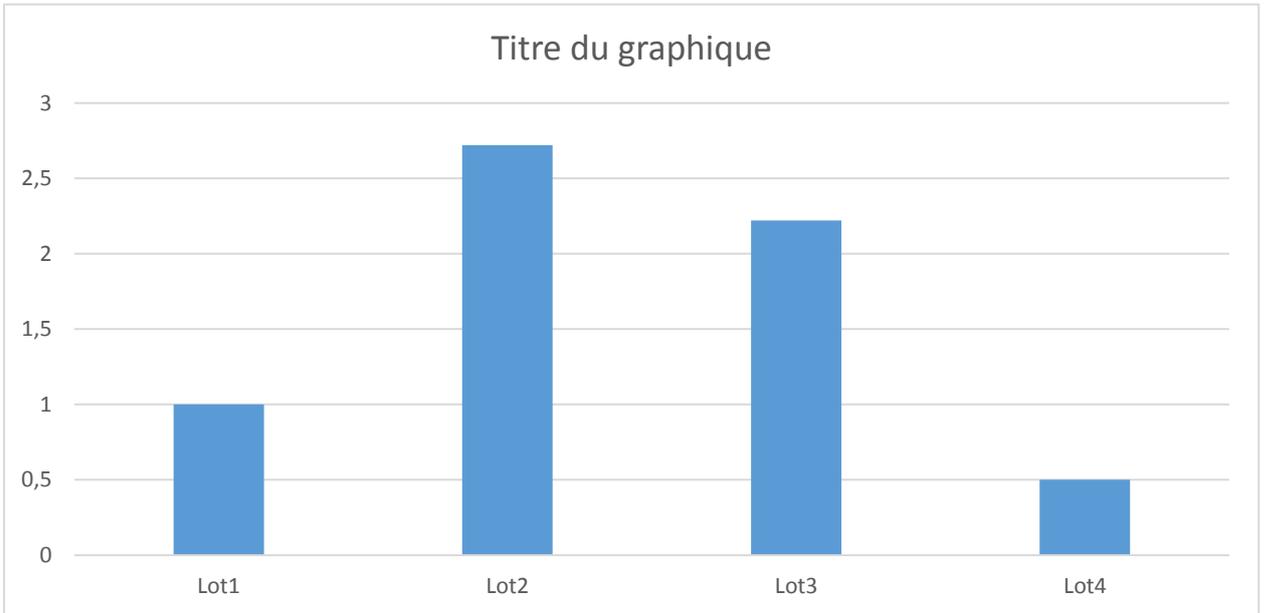


Figure 35 : histogramme de l'évolution de volume de l'œdème en fonction du temps

Lot 1	Témoin	Tampon PBS
Lot2	Contrôle +	Formaldéhyde
Lot3	Contrôle -	Diclofénac +formaldéhyde
Lot 4	Traité	Lectine + formaldéhyde

Le volume de l'œdème (l'état inflammatoire) induit par le formaldéhyde augmente avec le temps. Après 90 minutes il est de 2.72 ml Cette valeur correspond à un pourcentage d'augmentation de 57,34% par rapport au volume initial du pied.

Pour le lot du Diclofénac + formaldéhyde, le volume de l'œdème augmente également proportionnellement avec le temps. Il est de 2,22ml après, avec 90 minutes avec un pourcentage d'augmentation de 47.5% par rapport au volume initial, et de 0.5 ml après 180 minutes avec un pourcentage de 45.6%

En comparant ces résultats avec ceux du lot témoin qui donne un volume de 1ml avec un pourcentage de 20%, on remarque clairement que l'injection du formaldéhyde seul provoque une

très grande inflammation par rapport au lot négatif qui n'induit l'inflammation que de 10% grâce au Diclofénac (qui a été utilisé comme un anti inflammatoire).

Quant au lot traité par l'extrait +le formaldéhyde, on remarque qu'il a induit l'inflammation avec le temps de 20% par rapport au lot témoin. L'analyse de l'histogramme issue montre clairement l'influence engendrée par notre extrait de lectines.

On peut conclure aisément au vu des résultats obtenus que notre extrait (champignon) à réduit considérablement le volume de l'œdème. Avec beaucoup de réserves, et pour éviter toutes ambiguïtés, nous estimons qu'il va falloir procéder à d'autres types d'analyses pour pouvoir affirmer que nos lectines puissent avoir réellement un pouvoir anti –inflammatoire certain et comparable sinon mieux que celui du Diclofénac.

Notre champignon, comme tant d'autres pourrait donc être considéré comme un protecteur ayant un pouvoir anti- inflammatoire intervenant dans le métabolisme de différents organismes contre toutes formes d'agressions.

- L'analyse de ces résultats montre que notre extrait brut du champignon « **Agrocybe Aegerita** » a montré un effet anti-inflammatoire qui a induit une forte inhibition de l'inflammation à la première heure.

VI. Conclusions générales

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

Les lectines sont des glycoprotéines ubiquitaires qui se lient spécifiquement à différents motifs de sucres en raison de leur hydrate de carbone du domaine de reconnaissance.

Dans le cadre des travaux de recherche effectués, nous nous sommes intéressés à la caractérisation partielle des lectines extraites à partir du champignon « *Agrocybe Aegerita* ». Après séchage et extraction dans un tampon PBS (0.01M, pH 7.4) et une macération à froid pendant 24 heures, la détection et la quantification des lectines est réalisée par différents tests d'hémagglutination. Nous avons déduit que les lectines du champignon de « **Agrocybe Aegerita** » avaient la capacité d'agglutiner les érythrocytes, et c'est à partir de là que nous avons poussé nos recherches en effectuant plusieurs autres tests biologiques.

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

L'effet du pH sur l'hémagglutination des érythrocytes de lapin en présence de lectines extraites du champignon « *Agrocybe Aegerita* » et les résultats obtenus après dialyse ont prouvé que ces dernières avaient un pH Optimum basique (au voisinage de 8).

De plus, nous avons démontré que ces lectines avaient une affinité avec des saccharides dont, le Raffinose, l'Inositol et le Mannose ; ces derniers peuvent adhérer au site de reconnaissance des lectines, mais elles semblent avoir une spécificité envers essentiellement le Raffinose.

L'Ovalbumine qui est une glycoprotéine présente une meilleure affinité vis-à-vis des sucres présents dans les érythrocytes par rapport aux lectines des champignons « d'*Agrocybe Aegerita* ».

L'extrait brut du champignon « *Agrocybe Aegerita* » a subi une précipitation graduelle par le sulfate d'ammonium à froid. L'analyse de l'activité agglutinante de fractions précipitées montre que c'est la fraction 40-80% qui est la plus riche en lectine.

Après dessalage par dialyse au contact du PBS, nous avons procédé à une purification par le biais d'une chromatographie sur gel d'exclusion Sephadex G50.

Le résultat obtenu nous révèle une courbe dans laquelle est mis en évidence un seul pic d'activité, ce pic unique nous renseigne sur l'existence soit, d'une seule forme moléculaire soit de plusieurs sous unités de PM voisins.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium nous a permis d'estimer la pureté de notre lectine. Elle se compose apparemment de cinq sous unités complètement hétérogènes qui correspondent à des PM de 8, 18, 20,25 et 36 KDa. Afin de nous assurer réellement que ces cinq bandes soient des lectines il serait préférables d'analyser chaque bande à part par une technique appropriée, et la soumettre de nouveau à un test d'hémagglutination suivie d'une observation au microscope.

Après les tests anti-inflammatoires on peut conclure aisément au vu des résultats obtenus que notre extrait du champignon « **Agrocybe Aegerita** » à réduit considérablement le volume de l'œdème. Avec beaucoup de réserves, et pour éviter toutes ambiguïtés, nous estimons qu'il va falloir procéder à d'autres types d'analyses pour pouvoir affirmer que nos lectines puissent avoir réellement un pouvoir anti –inflammatoire certain et comparable sinon mieux que celui du Diclofénac.

➤ **Perspectives**

Les travaux que nous avons effectués sont une initiation à de nombreuses autres perspectives, la poursuite des recherches sur ces lectines impliquerait au préalable l'utilisation de plusieurs autres techniques d'analyse biochimique et méthodes permettant de fournir une très bonne caractérisation et purification de ces protéines.

Plusieurs axes doivent être menés :

- 1- Purifier la lectine par chromatographie d'affinité avec comme ligand, le raffinose, HPLC.
- 2- Faire une spectrophotométrie de masse pour déterminer la masse moléculaire et la structure de la lectine, la séquence glucidique.

3- Une électrophorèse en conditions non dénaturantes pourrait être réalisée afin de confirmer les résultats obtenus en conditions dénaturantes et pour conclure à une structure composée d'un dimère et un trimère ou autre.

4- Ce travail mériterait également d'être étoffé par une étude cristallographique en vue de déterminer les structures en 3D des lectines et ainsi les comparer avec d'autres structures connues.

5- Les résultats de ces recherches pourraient également être suivis par des études sur :

- L'Activité antioxydante.
- L'Activité immunologique.
- L'Activité anticancéreuse.
- L'Activité antidiabétique.

Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

Références bibliographiques

ABDELJALIL. D., ESSAM. A. S., LOTFI. A. The Relationship Between Lectin Compounds and Immunomodulatory Activities of Protein Extracted From Plants. *Journal of Plant Studies*, **2014**. 35(1): 1927-0461.

Andrew S A, Randy C F, Xiuli D, Yau SC, Wenliang P, Tzi BN. (2014) .Purification and Characterization of a Glucosamine- Binding Antifungal Lectin from Phaseolus vulgaris cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*.172, 672–686.

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

Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, Nogueira NA, Cavada BS and Vale MR. (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from Lonchocarpus sericeus seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*.(57) , 919-922.

ATALAH. B. A., DE VLEESSCHAUWER. D., XU. J., FOUQUAERT. E., HÖFTE. M., VAN DAMME. E. J. Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins towards important abiotic and biotic stresses. *J. Plant Physiol*, **2014**. 171: 986–992.

Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L. et al., (1991) Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67, 233.

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

BABOSA. T. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2001**. 95 (5): 673-678.

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

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

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

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

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

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

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

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

GRANT. G. Lectins. In *toxic substances in crop plants.*ed.by the royal Society oh Chemistry, 1991. p: 339.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Pemberton 1994.** Agglutinins from some british higher fungi. *Mycol.Res.*, 98, 277-290.
- Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008)** Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 1579-1591.
- Poiroux G.** (2011). Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux : Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et biochimie.* Toulouse. Université Toulouse III - *Paul Sabatier.* Pp, 35-50.
- Patrick H.K Ngai** *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 314, Issue 4, 20 February 2004, Pages 988–993.
- RUDIGER. H.** Purification of plant lectins. In Gabius, H.J.G., S. (ed), *Lectins and Glycobiology.* Springer, Berlin, **1993.** Pp: 31-46.
- Rudiger, H., and Gabius., H.J. (2001)** Plant lectins.Occurence,biochemetry,funtions and applications.*Glycoconj .J*,18,589-613.
- RENKONEN K. O.** Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)*, **1948.** 26: 66.
- Renato De A, Moreira. (1991).**Plant lectins, chemical and biological aspects.*Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro. Vol. 86. Suppl. II, 211-218.
- REPON. K. S., SRIJAN. A., MAHA. J., ROY. P., SOHIDUL. M.J., SHOVON. S. H .** Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa.* *The Journal of Phytopharmacology*, **2014.** 3(1): 44-51.
- RAQUEL. L., BENEVIDES. R. G.** Caractérisation biochimique et structural d'une lectine de grains de *Platypo dium elegans vogel.* *Biologie Structurale et Nanobiologie.* France. Université de Grenoble et Universidade Federal do Cearà, **2011.** p: 11.
- SHARON. N., LIS. H.** Legume lectins-A large family of homologous proteins. *FASEB J*, **1990.** 4: 3198–3208.
- SHARON. N. (1996)** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med.Biol.*, 408: 1-8.
- Sharon,N.and Halima,Lis.(2003)***Lectins.*Kluwer Academic Publishers.
- SHARON. N., LIS. H.** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004.** 14: 53-62.

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

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

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

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

SOUZA. M. A., CARVALHO. F. C., RUAS. L. P., AZEVEDO. R. R., ROQUEBARREIRA. M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, **2013**. 30:641-657. **Suzuki, T., Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi and H. Dohra et al, 2009.** Purification characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens* biosci.

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

TANAKA. H., CHIBA, H., INOKOSHI. J., KUNO. A., SUGAI. T., TAKAHASHI. A.,ITO. Y., TSUNODA. M., SUZUKI. K., TAKÉNAKA. A. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**. 106: 15633-15638.

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

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

Wiley,D.C,and Skehel,J.J.(1987).The structure and function of the hemagglutinin.

Wu AM, Sugii S, Herp A. (1988). A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, 819-847.

WIMER. B. M. Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm*, **1996**. 11: 57-75.

Wang H, Ng TG. (1998). Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantica*) seeds: sequence comparison with related protein. *Biochemical and biophysical research communication*. 253, 143-146.

Weiwei Zhang, Guotin tian, Xueran Geng, Yongchang Zhao, Tzi Bun Ng, Liyan Zhao et Hexiang Wang. Isolation et caractérisation d'une nouvelle lectine à partir du champignon comestible *Stropharia rugosoannulata* 2014.

Xu S, Wang L, Wang X W, Zhao YR, Bi WJ, Zhao XF, Wang JX. (2014). L-type lectin from the kuruma shrimp *marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 397–405.

YOUNG. N. M., OOMEN. R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins: A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 1992, 228, 924–934.

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

Zitouni. A ; Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques de *Terfèzia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara) 2014.

Annexes

Annexe 1 : Préparation du tampon phosphate di-sodique (PBS) (0,1M ; pH = 7,4). Pour 1000ml de PBS

Réactif	Concentration	Quantité
phosphate di-sodique (Na ₂ HPO ₄)	10 mM	1,44g
Phosphate de mon potassium (KH ₂ PO ₄)	2 mM	0,24g
Chlorure de Sodium (NaCl)	137 mM	8g
Chlorure de Potassium (KCl)	2,7 mM	0,2g
Eau distillée		1L

Annexe 2 : Préparation de NaCl à 0.9%

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

Annexe 3 : Solutions préparées pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

➤ Solutions mère d'acrylamide à 40%

Acrylamide	40g
Eau distillée	100ml

➤ Solution mère de Bisacrylamide à 2%

Bisacrylamide	2g
Eau distillée	100ml

➤ Solution stock de SDS à 10%

Sodium dodécylsulfate (SDS)	10g
Eau distillée	100ml

➤ Solution d'Ammonium persulfate APS à 1%

APS	0,1g
Eau distillée	10ml

➤ **Tampon Tris HCl pH = 8,8**

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

➤ **Tampon Tris HCl pH = 6,8**

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

➤ **Tampon d'électrophorèse**

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

Annexe 4 : Préparation du gel de séparation (T : 12,52% ; C : 0,97%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	11,95
Bisacrylamide 2%	2.4
Eau ditillée	8,25
Tris HCl pH = 8,8	14,65
SDS 10%	0,5
APS 1%	1
TEMED	0.02

Annexe 5 : Préparation du gel de concentration à 4% (T : 2,88% ; C = 1,42%)

Réactif	Volume (ml)
Acrylamide 40%	1
Bisacrylamide 2%	0.3
Eau ditillée	10.2
Tris HCl pH = 6,8	1,7
SDS 10%	0,14
APS 1%	0,7
TEMED	0,014

Annexe 6 : Préparation d'une solution de Coloration pour le gel d'électrophorèse

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

➤ Solution mère de Bleu de coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	5g
Ethanol 95°	500ml

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

Annexe 7 : Absorbances et concentrations des cinquante fractions obtenues après purification des lectines sur colonne de DEAE-Cellulose

Fraction	Absorbance à 260nm	Absorbance à 280nm	Concentration (mg/ml)
1	0.030	0.029	0.056
2	0.056	0.067	0.098
3	0.311	0.725	0.825
4	0.354	0.879	0.780
5	0.354	0.763	0.848
6	0.022	0.548	0.026
7	0.276	0.443	0.500
8	0.211	0.365	0.518
9	0.228	0.318	0.505
10	0.142	0.287	0.392
11	0.112	0.229	0.341
12	0.054	0.238	0.141
13	0.046	0.178	0.133
14	0.041	0.215	0.094
15	0.001	0.142	0.002
16	0.011	0.465	1.044
17	0.154	0.560	0.408
18	0.149	0.325	0.356
19	0.118	0.279	0.266
20	0.108	0.231	0.182

21	0.121	0.179	0.171
22	0.101	0.129	0.092
23	0.082	0.087	0.088
24	0.066	0.093	0.006
25	0.054	0.070	0.116
26	0.046	0.069	0.085
27	0.274	0.056	1.013
28	0.128	0.046	0.660
29	0.145	0.035	0.402
30	0.097	0.035	0.234
31	0.069	0.019	0.190
32	0.059	0.019	0.152
33	0.066	0.037	0.154
34	0.067	0.030	0.139
35	0.057	0.031	0.148
36	0.045	0.017	0.061
37	0.035	0.0033	0.072
38	0.035	0.007	0.038
39	0.035	0.008	0.036
40	0.028	0.018	0.026
41	0.027	0.011	0.002
42	0.026	0.022	0.022
43	0.026	0.032	0.056
44	0.002	0.010	0.003
45	0.002	0.006	0.003
46	0.022	0.013	0.008
47	0.021	0.012	0.007
48	0.023	0.004	0.009
49	0.035	0.004	0.012
50	0.033	0.020	0.030
51	0.035	0.020	0.019
52	0.025	0.007	0.020
53	0.021	0.007	0.015
54	0.056	0.026	0.025
55	0.065	0.033	0.040
56	0.033	0.023	0.027
57	0.045	0.011	0.012
58	0.025	0.011	0.012
59	0.034	0.011	0.013
60	0.032	0.011	0.013

61	0.025	0.003	0.010
62	0.020	0.004	0.011
63	0.025	0.014	0.013
64	0.033	0.014	0.015
65	0.014	0.014	0.010
66	0.034	0.014	0.011
67	0.054	0.014	0.011
68	0.068	0.016	0.014
69	0.036	0.015	0.013
70	0.068	0.029	0.005
71	0.059	0.015	0.013
72	0.048	0.015	0.013
73	0.052	0.017	0.040
74	0.033	0.029	0.016
75	0.056	0.027	0.022
76	0.064	0.028	0.012
77	9.934	0.003	0.009
78	0.0280	0.004	0.006
79	0.043	0.005	0.008
80	0.057	0.006	0.007
81	0.078	0.006	0.009
82	0.051	0.006	0.008

Le calcul des Concentration a été effectué selon la méthode de Warburg et Christian :
[Protéine] (mg/ml) = 1,55(A280) - 0,76(A260)

**Purification, caractérisation partielle des lectines extraites du
champignon****« Agrocybe Aegerita »****Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de
Master en Biochimie Appliquée**

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines ubiquitaires, multivalentes de nature non-immunitaires qui sont capables de reconnaître et se lier spécifiquement et de manière réversible aux fractions glucidiques des hydrates de carbone complexes sans modifier la structure covalente des ligands glycosylés reconnus, qui provoquent dans certains cas l'agglutination des érythrocytes.

Les champignons y compris les moisissures appartiennent à une division importante d'organismes et elles présentent un large éventail d'activités biologiques importantes pour le fonctionnement de la cellule et de l'organisme entier, et en raison de la haute spécificité de la liaison réversible aux hydrates de carbone, elles sont des outils précieux largement utilisés en biologie et en médecine et aussi en diverses applications biotechnologiques.

Ici, nous passons en revue et analysons avec une caractérisation partielle ce qui est actuellement connu sur les lectines isolées à partir du champignon « AgrocybeAegerita » dit Pholiote du peuplier, y compris leur localisation, leurs propriétés et leurs spécificités glucidiques.

Ces protéines ont été extraites et soumises à plusieurs tests afin d'y rechercher une activité hémagglutinante, rendre compte de leur pHi, leur thermo-stabilité et leurs interactions et affinités avec les sucres. Elles ont ensuite été partiellement purifiées à l'aide d'une chromatographie sur gel d'exclusion. La pureté de la lectine ensuite a été vérifiée par une (SDS-PAGE) dans des conditions dénaturantes.

Les effets anti-inflammatoires du champignon « AgrocybeAegerita » ont été évalués sur les rats wistar de poids allant de 200 à 220 grammes.

L'extrait brut du champignon est administré par voie intra péritonéale 30 minutes avant l'induction de l'inflammation (l'œdème du pied) par 0.1ml de formaldéhyde à 2%, la drogue de référence est un anti-inflammatoire le "Diclofenac"25mg.

Mots Clés : Lectines ; affinité ; Agglutination ; Purification.

Laboratoire : Biochimie

Membres du jury :

Président du jury : Mr Necib.Y

Professeur - UFM Constantine.

Encadreur : Mr Zitouni.A

Maitre de Conférence UFM Constantine

Examineurs : Mr *Hafi.A*

Maitre-Assistant. UFM