



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie      **قسم :** ميكروبيولوجيا.

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

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

**Filière :** Ecologie et Environnement

**Spécialité :** Ecologie Microbienne

**Intitulé :**

---

**Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des  
lectines extraites et partiellement purifiées du champignon  
*Laetiporus sulphureus***

---

**Présenté et soutenu par :** ABDOU Lina Roumeissa

**Le :** 07/07/2019

KACHROUD Hibat Allah

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** ZITOUNI Abdelbaki (Maitre de conférences classe B - UFM  
Constantine).

**Rapporteur :** BOULAHROUF Khaled (Maitre de conférence classe B –UFM Constantine).

**Examineurs :** ABDELAZIZ Ouidad (Maitre assistant classe A- UFM Constantine)

*Année universitaire  
2018 - 2019*

## **Remerciement**

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements et notre profonde reconnaissance à notre encadrant Mr. Khaled BOULAHROUF Maitre conférence classe B au département de Microbiologie de l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour l'orientation, la confiance, la patience, la disponibilité qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leur proposition.

Nous remercions Monsieur ZITOUNI Abdelbaki président de jury et Maitre de conférences classe B au département de Biochimie et à Madame ABDELAZIZ Ouidad l'examineur de notre mémoire Maitre assistant classe A au département de Microbiologie de l'université des Frères Mentouri de Constantine. C'est un réel plaisir pour nous que vous ayez participé au jury de ce mémoire.

Nos remerciements s'étendent également à Mlle LOUCIF Karima et à Mr. TOUMI Mouhammed Esseddik doctorant au laboratoire Génie Microbiologique et Applications pour leurs accueils, leurs précieux conseils et leurs aides durant toute la période du travail.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Liste des abréviations

BSA	Bovin serum albumine
Con A	concanavaline A
DC-SIGN	Dendritic Cell –specific ICAM- Grabbing non-integrin
Fuc	fucose
Gal	galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GN	gélose nutritive
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
Man	mannose
NeuAc	acide N-acétylneuraminique
PA-IIL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin
PBS	Phosphate-buffered saline
PHA	phytohemagglutinin lectin
PHA-L ; PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> lectin
PWM	<i>Phytolacca americana</i> lectin
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

## Liste des figures

- Figure 1 :** rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.....7
- Figure 2 :** Représentation graphique d'un monomère de concanavaleine A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN). La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins b, un ruban rouge pour les hélices a et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations.....9
- Figure 3 :** Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (code PDB 1HGF) (**Lenka et al., 2006**).....9
- Figure 4 :** représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli*. (**Lis and Sharon, 1998**).....10
- Figure 5 :** photo prise par R.McNeil Qui représente le *Laetiporus sulphureus* qui s'étant sur un arbre au Canada.....19
- Figure 6 :** le *Laetiporus sulphureus* qui s'étende sur plus de 6 mètre le long du tronc d'arbre en décomposition, photo prise par Hilary Hamilton.....20
- Figure 7 :** test d'hémagglutination de l'extrait brut de *Laetiporus sulphureus* en présence d'érythrocytes du lapin.....30
- Figure 8 :** Purification préliminaire de l'extrait brut du champignon *Laetiporus sulphureus* sur colonne Sephadex G-50.....31
- Figure 9 :** test d'agglutination des deux pics (A et B) obtenus par la chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-50), accompagniez du test témoin.....32
- Figure 10 :** Purification préliminaire de l'extrait brut du champignon *Laetiporus sulphureus* sur colonne échangeuse d'ions (DEAE-cellulose).....33

<b>Figure 11 :</b> test d'agglutination des deux pics (A1 et B1) obtenus par la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions, avec le test témoin.....	34
<b>Figure 12 :</b> résultat du test de l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de la fraction active B1.....	36
<b>Figure 13 :</b> résultats de l'effet de différent pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction actif B1.....	36
<b>Figure 14 :</b> test d'activité antibactérien et antifongique de l'extrait brut et la fraction active sur quatre souches bactériennes de la gamme ATCC et deux souches de champignons filamenteux.....	37-39

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : historique des lectines ( <b>Renato et al., 1991</b> ). .....	5
<b>Tableau 2</b> : propriétés biologiques des lectines ( <b>Santosh et al., 2013</b> ).....	11
<b>Tableau 3</b> : récapitulatif des lectines répertoriées.....	12
<b>Tableau 4</b> : lectines de champignons connues ( <b>Pemberton, 1994</b> ).....	16
<b>Tableau 5</b> : classification scientifique de <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	19
<b>Tableau 6</b> : tableau qui décrit l'aspect de quelques parties importantes qui constituent le <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	21
<b>Tableau 7</b> : caractéristique de l'extrait brut des lectines après purification partielle par la chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-50) du champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	32
<b>Tableau 8</b> : caractéristique de l'extrait brut des lectines après purification partielle par la chromatographie échangeuse d'ions du champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	33
<b>Tableau 9</b> : résultats du test d'inhibitions de l'hémagglutination de la fraction actif B.....	34-35
<b>Tableau 10</b> : test d'activité antibactérienne et antifongique de la fraction active sur les quatre souches bactériennes ATCC et les deux souches de <i>Candida albicans</i> .....	37

## Résumé

Ce travail, repose sur l'extraction, la purification des lectines du champignon de l'espèce *Laetiporus sulphureus*, et l'étude de leurs propriétés glucidiques et activités antimicrobiennes. Les lectines de la fraction intracellulaire de *Laetiporus sulphureus* ont subi une purification primaire sur gel G-50. Deux pics ont été observés (pics A et B). Le pic A ne présente aucune activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 58.09 UH/mg, et elle est passée à 20.08 UH/mg.

Deux pics ont été observés (pics A1 et B1) après la deuxième purification sur une colonne échangeuse d'anion (DEAE-Cellulose). Le pic B1 représente une activité hémagglutinante, ainsi qu'une activité spécifique de 14.8 UH/mg. La fraction active est inhibée par le monosaccharide (lactose) à une concentration de 0.125 mg/ml. Cette dernière persiste à des pH entre 5 et 9 et diminue à des pH moins de 5. Ainsi, elle persiste à des températures entre 40-60°C, diminue à 80°C et totalement inhibée à 100°C.

L'activité antimicrobienne de la fraction active et de l'extrait brut présente une inhibition contre la souche *Candida albicans* 570 à une concentration de :

-pour l'extrait brut pour les trois volumes de 30µl, 50 µl et 70 µl les concentrations sont comme suit : 1.74 mg/ml, 2.9 mg/ml et 4.06mg/ml.

- pour la fraction active B1 quatre volumes utilisés pour le test de 30µl, 50 µl, 70 µl et de 100 µl, les concentrations sont comme suit : 0.002 mg/ml, 0.74mg/ ml, 1.03mg/ml et 1.48 mg/ml.

**Mots clés :** *Laetiporus sulphureus*, lectines, activité hémagglutinante, chromatographie G-50, chromatographie (DEAE-Cellulose), activité antimicrobienne.

## Abstract

This work is based on the extraction, the purification of lectins from the fungus *Laetiporus sulphureus*, and the study of carbohydrate properties and antimicrobial activities. The lectins of the intracellular fraction of *Laetiporus sulphureus* underwent a primary purification on G-50 gel. Two peaks were observed (peaks A and B). Peak A shows no hemagglutinating activity. However, the specific activity of the crude extract was 58.09 HU / mg, and it increased to 20.08 HU / mg.

Two peaks were observed (peaks A1 and B1) after the second purification on an anion exchange column (DEAE-Cellulose). Peak B1 represents a hemagglutinating activity, as well as a specific activity of 14.8 HU / mg. The active fraction B1 is inhibited by the monosaccharide (lactose) at a concentration of 0.125 mg / ml. The latter persists at pH between 5 and 9 and decreases at pH less than 5. Thus, it persists at temperatures between 40° and 60 ° C, decreases at 80 ° C and is fully inhibited at 100 ° C.

The antimicrobial activity of the active fraction and the crude extract inhibit the development of the strain *Candida albicans 570* at a concentration of is:

-for the three volumes of 30µl, 50 µl and 70 µl the concentrations are as follows: 1.74mg / ml, 2.9mg / ml and 4.06mg / ml.

-for the four volumes B1 fraction used for the tests 30 µl, 50 µl, 70 µl and 100 µl, at the concentrations are as follows: 0.002 mg / ml, 0.74 mg / ml, 1.03 mg / ml and 1.48 mg / ml.

**Keywords:** *Laetiporus sulphureus*, Lectins, hemagglutinating activity, Chromatography G-50, Chromatography (DEAE-Cellulose), Antimicrobial activity.



## المخلص

يهدف هذا البحث إلى استخلاص، تنقية اللكتينات الفطرية من النوع *Laetiporus sulphureus* ودراسة خاصيتها السكرية ودراسة نشاطها المضاد للبكتيريا. خضعت اللكتينات الداخل خلوية للفطر *Laetiporus sulphureus* إلى تنقية أولية عن طريق الترشيح على هلام الترشيح G-50. فنتجت عنها ذروتا (الذروة A و B). لم تظهر الذروة A أي نشاط تراص دموي. ومع ذلك بلغ النشاط النوعي للمستخلص الخام 50.09 وحدة تراص/مغ و انخفضت إلى 20.08 وحدة تراص/مغ.

تمت التنقية الثانوية عن طريق عملية الفصل الكروماتوغرافي على عمود تبادل الايونات (DEAE-Cellulose) حيث تمت ملاحظة ذروتان (الذروة A1 و الذروة B1). فأظهرت الذروة B1 نشاط تراص دموي و نشاط نوعي يقدر ب 14.8 وحدة تراص/مغ. يتم تثبيط المستخلص المنقى بالسكر الأحادي اللاكتوز بتركيز يقدر ب 0.125 مغ/مل .

نشاط التراص الدموي للمستخلص المنقى يقاوم درجات الحموضة التي تتراوح ما بين 5 و 9، بالإضافة إلى مقاومته درجات الحرارة التي تتراوح ما بين 40 و 60 درجة مئوية (40-50 و 60 درجة مئوية) يتناقص عند درجة حرارة 80 درجة مئوية، و يعدم تماما عند 100 درجة مئوية.

أظهر كل من المستخلص الخام و المستخلص المنقى نشاطا مضادا للبكتيريا من السلالة *Candida albicans*.

**الكلمات المفتاحية :** *Laetiporus sulphureus* ، نشاط التراص، الكروماتوغرافي G50 ، الكروماتوغرافي (DEAE-Cellulose) اللكتينات، نشاط ضد الجراثيم.

# Table des matières

Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabes	

## Introduction

1. Lectines.....	1
1.1.Définition.....	4
1.2. Historique .....	4
1.3. Rôles des lectines.....	6
1.4.La spécificité et l'affinité des lectines.....	7
1.5.Propriétés et structure des lectines.....	8
1.5.1. La structure des lectines .....	9
1.5.2. Propriété des lectines.....	10
1.6.Distribution des lectines dans le monde vivant.....	13
1.6.1. Lectines des vertébrés.....	13
1.6.2. Lectines d'invertébrés.....	14
1.6.3. Lectines des plantes.....	14
1.6.4. Les lectines des microorganismes.....	15
1.6.5. Lectines des champignons macroscopiques.....	15
1.7.Caractéristiques .....	16
1.8. Rôles.....	17
2. <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	18
2.1.Définition.....	18
2.2. Généralités.....	18
2.3. Classification scientifique (Bull : Fr.) Murrill, 1920.....	19
2.4. Description du <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	19
2.5.Morphologie du <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	20
2.6. Activité antibactérienne et antifongique de <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	22

## Matériels et méthodes

1. Matériel biologique étudiée .....	23
2. Mise en évidence des lectines .....	23
2.1.Extraction des lectines.....	23
2.2. Test d'hémagglutination et mise en évidence des lectines.....	23
2.3. Le dosage colorimétrique des protéines.....	24
3. Purification partielle des lectines par chromatographie sur colonne.....	24
3.1.Chromatographie par gel filtration (Sephadex G-50).....	25
3.2.Chromatographie échangeuse d'ion.....	25
4. Dialyse .....	26
5. Tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).....	27
6. Effet de la température et de ph.....	27
7. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des lectines.	27
7.1.Spectre antibactérien et antifongique .....	27
7.2.Préparation des inocula de bactéries tests et fongiques.....	28
7.2.1. Préparation des inocula bactériens.....	28
7.2.2. Préparation des inocula fongique.....	28
7.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique.....	28

## Résultats

1. la mise en évidence du test d'hémagglutination .....	30
2. Purification.....	30
3. Caractérisation des molécules hémagglutinante dans la fraction.....	34
4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique.....	36
<b>Discussion générale.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>45</b>

## Annexes

# **Introduction**

## **Introduction**

Depuis des milliers d'années, les champignons sont largement connus par leurs propriétés médicinales et nutritives à cause de leurs métabolites primaires ou secondaires. En pratique, il est prouvé que certains espèce des champignons ont la capacité de produire des molécules bioactives d'intérêt biologique (**Mohamed Ali et al., 2015**). Ils se caractérisent par leurs teneurs en molécules bioactives notamment des protéines inactivant les ribosomes, des protéases, des protéines antifongiques et/ou antibactériens et des lectines. (**Senjam et al., 2015**).

Ces dernières molécules omniprésentes chez tous les organismes vivant du virus jusqu'aux organismes supérieurs. Leurs propriétés majeurs est qui ont la capacité de se lier de manière spécifique et réversible à des sucres sans aucune activité enzymatique ainsi que leurs pouvoir de précipitation des cellules tels que les érythrocytes (**Sharon et Lis, 2007**).

L'interaction spécifique lectine-sucres spécifique est due aux récepteurs glucidiques présents chez les cellules cibles. Cette interaction est l'étape essentielle pour le déclenchement des divers processus biologiques : l'activité mitogène (stimulation des cellules lymphoblastiques) (**Singh et al., 2010**), activité antiviral, antibactérienne, antifongique, hémagglutinante et anti-insecticide (**Santosh et al., 2013**).

Les lectines des champignons attirent de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de leurs activités biologiques telles que les activités antiprolifératives, anti-tumorales, antimicrobiennes, antifongiques, activité vis-à-vis de la transcriptase inverse du VIH-1 et activité mitogénique vis-à-vis des cellules de rate (**Senjam et al., 2015**).

Les travaux de ce mémoire s'inscrivent dans cette volonté de mettre en évidence l'activité antimicrobienne et antifongique des lectines partiellement purifiées produite par *Laetiporus sulphureus*.

Notre objectif principal est :

- Mettre en évidence la production des lectines par le test d'hémagglutination
- purification partielle en utilisant deux techniques de chromatographie par gel filtration (Sephadex G-50) et une deuxième purification par la chromatographie échangeuse d'anion (DEAE-Cellulose).
- étude de leurs spécificités aux glucides (test d'inhibition de l'hémagglutination), et l'effet du pH et de la température.
- étudier leurs activités biologiques (antimicrobiennes et antifongiques).

# **Bibliographie**

# 1. Lectines

## 1.1. Définition

Les lectines sont des protéines d'origine non-immunitaire à large diffusion dans la nature (**Santos *et al.*, 2014**). Ils appartiennent à une famille spécifique de protéines qui expriment la capacité de se lier de manière réversible à des glucides spécifiques sans modifier leur structure covalente (**Vincent *et al.*, 2014**). Ces molécules ont un pouvoir d'agglutination et de précipitation des polysaccharides. Ce dernier est similaire à celles des anticorps (**Sharon et Lis, 2007**).

Le mot « Lectine » est dérivé du mot latin « *leger* » qui veut dire "choisir" ou "sélectionner" par Boyd et Shapleigh en 1954 à cause de sa capacité à reconnaître les glycoprotéines d'une façon spécifique (**Van Damme, 2014**).

La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation (**Rudiger 1993 ; Goldstein *et al.*, 1980**). Lorsque certains sucres sont ajoutés à ces protéines lors de l'interaction, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (**Van Damme *et al.*, 1998**).

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



## 1.2. Historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Stillmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon et Lis 2004**). À partir de ce moment, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1954, Boyd et Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné.

En 1919, la première hémagglutinine pure découverte est la concanavaleine A (ConA). Elle a été obtenue par James B. Sumner à partir d'haricots jack. Quelques ans après, les chercheurs ont constaté que les hémagglutinines différencient différents types de sang en agglutinant spécifiquement les cellules sanguines. Cette propriété unique des lectines a incité les premières études sur les antigènes impliqués dans le système de groupe sanguin ABO (**Xiuli et al., 2015**).

Depuis l'application de la chromatographie par affinité dans les années 1960, nombreuses lectines ont été isolées alors que de nouvelles fonctions et caractéristiques étaient révélées (**Xiuli et al., 2015**).

Le **tableau 1** montre l'historique de découverte des lectines (**Renato, et al., 1991**).

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

Année	Chercheur	Titre de la recherche
1888	Stillmark	L'activité hémagglutinante des graines de <i>Ricinus communis</i> et la toxicité des graine de <i>Croton tiglium</i> .
1897	Elstfrand	L'activité hémagglutinante des graines de <i>Croton tiglium</i> et introduction au terme d'hémagglutination.
1902	Landsteiner	La réversibilité d'hémagglutination par la chaleur.
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de Concanavaleine A (Con A).
1952	Watkins et Morgan	L'inhibition des lectines par les sucres simples.
1963	Aub	Agglutination des cellules malignes par les lectine.
1965	Agrawal et Goldstein	La purification des lectines par la chromatographie d'affinité.
1981	Reinsner <i>et al</i>	L'utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse.
1988	Oliveria <i>et al</i>	Usage des lectines dans le traitement des pathologies pancréatiques
1990	Yamauchi et Minamikawa	Clonage et expression de gène de la concavaleine A chez <i>Escherichia coli</i> .

### 1.3. Rôles des lectines

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié sans doute à leur capacité unique de « lire » l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres.

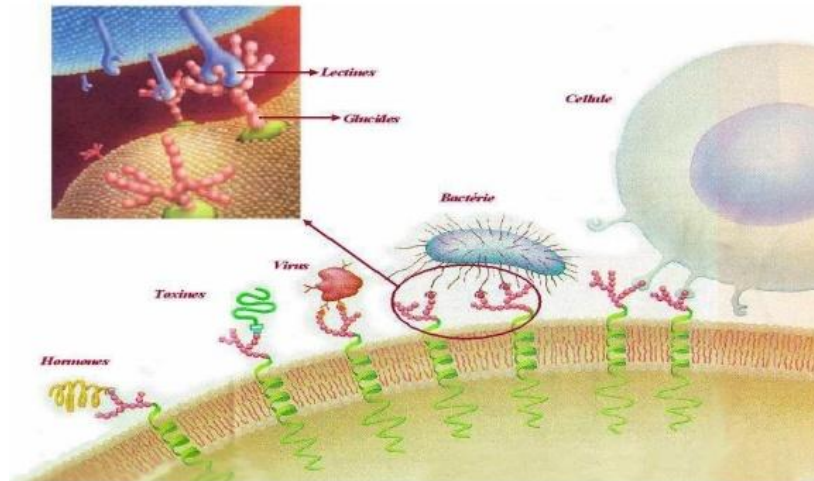
Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (**Varki ,1993**). Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. La **Figure 1** donne une vue schématique des interactions lectines-glucides. 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 et Skehel, 1987**).

De la même façon, les lectines situées sur la surface des bactéries, des virus ou des parasites intestinaux reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection

Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours un mystère. Une hypothèse très probable est le rôle de défense du végétal contre les phytopathogènes (ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante).

D'autres auteurs ont stipulé un rôle des lectines dans l'association entre les plantes (particulièrement les légumineuses) et le rhizobium pour la fixation de l'azote (**Kijne et al., 1997**).

Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (**Varki ,1993**). Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. La **Figure 1** donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.



**Figure 1** : rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides

#### 1.4. La spécificité et l'affinité des lectines

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. 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) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (Lis et Sharon, 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires.

La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides.

La constante de dissociation pour les monosaccharides est de l'ordre du millimolaire (mM), en revanche, pour les oligosaccharides elle est de l'ordre du micromolaire (  $\mu$ M) (Dam et Brewer, 2002). Enfin, certaines lectines telles que PHA-L et PHA-E de *Phaseolus vulgaris* reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Cummings et Kornfeld, 1982).

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le galactose (Gal) se lient aussi au N-acétylgalactosamine (GalNAc) Certaines lectines

peuvent reconnaître le mannose et le fucose telles que DC-SIGN de mammifère (**van Liempt *et al.*, 2006**) ou PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* (**Imberty *et al.*, 2004**).

Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 de monosaccharides tels que l'α-méthyl-galactoside et le β-méthyl-galactoside.

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park *et al.*, 2008**). La spécificité d'une lectine peut être déterminée en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » (glycochips avec différents mono et oligosaccharides). Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel. La plupart des lectines sont des protéines multivalentes.

Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire.

Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee et Lee, 1995**). Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multivalente plutôt qu'une seule interaction forte. Ainsi, ils peuvent assurer une haute spécificité et affinité entre ces récepteurs et les surfaces cellulaires des systèmes biologiques.

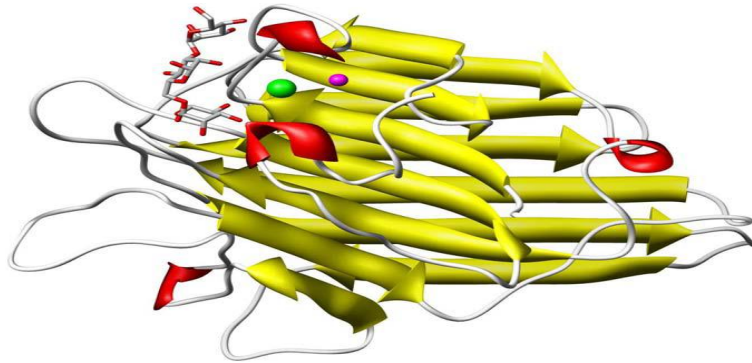
## **1.5. Propriétés et structure des lectines**

### **1.5.1. La structure des lectines**

Du point de vue structural, les lectines sont classées en trois grandes classes selon leur topologie) **Les lectines simple**

Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement n'excède pas 40 kDa. Cette classe comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines

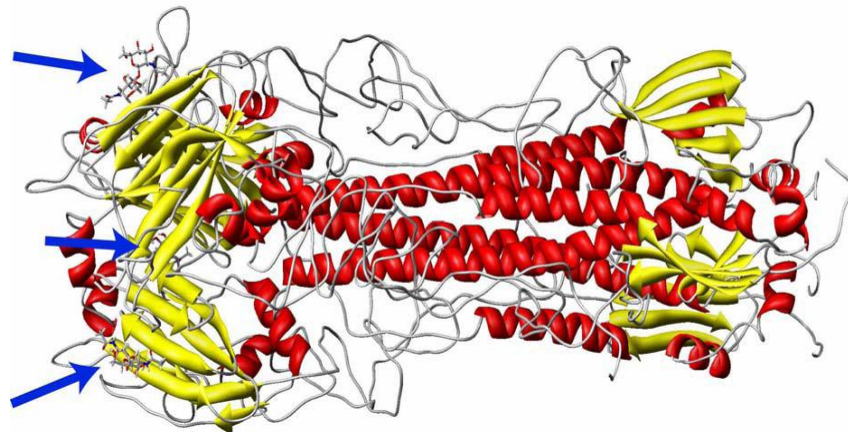
bactériennes solubles et les galectines, une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose (**Lenka et al., 2006**). (**Figure 2**)



**Figure 2** : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN). La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins b, un ruban rouge pour les hélices a et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations

### b) Les lectines en mosaïque

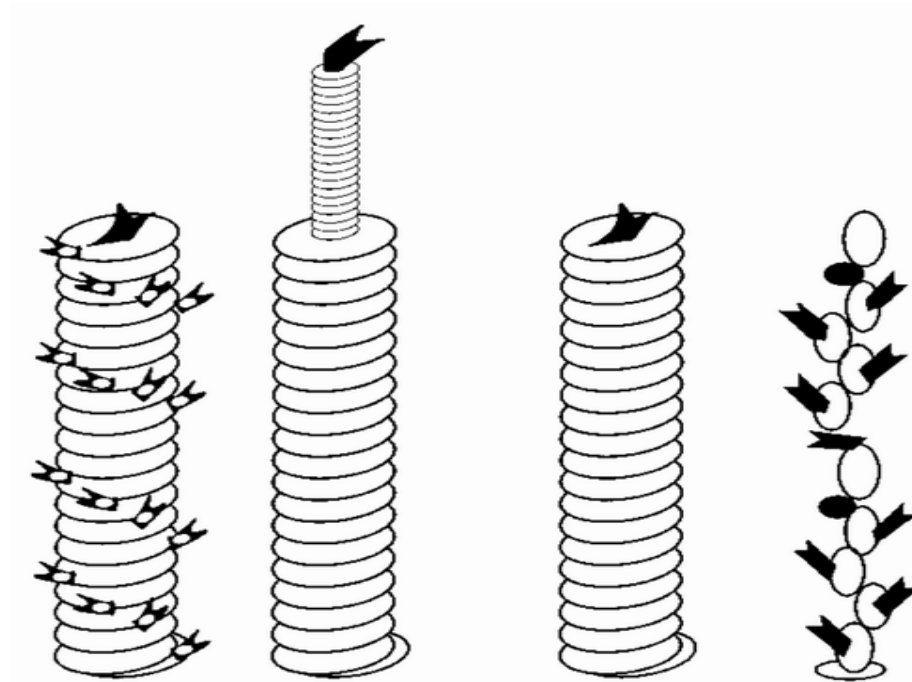
Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (**Lenka et al., 2006**). (**Figure 3**)



**Figure 3** : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (code PDB 1HGF) (**Lenka et al., 2006**)

### c) Les assemblages macromoléculaires

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



**Figure 4 :** représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli*. (Lis and Sharon, 1998).

### 1.5.2. Propriété des lectines

La distribution ubiquitaire des lectines et leurs structure spécifique a enjointra une large activité biologique antiviral, insecticide, l'agglutination cellulaire, la stimulation et l'activité mitogène (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** propriétés biologiques des lectines (Santosh *et al.*, 2013)

Propriété	Exemple
<p>Activité antiviral (puissance inhibitrice)</p>	<p>L'actinohivine est une lectine isolée à partir d'un genre rare d'actinomycètes <i>Longispora albida</i>, cette lectine possède une grande affinité au mannose et montre une très forte activité contre le virus du VIH</p>
<p>Activité anti- insecticide (toxicité)</p>	<p>En 1976, Janzen et Juster montrent que des larves de la bruche du niébé, <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius), sont incapables d'attaquer des graines de haricot commun, <i>Phaseolus vulgaris</i>, du fait de la présence d'une lectine, la PHA</p>
<p>Activité mitogène (stimulation cellulaire)</p>	<p>Stimulation de la transformation lymphoblastique des lymphocytes T (PWM, Con A)</p>
<p>Activité hémagglutinante (agrégation et précipitation des cellules)</p>	<p>L'agglutination des érythrocytes humains (lectine des grains d <i>Erythrina velutina</i>)</p>
<p>Activité antifongique</p>	<p>Le champignon phytopathogène <i>Trichoderma viride</i> induit la production de lectines dans les cellules vasculaires des racines et des tiges chez <i>Gastrodia elata</i> (système de défense).</p>
<p>Activité antibactérienne</p>	<p>lectine isolée à partir du venin de serpent <i>Bothrops leucurus</i> montre une activité antibactérienne envers des bactéries pathogènes Gram positif.</p>



## 1.6. Distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants. Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines.

Le laboratoire de CERMAV a développé une base de données des structures 3-D des lectines qui rassemble les informations structurales de ces protéines (la base de données des lectines est accessible sur: <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines>). La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont 6 d'origine végétale, 10 d'origine bactérienne, 18 d'origine animale, 5 familles d'origine virale, 8 d'origine fongique et 1 famille d'algues (Tableau 3).

**Tableau 3:** récapitulatif des lectines répertoriées.

Origine	Exemples de Lectines	Native	Complexé	Total
Plantes	ConA Ricine	106	201	307
Bactéries	PA-IL de <i>Pseudomonas</i> Toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin <i>Helix pomatia</i> 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
Total		285	487	772

### 1.6.1. Lectines des vertébrés

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

Les structures de galectines sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le b-galactose et plus précisément pour le lactose b (Gal1-4Glc) et le Nacétylgalactosamine (bGal1-4GlcNAc) (**Leffler et al., 2004**). La première structure tridimensionnelle d'une galectine humaine (la galectin-7/hGal-7) a été obtenue dans sa forme native et complexée avec le galactose, le galactosamine, le lactose, et le N-acétylgalactosamine (**Leonidas et al., 1998**).

Les lectines du type C présentent un CRD (Carbohydrate Recognition Domain) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (**Drickamer, 1993**).

Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl LewisX (PDB 1G1T) (**Somers et al., 2000**) .

Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique (**Crocker, 2002**). Elles sont membres de la superfamille immunoglobuline (Ig) et adoptent un repliement de type immunoglobuline. Lectines des invertébrés.

### 1.6.2. Lectines d'invertébrés

La présence de lectines a été démontrée chez les invertébrés terrestres ou marins. Ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et présentent donc des spécificités pour les glucides présents à la surface d'organismes pathogènes. (**Vasta, 1992**).

Chez les invertébrés, les lectines sont distribuées dans toutes les classes et sous-classes étudiées. À titre d'exemple :

les gastéropodes avec la lectine d'escargot CHA-II de *Cepaea hortensis* (**Gerlach et al., 2002**).

Les échinodermes avec l'hémagglutinine de l'oursin *Hemicentrotus pulcherrimus* (Yamada and Aketa, 1982). Les crustacés avec la lectine du crabe *Charybdis japonica* (Umetsu et al., 1991).

Les insectes avec la lectine du sphinx du tabac *Manduca sexta* (Yu and Kanost, 2000).

### 1.6.3. Lectines de plantes

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g. les lectines de légumineuses, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaline 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).

Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé «b jelly roll » formé par deux feuillets b superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variété d'assemblage macromoléculaires sous la forme de dimères ou de tétramères (Sinha et al., 2007).

### 1.6.4. Les lectines des microorganismes

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

Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (Imberty et Varrot, 2008 ; Sharon, 1996).

L'exemple le plus marquant de lectines de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (Weis et al., 1990).

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales :

les lectines *fimbriaes* (pili et flagelles), les toxines et les lectines solubles (Imberty *et al.*, 2005).

#### 1.6.5. Lectines des champignons macroscopiques

Les champignons, y compris les moisissures, appartiennent à une importante division d'organismes. N'étant pas aptes à utiliser la photosynthèse comme les plantes, ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils ont besoin et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques.

Ces organismes, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui leur procurent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques. Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines antifongiques, des ribonucléases, des protéines de type ubiquitine, des lectines, des cellulases, des xylanases, des laccases, des invertases et des tréhaloses phosphorylases (Ng, 2004). (Voir tableau 4)

les lectines ont été purifiées à partir de différentes parties du champignon et les niveaux d'expression peuvent varier en fonction de l'âge du fruit et de la saison (Mohamed Ali *et al.*, 2015).

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 4:** lectines de champignons connues (**Pemberton, 1994**).

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
Aleuria aurantia (AAL)	2003	Fucose $\beta$ -propeller à 6 lames
Flammulina velutipes (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
Xerocomus chrysenteron (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
Coprineus cinerea (CGL2)	2004	Gal Galéctine
Agrocibe cylindracea (ACG)	2005	Gal Galéctines
Agaricus bisporus (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
Laetiporus sulphureus (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
Psathyrella velutina (PVL) 3116	2006	GlcNAc/NeuNAc $\beta$ -propeller à 7 lames

### 1.7. Caractéristiques

Les lectines de champignon qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en terme de taille (12-190 kDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines. De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a

conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

### **1.8. Rôles**

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (**Guillot, 1997**). Les lectines des champignons joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la 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**).

## ***2. Laetiporus sulphureus***

### **2.1. Définition**

Le nom *Laetiporus* est un nom latin qui est composé de deux mots “*Laeti*” et “*por*” qui réfèrent à une couche hyméniale et à la taille des fructifications de forme spécifique. L’adjectif « *sulphureus* » (latin) provient de la couleur caractéristique des fructifications. **(Henri Romagnesi, 1995)**

*Laetiporus sulphureus* (Bull.)Murrill est un membre de la classe des Aphyllophorales (Polypore), Basidiomycota. Il est largement distribué en Asie, en Europe et en Amérique du Nord. Ce champignon généralement on le trouve sur les feuillus ou les conifères. **(Petrovic et al., 2013)**

### **2.2. Généralités**

Le *Laetiporus sulphureus* (qui est également nommé le *Polypore sulfureux*, *soufre*, ou également connu sous le nom ‘*poulet des bois*’) est un champignon qui appartient à un groupe de décomposeur de bois les Basidiomycètes poussant sur des arbres à feuilles caduques. Il est facilement reconnaissable en tant qu’il est membre de la famille des *Polyporaceae* et raison de sa couleur frappante qui est soit jaune ou orangé.

C’est une espèce qui est largement ré pondue en Europe, l’Asie et dans le Nord d’Amérique. En 1920, le mycologue américain William Murrill été le premier à décrire le genre *Laetiporus*, depuis que ce genre a été décrit au moins 12 d’autres espèces ont été découvertes. **(Petrovic et al., 2014)**

Les polypores sont une source majeure de composés biologiquement actifs. En raison de leur capacité à produire ou à bio-transformer des composés de grande importance, au cours des 50 dernières années la recherche et l’utilisation de *Laetiporus sulphureus* n’a jamais été apaisée.

Dans les années 1960, la biosynthèse de l’acide sulfurique a mis au point *L.sulphureus*. **(Petrovic et al., 2013)**



**Figure 5:** photo prise par R.McNeil Qui représente le *Laetiporus sulphureus* qui s'étant sur un arbre au Canada

### 2.3. Classification scientifique (Bull. : Fr.) Murrill, 1920

La classification scientifique de *Laetiporus sulphureus* est comme suit :  
(Tableau 5)

**Tableau5:** classification scientifique de *Laetiporus sulphureus*

Domaine	Biota
Règne	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Ordre	Polyporales
Famille	Polyporaceae
Genre	<i>Laetiporus</i>
Espèce	<i>Laetiporus sulphureus</i>

### 2.4. Description du *Laetiporus sulphureus*

C'est un remarquable grand champignon, avec un large entre 20,32cm et 60,96cm charnu et aqueux à plutôt ferme lorsqu'il est frais, le séchage à une consistance rigide et fragile ; grappes peuvent se chevaucher ou des capuchons qui peuvent être regroupées comme un bouquet de fleurs ; la surface supérieure des bouchons est de couleur saumon, jaune soufre ou orange vif, blanchissant au craie tandis que le temps passe ; marge lisse, d'abord épaisse et émoussée, puis plus fine ; un tissu interne blanc, jaune pale ou saumon pale, d'épaisseur de 0,6cm à 1,9cm ; de très petits pores , la longueur des tubes est entre 0,6cm-1,27cm ,la surface des pores



est brillante avec une coloration jaune soufre à crème ou blanc. (Fergus *et al.*, 2003).

Ce champignon se rencontre du printemps à l'automne, sur l'écorce de troncs verticaux ou couchés (plus rarement à l'intérieur de cavités) de nombreux feuillus : chênes, châtaigniers, hêtres, cerisiers, pommiers, etc. ; il est plus rare sur conifères. C'est un redoutable parasite. Un arbre attaqué meurt rapidement, évidé par l'intérieur, tout en conservant son aspect extérieur. (Henri Romagnesi, 1995).

*Laetiporus sulphureus* se caractérise par des poils sessiles à la face supérieure orange et à la surface des pores jaunes citron. (Harold *et al.*, 2001)

Des grandes fructifications peuvent peser 09kg ou plus. Pour le consommer il faut sélectionner des jeunes fructifications pour le champignon frais et pour le plus âgé choisir les bords tendres. (Fergus *et al.*, 2003) (Figure 6)



**Figure 6:** le *Laetiporus sulphureus* qui s'étend sur plus de 6 mètres le long du tronc d'arbre en décomposition, photo prise par Hilary Hamilton.

### 2.5. Morphologie du *Laetiporus sulphureus*

Le *Laetiporus sulphureus* comme tout autre champignon macroscopique se constitue de plusieurs parties qui sont importantes avec leur aspect scientifique qui nous permettent de bien l'identifier.

Le **tableau 6** décrit l'aspect de quelques parties importantes qui constituent le *Laetiporus sulphureus*.

**Tableau 6 :** tableau qui décrit l'aspect de quelques parties importantes qui constituent le *Laetiporus sulphureus*

La partie	Description
Basidiom	Annuel et sessile, un diamètre qui arrive à 90 cm, souvent formé de plusieurs individus disposés en amas imbriqués latéraux et parfois en rosette sur les billes tombées, avec ou sans base atténuée.
Chapeau	Un chapeau de diamètre de 5-25 cm, jusqu'à 20 cm de profondeur et 3 cm d'épaisseur, incliné, semi-circulaire à dimidié, pétaloïde, flabelliforme à irrégulier, lisse et finement plissé radialement et rugueux, non à légèrement zoné, jaune à orange vif au frais, souvent entièrement jaune orangé et jaune brillant à terne vers la marge, pâlisant à jaunâtre terne et éventuellement presque blanc après longue maturation, à marge obtuse, ondulée, souvent lobée, stérile ou fertile au dessous, orangé pâle, plus vive avec l'âge et au sec.
Face poroïde	Jaune brillant à terme, rarement blanche, immuable au froissement.
Pores	Ronds au début, plus angleux avec l'âge, 2-4 par mm, à disséminent minces et entiers, vite lacérés.
Couche de tubes	Décurrente, concolore à la face poroïde, puis jaunâtre terne, distincte, 1-5 mm de longueur.
Pied	Absent mais avec ou sans base atténuée latérale concolore au chapeau
Contexte	Jaune pâle, jusqu'à 3 cm d'épaisseur, parfois plus épais près du pied, charnu-mou et aqueux au début, puis plus fibreux tenace, plutôt léger et éventuellement crayeux, friable et cassant au sec, immuable à la coupe
Odeur et Saveur	Odeur et saveur indistinctes à agréables de noisettes.

## **2.6. Activité antibactérienne et antifongique de *Laetiporus sulphureus***

Les propriétés antifongiques et antimicrobiennes de certains de ses composants phénoliques notamment extraits par de l'éthanol ont été étudiées pour d'éventuels usages pour l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique.

Ces composants, *in vitro* se sont montrés antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatif et ils ont fortement inhibé la croissance des bactéries Gram positif testées

L'extrait brut présentait aussi une forte activité antifongique sur *Candida albicans* . (Turkoglu et al. ,2007)

**Matériels**  
**et**  
**méthodes**

## Matériels et méthodes

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

### 1. Matériel biologique étudiée

Notre travail a été effectué sur un champignon macroscopique de l'espèce *Laetiporus sulphureus* obtenu a partir de laboratoire de Génie Microbiologique et Application (Université des frères Mentouri de Constantine- Algérie).

### 2. Mise en évidence des lectines

#### 2.1. Extraction des lectines

L'extraction a été faite par la méthode décrite par Budu et Cammue *et al.* (**Budu 1988 ; Cammue *et al.*, 1985**).

20 g de polypore soufrée (*Laetiporus sulphureus*) fraîchement récolté et broyé dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est diluée dans 200 ml du tampon phosphate PBS (**Annexe 1**) a raison de 0.1g/ml. Cette suspension est mise sous agitation à 4°C pendant 24 heures.

Après la centrifugation de cette suspension à 10000 g pendant 20 min, le surnageant a été récupéré, filtré (membrane 0.22 µm) afin d'obtenir un extrait brut. Ce dernier est soumis à un test d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence ou l'absence des lectines.

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

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein *et al.*, 1980 ; Rüdiger, 1993**).

Ce test repose sur l'observation de l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines, visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse et sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimales de

lectine montrant une agglutination évidente. On peut utiliser plusieurs érythrocytes de mammifères différents (Lapin, humain, rat)

L'activité hémagglutinante du champignon *Laetiporus sulphureus* a été testée dans des microplaques de titration en forme U.

50 µL de tampon PBS sont placés dans chaque puits de la microplaque, puis 50µL de chaque extrait sont ajoutés dans le premier puits, et une double dilution en série est réalisée. Ensuite, 50 µL de la suspension d'érythrocytes à 4% v/v en solution saline (NaCl 150 mM) (**Annexe 1**) sont ajoutés et mélangés à chaque puits.

L'échantillon sanguin de rongeur (lapin) a été obtenu à partir d'animaux élevés dans l'animalerie de l'université de Constantine.

La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après 30 minutes d'incubation à 37°C.

En cas d'un résultat positif, les hématies forment un tapis qui couvre le fond du puits de la plaque de microtitration. Contrairement à un résultat négatif, on observe que tous les érythrocytes se précipitent au fond du puits, et un point rouge peut être observé.

### **2.3. Le dosage colorimétrique des protéines**

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford en utilisant le BSA (la *bovine serum albumine*) comme un standard pour établir une courbe d'talonnage. (**Bradford, 1976**).

Cette méthode est basé sur l'absorbance d'un colorant, le bleu de coomassie aux protéines, cette méthode est très sensible (2-20 µg de protéines) et très rapide aussi. (**Annexe 3**).

La concentration protéique de l'échantillon est déduite à partir de la courbe obtenue.

### **3. Purification partielle des lectines par chromatographie sur colonne :**

La purification des protéines est réalisée par plusieurs méthodes, le principe majeur de ces méthodes est la séparation des protéines selon leurs taille (chromatographie par gel filtration), leurs charge (chromatographie échangeuse d'ion) ou bien par leur affinité à un ligand spécifique (chromatographie d'affinité) ceci dans le but d'éliminer les impuretés contenues dans notre extrait brut.

#### **3.1. Chromatographie par gel filtration (Sephadex G-50)**

La chromatographie par gel filtration (tamisage moléculaire) repose sur la séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaire.

La première purification des lectines a été réalisée par chromatographie sur colonne contenant du gel de Sephadex G-50 (gel de filtration) préalablement équilibré par PBS (0.1 M, pH 8.4) auquel 3 ml de l'extrait brut sont appliqués. La colonne est connectée à une pompe péristaltique et à un collecteur (Gilson cf 80td). Des tubes secs de 5 ml sont placés au collecteur à fin que chaque tube reçoit 3 ml de molécule éluée. Le Sephadex G-50 possède un domaine de fractionnement situé entre (15 KDa et 30 KDa).

L'absorbance de chaque fraction est mesurée à 280 nm et les fractions qui contiennent des molécules sont rassemblées et testées (test d'hémagglutination). La fraction active est utilisée pour réaliser les tests qui restent.

#### **3.2. Chromatographie échangeuse d'ion**

La chromatographie échangeuse d'ion repose sur la séparation des molécules protéiques en fonction de leurs charges à un pH donné. Cependant, notre lectine préalablement purifiée par gel filtration a été purifiée une deuxième fois par une colonne échangeuse d'anion (1x10cm) de DEAE-Cellulose (Sigma Aldrich) a été préparée selon les instructions du fabricant. La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon phosphate salin (0.1 M, pH 8,4).

L'élution des protéines liées au support est réalisée par tampon phosphate saline 0.5 M de NaCl à pH 8.4.

Des fractions de 2mL sont récoltées et le profil chromatographique est suivi par lecture de l'absorbance à  $\lambda=280$ . Les fractions protéiques sont dialysées contre du tampon PBS (0.1 M, pH 8,4).

#### **4. Dialyse**

La dialyse est une méthode de séparation basée sur le mouvement des molécules à travers une membrane semi-perméable (Boudin) du milieu plus concentré au moins concentré. Seules les molécules dont la taille est inférieure au diamètre des pores de la membrane sont capables de diffuser de part et d'autre et d'atteindre l'équilibre avec le volume total de la solution dans le système, telles que celles du solvant, des sels et des petits métabolites. Par contre, les macromolécules comme les protéines ne sont pas diffusables où elles seront retenues dans le même compartiment de la membrane comme au début de l'expérience (**Voet et al. ,2005 ; Hames et al. ,2006**).

Les fractions purifiées des lectines retenues après chromatographie échangeuse d'ions sont dialysées à l'intérieur de sac de dialyse formé d'une membrane de dialyse semi-perméable (Spectra/por ; 20mm ; limite d'exclusion : 12kDa) sous une faible agitation à 4°C pendant 24 heures. En solution a été met en boudin et dialysé dans 2litre de tampon PBS (0.1 M, pH 8.4).

Les fractions actives dialysées ont été soumis immédiatement à un test d'hémagglutination.

#### **5. Tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

La spécificité glucidique des lectines est habituellement effectuée par la technique d'inhibition des sucres, dans laquelle différents monosaccharides, oligosaccharides ou glycoprotéines sont testés a différents concentration pour leurs capacité à inhiber l'hémagglutination (**Sharon et Lis, 2007**).



Le test d'inhibition de l'hémagglutination (HIA) est réalisé dans des microplaques de titration. Pour cela, nous avons utilisé un tampon PBS à pH=8.4 ainsi que (12 sucres) différents sucres préparés dans le même tampon PBS à PH=8.4 (Glucosamine HCl, Glucose, Saccharose, Mannitol, Galactose, Albumine, Xylitol, Arabinose, Cellubiose, Mannose, Lactose, BSA et Ovalbumine).

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

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

La lecture de l'inhibition de l'hémagglutination est lue après 60 min d'incubation à température ambiante.

## **6. Effet de la température et de pH**

La sensibilité des protéines aux conditions physico-chimique de leurs environnement (pH, température, métaux lourds...) leurs induit une dénaturation ainsi que la perte partielle ou totale de leurs activité.

Pour déduire l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de notre lectine, la fraction active préalablement purifié et dialysé a été incubée à différentes températures (40, 50, 60, 80 et 100°C) pendant 1heure. L'activité hémagglutinante est testée après chaque incubation.

L'effet de pH sur l'activité hémagglutinante est testé après la dialyse de la fraction active dans différent solution tampon (**Annexe 1**) à différent pH (Glycine-HCl à pH 2, Citrate-buffer à pH 4 et 5 et Glycine-NaOH à pH 9) pendant 2 heures sous agitation à 4°C.

## **7. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des lectines**

### **7.1. Spectre antibactérien et antifongique :**

La mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de la fraction active traitée et de l'extrait brut a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose selon la technique des disques en papier.

L'activité antibactérienne a été testée vis-à-vis quatre bactéries-test de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit des bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) et 2 souches de coloration à Gram positive) et deux bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300).

L'activité antifongique a été testée envers deux souches de champignons filamenteux (*Candida albicans* 570 et *Candida albicans* 478) récupérées auprès du laboratoire de Parasitologie de CHU "BIN BADIS" de Constantine.

### **7.2. Préparation des inocula de bactéries-tests et fongiques :**

#### **7.2.1. Préparation des inocula bactériens :**

Pour chaque bactéries-tests, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18 heures sur milieu gélose nutritive « GN ». La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,1 à 0,2 pour une longueur d'onde de 620 nm (approximativement  $10^6$  UFC/ml) après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Isu et Onyeagba, 2002).

#### **7.2.2. Préparation des inocula fongiques :**

Pour chaque souche levurienne clinique, un inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune de 18 heures sur milieu Sabouraud. La densité cellulaire des inocula a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile de façon à

obtenir une concentration finale de  $10^6$  levures/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (**Bastide *et al.*, 1986**).

### **7.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique :**

L'activité antibactérienne et antifongique a été mise en évidence par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique a été réalisée par la technique des disques en papier. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Selon la quelle, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur de l'extrait brut et de la fraction active B1obtenu de *Laetiporus sulphureus* envers les bactéries tests et les levures utilisées.

Des disques de 6 mm de diamètre préparés à partir du papier Wathman N° 3 reçoivent des volumes de 30  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 70  $\mu$ l et 100  $\mu$ l d'extrait de la fraction active et de l'extrait brut.

Après séchage, les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries-tests (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300) et les souches levuriennes (*Candida albicans* 570 et *Candida albicans* 478).

Les boîtes sont laissées 4 heures à +4°C pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives (**Tortorano *et al.*, 1979**).

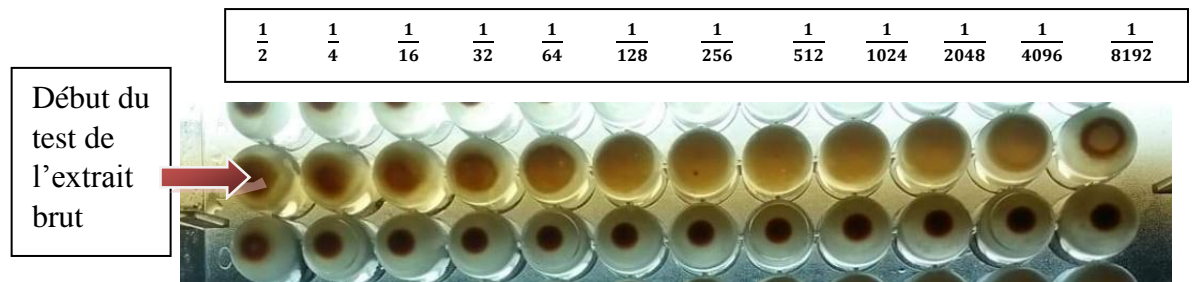
La lecture des résultats est réalisée après incubation à 37°C pendant 18 heures à 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques est considérée comme résultat positif.

# Résultats

## Résultats

### 1. La mise en évidence du test d'hémagglutination

Après extraction des différentes fractions protéiques (intra et extracellulaires), de notre champignon *Laetiporus sulphureus* un test d'hémagglutination a été réalisé en utilisant les érythrocytes du lapin différents. (**Figure 7**).



**Figure 7:** test d'hémagglutination de l'extrait brut de *Laetiporus sulphureus* en présence d'érythrocytes du lapin.

Ce résultat obtenu montre que l'extrait brute du champignon *Laetiporus sulphureus* possède une forte activité hémagglutinante vis-à-vis aux hématies du lapin une activité hémagglutinante de totale en 1260 UH. (UH= Unités Hémagglutinantes correspondant à la dilution). Cette forte activité est sûrement du à la forte teneur en protéines.

Après dosage des protéines de l'extrait brut selon le protocole de Bradford (**annexe 3**), la concentration des protéines été de 21,69 mg. (**Tableau 7**).

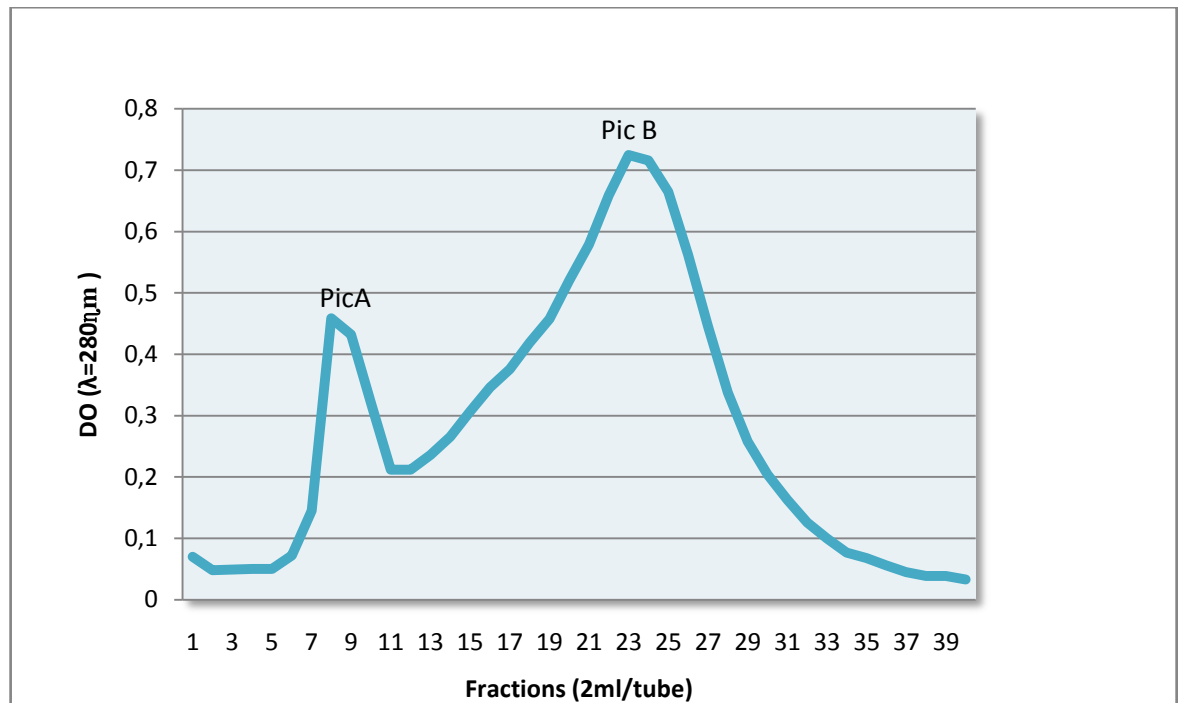
Le calcul de l'activité hémagglutinante spécifique qui correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction. Elle est exprimée en unités hémagglutinantes par mg de protéines (UH/mg). Notre extrait brut à une activité spécifique de 58,09UH/mg. (**Tableau 7**).

### 2. Purification

La procédure de purification est une étape cruciale pour la suite de notre travail. Il est nécessaire de réaliser une purification par des colonnes d'affinités, malheureusement l'absence de ces dernières. Nous avons essayé une autre approche, Afin de purifier ces molécules en utilisant une purification en deux étapes une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-50) suivie d'une colonne échangeuse d'ions.

L'extrait brut a été soumis à une chromatographie sur gel de filtration Sephadex G-50. Le chromatogramme obtenu montre l'élution des deux pics protéiques de la colonne (Sephadex G-50) (**Figures 8**), La fraction protéique du premier pic (Pic A) ne présente aucune activité hémagglutinante. Le pic B montre une activité maximale de l'ordre de 36 UH. (**Figures 9**).

Ainsi, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 58.09UH/mg, et elle est passée à 14,95 UH/mg après la chromatographie G-50. Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 1,44 avec un rendement assez faible de 2,85%. (**Tableau 7**).



**Figure 8:** Purification préliminaire de l'extrait brut du champignon *Laetiporus sulphureus* sur colonne Sephadex G-50.

**Tableau 7:** caractéristique de l'extrait brut des lectines après purification partielle par la chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-50) du champignon *Laetiporus sulphureus*

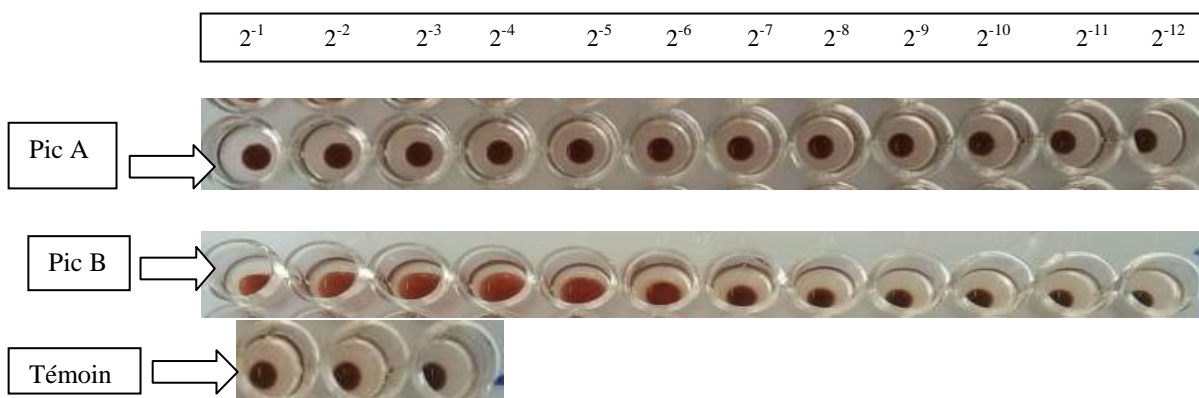
Fraction	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité total (UH) <sup>(a)</sup>	Activité spécifique <sup>(b)</sup>	Indice de purification <sup>(c)</sup>	Le rendement <sup>(d)</sup>
Extrait brut	105	21.69	1260	58.09	1	100
Sephadex G-50	4	1.792	36	20.08	1.44	2.85

<sup>(a)</sup> Activité hémagglutinante totale (titre x volume). Les hématies de lapin ont été utilisées pour ce test.

<sup>(b)</sup> L'activité spécifique (SHA) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines (mg/ml).

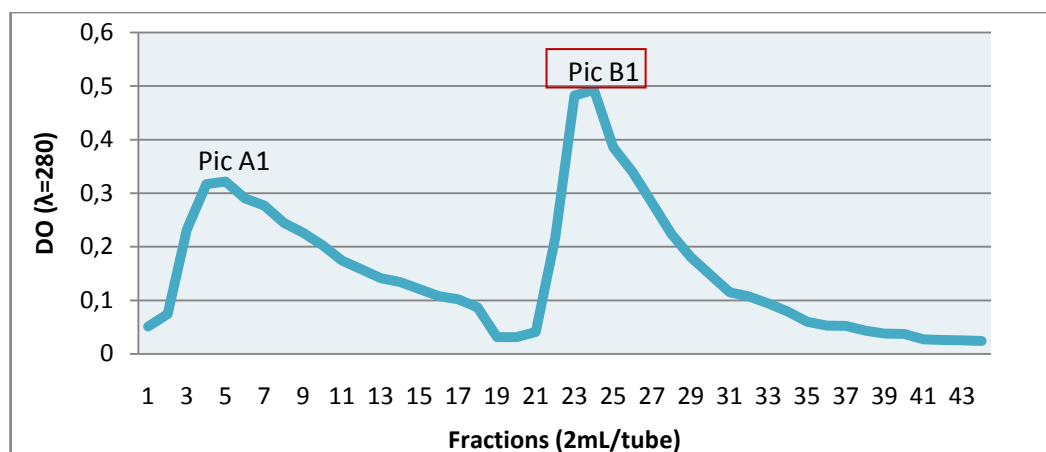
<sup>(c)</sup> L'index de purification est défini comme le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines.

<sup>(d)</sup> le rendement c'est le (%) de l'activité totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.



**Figure 9:** test d'agglutination des deux pics (A et B) obtenus par la chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-50), accompagné du test témoin.

Les fractions du Pic B récupérées de la colonne G-50, ont été regroupées, puis soumises à une chromatographie échangeuse d'ions. Le profil chromatographique sur DEAE-Cellulose indique l'élution de 2 pics protéiques, (élution avec un gradient linéaire d'NaCl [0.5M] (**Figure 10**).



**Figure 10 :** Purification préliminaire de la fraction du pic B du champignon *Laetiporus sulphureus* sur colonne échangeuse d'ions (DEAE-cellulose).

Seul le deuxième pic B1 obtenu après élution [NaCl]  $\approx 0,3M$ , présente une activité hémagglutinante de l'ordre de 28UH.

Ainsi, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 58.09UH/mg, et elle est passée à 14,80 UH/mg après la chromatographie échangeuse d'ion. Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 0,25 avec un rendement assez faible de 2,22%. (**Tableau 8**).

**Tableau 8 :** caractéristique de l'extrait brut des lectines après purification partielle par la chromatographie échangeuse d'ions du champignon *Laetiporus sulphureus*

Fraction	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité total (UH) (a)	Activité spécifique (b)	Indice de purification (c)	Le rendement (d)
Extrait brut	105	21.69	1260	58.09	1	100
DEAE-Cellulose	4	1.891	28	14.80	0.25	2.22

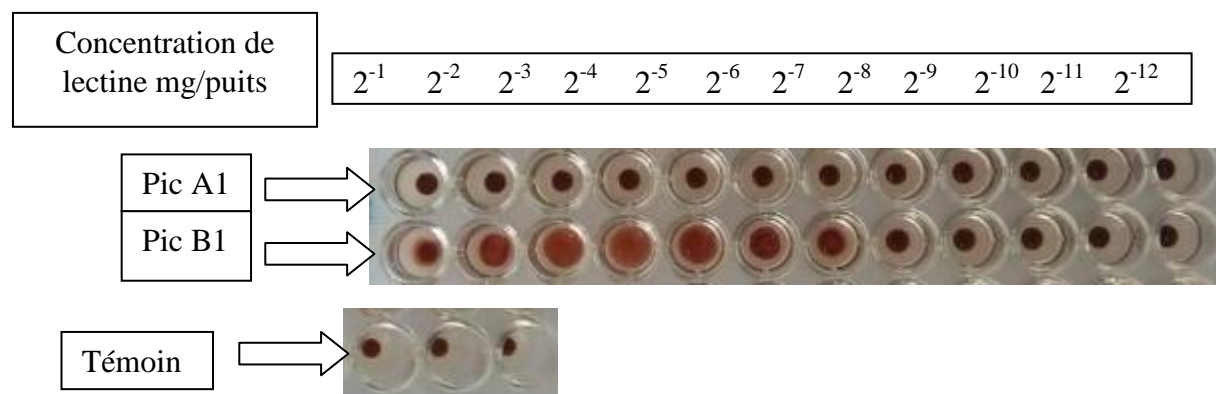
<sup>(a)</sup> Activité hémagglutinante totale (titre x volume). Les hématies de lapin ont été utilisées pour ce test.

<sup>(b)</sup> L'activité spécifique (SHA) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines (mg/ml).

<sup>(c)</sup> L'index de purification est défini comme le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines.

<sup>(d)</sup> Le rendement c'est le (%) de l'activité totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.





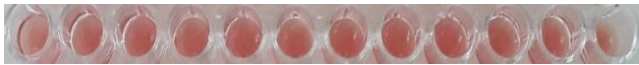



**Figure 11:** test d'agglutination des deux pics (A1 et B1) obtenus par la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions, avec le test témoin.











### 3. Caractérisation des molécules hémagglutinante dans la fraction

#### 3.1. Inhibition de l'hémagglutination

Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinante contenues dans les fractions du Pic B1 récupéré après échangeuse d'ions, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé. Un échantillon a été incubé avec différents monosaccharides, disaccharides et glycoprotéines (10 sucres et 3 glycoprotéines). Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhibé uniquement par un sucre (lactose avec une concentration minimale inhibitrice de 0.125mg/ml). (**Tableau 9**).

**Tableau 9 :** résultats du test d'inhibitions de l'hémagglutination de la fraction actif B1

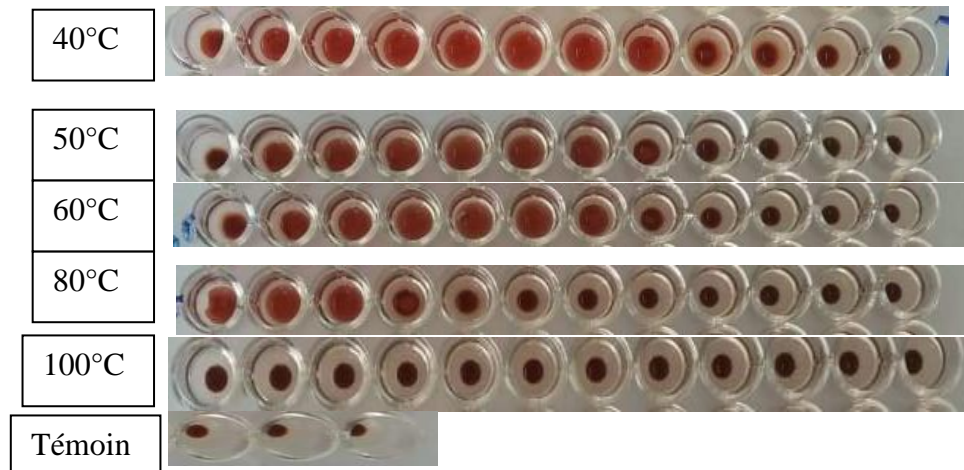
Sucres et glycoprotéines	Résultat des tests d'inhibition	Lecture
Glucosamine HCl		R (-) /AI
Glucose		R (-) /AI
Saccharose		R (-) /AI
Mannitol		R (-) /AI

Galactose		R (-) /AI
Albumine		R (-) /AI
Xylitol		R (-) /AI
Arabinose		R (-) /AI
Cellubiose		R (-) /AI
Mannose		R (-) /AI
Lactose		R(+) /PI
BSA		R (-) /AI
Ovalbumine		R (-) /AI
Témoin		

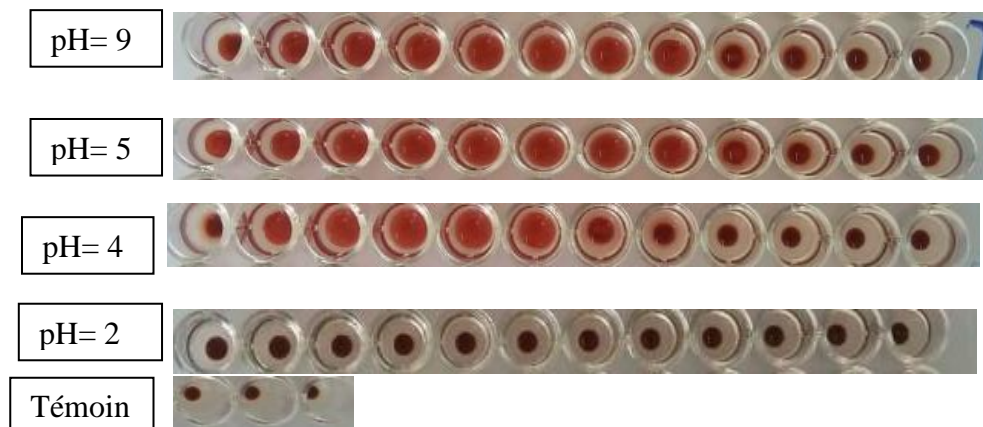
R (-) : Résultat négatif	AI : Absence d'inhibition
R(+) : Résultat positif	PI : Présence d'inhibition

### 3 .2. Effet de la température

Les fractions du Pic B1 ont été soumises à des différentes températures (40 -100°C), et à différents pH (2-9). On observe que l'activité hémagglutinante des fractions du Pic B reste maximale entre 20 et 80°C. Au delà de cette température l'activité diminue considérablement, jusqu'à disparaître à une température de 100°C (**Figure 12**). Les pH très acides (entre 2 et 4) affectent considérablement l'activité hémagglutinante, cependant au delà d'un pH de 5, l'activité se stabilise, même à des pH très alcalins (pH 9) (**Figure 13**).



**Figure 12** : résultat du test de l'effet de la température sur l'activité hémagglutinante de la fraction active B1



**Figure 13** : résultats de l'effet de différent pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction active B1

#### 4. Mise en évidence l'activité antibactérienne et antifongique

Après 24heurs d'incubation des boitesensemencées, les résultats sont présentés dans le (Tableau 10).

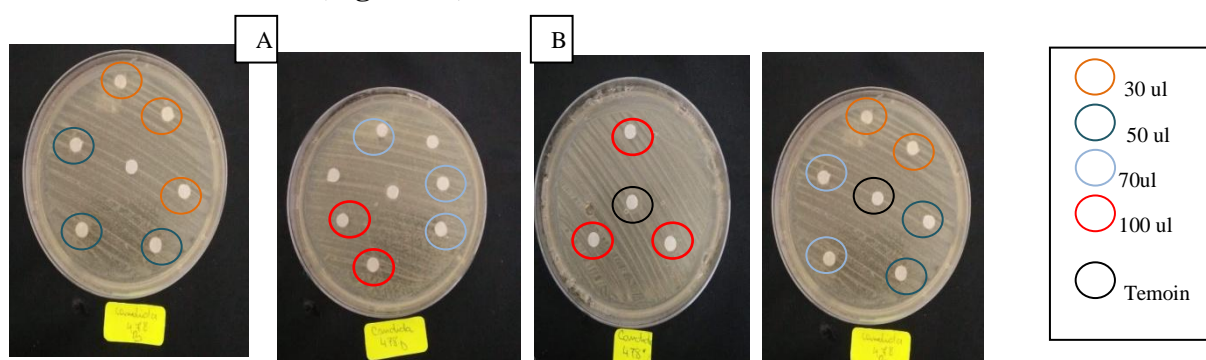
**Tableau 10** : test d'activité antibactérienne et antifongique de la fraction active sur les quatre souches bactériennes ATCC et les deux souches de *Candida albicans*

Les souches tests	Concentration extrait brut (µl)				Concentration de la fraction active (µl)			
	30	50	70	100	30	50	70	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603,	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
<i>Candida albicans</i> 570	<b>RP</b>	<b>RP</b>	<b>RP</b>	RN	<b>RP</b>	<b>RP</b>	<b>RP</b>	<b>RP</b>
<i>Candida albicans</i> 478	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

RN : résultat négatif

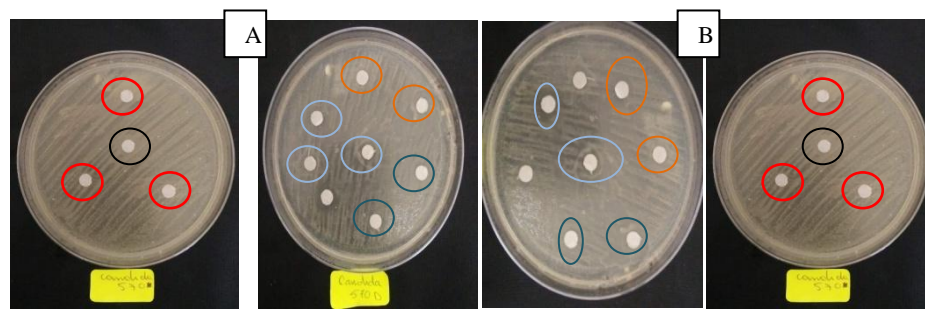
RP : résultat positif

L'extrait brut et la fraction active avec des différentes concentrations n'ont pas une activité antibactérienne par contre ont une activité antifongique sur la souche *Candida albicans* 570. (Figure 14).

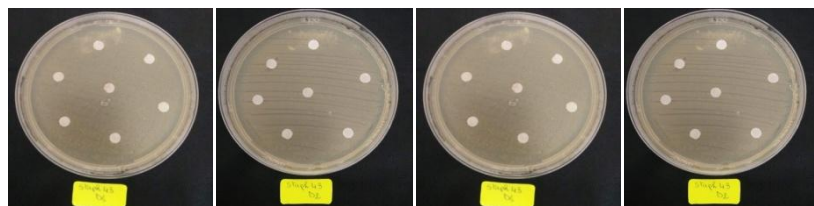


*Candida albicans* 478 : résultat des l'extrait brut A et B et de la concentration active C et D

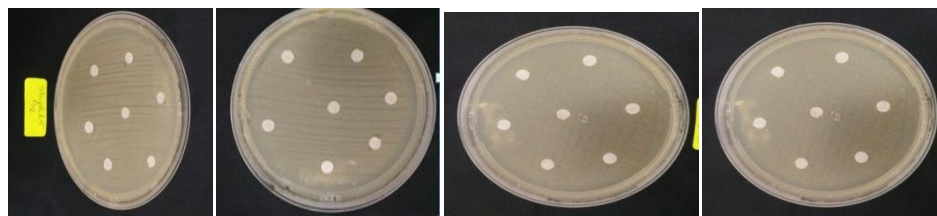
**Figure 14** : test d'activité antibactérien et antifongique de l'extrait brut et la fraction active sur quatre souches bactériennes de la gamme ATCC et deux souches de champignons filamenteux.



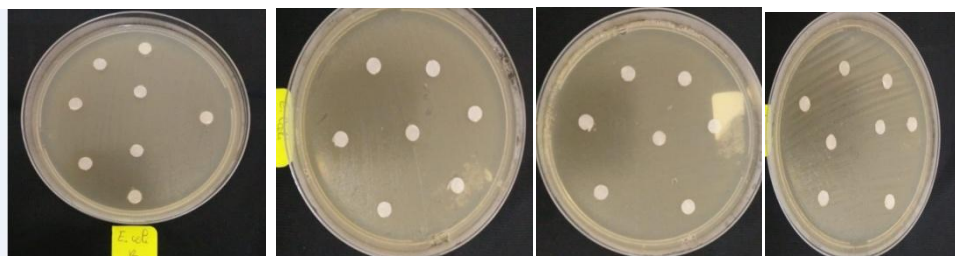
*Candida albicans* 570 : résultats de l'extrait brut A et de la fraction active B1 « B »



*Staphylococcus aureus* 43 extrait brut et la fraction active B1.

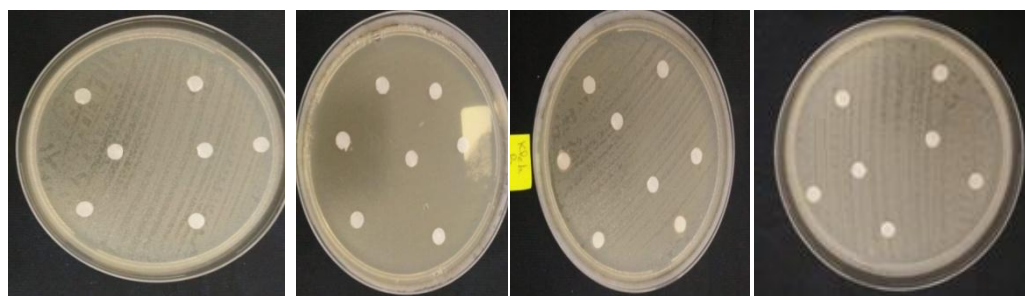


*Staphylococcus aureus* 25 extrait brut et la fraction active B1.



*E.coli* : résultats de l'extrait brut et de la fraction active B1.

**Figure 14** : test d'activité antibactérien et antifongique de l'extrait brut et la fraction active sur quatre souches bactériennes de la gamme ATCC et deux souches de champignons filamenteux.



*Klebsiella pneumoniae* : résultats de l'extrait brut de la fraction active B1.

**Figure 14** : test d'activité antibactérien et antifongique de l'extrait brut et la fraction active sur quatre souches bactériennes de la gamme ATCC et deux souches de champignons filamenteux.

# **Discussion générale**

## Discussion générale

### 1. Le champignon *Laetiporus sulphureus*

Ce champignon a été choisi comme sujet de notre étude à pour plusieurs raisons thérapeutiques plus que pour des raisons nutritionnelles que la composition de ces extraits a révélé plusieurs substances bioactifs comme : Les propriétés antifongiques et antimicrobiennes.

Ces substances bioactives, *in vitro* ont montrées présences des effets inhibiteurs de croissances bactériennes comparables à l'effet d'antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatif et ils ont fortement inhibé la croissance des bactéries Gram positif testées. L'extrait brut présentait aussi une forte activité antifongique sur *Candida albicans* . (Turkoglu et al. , 2007)

### 2. Test d'héماغglutination

La mesure d'activité héماغglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (Goldstein et Poretz, 1986 ; Rudiger, 1993). Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. L'extrait brut de notre champignon à été testé pour son activité héماغglutinante.

Les résultats montrent une présence de l'agglutination des érythrocytes du lapin avec notre extrait brut avec une activité héماغglutinante de totale en 1260 UH.

**Ces résultats sont concordants avec ceux de Mancheño JM et al.,(2005)** qui ont démontré la présence d'activité héماغglutinante dans les extraits protéiques intra et extracellulaires du champignon.



### 3. Purification primaire

Afin d'analyser les hémagglutinines du champignon *Laetiporus sulphureus* une extraction de la fraction protéique intracellulaire a été réalisée. Dans la littérature, la plupart des lectines sont purifiées en une seule étape sur des colonnes d'affinités couplées à différents ligands saccharidiques (**Nascimento et al., 2012**), notamment (Mannose, fucose, galactose N-acétyl glucosamine (GlcNac), Nacétylgalactosamine (GalNac), et l'acide sialique), ces monosaccharides et leurs dérivés sont les unités typiques des structures d'oligosaccharides sur les surfaces cellulaires, particulièrement celles des érythrocytes. Malheureusement aucune de ces colonnes n'est disponible au sein de notre laboratoire.

Il n'existe pas de protocole standardisé pour la purification des lectines, la principale raison pour cela, est l'extrême hétérogénéité fonctionnelle et structurelle de ces protéines qui sont généralement constituées de plusieurs sous-unités qui forment des dimères ou des polymères macromoléculaires, en plus de cela, elles peuvent présenter des affinités complexes, qui varient en fonction du pH et de la composition du milieu (présence des glucides, ions métalliques) (**Van Damme et al., 2008**).

Des méthodes de fractionnement plus classiques, comme la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, la chromatographie échangeuse d'ions, et la chromatographie sur gel de filtration sont de bonnes alternatives pour la purification de lectines dont l'affinité est inconnue ou complexe (**Sova, 1985 ; Podgorski et al., 1992 ; Zhigis et al., 1993**).

Dans notre étude et afin de purifier ces molécules nous avons adopté une autre stratégie en utilisant une purification en deux étapes, une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-50) suivie d'une colonne échangeuse d'ions.

L'activité spécifique de l'extrait brut était de 58.09UH/mg, et elle est passée à 20.08UH/mg après la chromatographie G-50 (**pic B**), Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 1.44 avec un rendement assez faible de 2.85%. En effet, deux pics sont observés après chromatographie sur gel de filtration G-50, pic A et pic B. le pic A ne présente aucune activité hémagglutinante.

Le pic B G-50 est soumis une deuxième fois sur une colonne échangeuse d'ions sur résine DEAE-cellulose l'activité spécifique est passé a 14,80 UH/mg facteur de purification de la fraction purifiée est de 0.25 avec un rendement assez faible de 2.22%.

En effet, deux pics sont observés après chromatographie échangeuse d'ions, pic A1 et pic B1. Le pic A1 ne présente aucune activité hémagglutinante.

#### **4. Caractéristiques physico- chimiques de la fraction active B1**

Nos résultats montrent que les lectines contenues dans fraction B1 restent actives jusqu'à une température de 80°C, résistent bien à des pH hautement alcalins (pH=9). Les lectines des champignons sont désignées comme étant des protéines thermostables.

Elles peuvent tolérer des températures élevées allant de 40 jusqu'à 100°C, et conservent leur activité après une incubation entre 60 à 80°C pendant 5h, et à 100°C pendant 5 à 10min. (**Patrick H.K Ngai, 2004**).

Elles restent également actives dans une large gamme de pH (de 2.5 à 9.0), et résistent bien à la protéolyse et à d'autres traitements dénaturants (**Gilboa-Garber, 1982, 1986; Podgorskii et al., 1992, 2014**).

#### **5. Activité antibactérienne et antifongique**

L'activité antibactérienne et antifongique de la fraction B1 a été testée à différentes concentrations (0,3 ; 0,15 et 0,075 mg/ml) contre quatre souches bactériennes et deux souches de champignons filamenteux, en utilisant la technique de diffusion des disques sur gélose.

Les résultats de ce test n'ont montré aucune activité visible contre les souches bactériennes, Par contre, on a obtenue un résultat positif pour l'activité antifongique sur la souche *Candida albicans 570*.

Ce qui suggère la présence de molécules à activité antimicrobienne dans la fraction B1.

**Conclusion**  
**et**  
**perspectives**

## Conclusion et Perspectives

Depuis la découverte des lectines, les chercheurs en sciences s'intéressent de plus en plus à ces composés biologiquement actifs qui sont devenus un sujet très important car il contient pleins de secrets et de mystères sur leurs structures et leurs différents caractéristiques physico-chimique, ainsi que et leurs rôles. **L'objectif principal de notre travail vise à mettre en évidence** les lectines produites par le champignon *Laetiporus sulphureus*, leurs purifications, l'étude de leurs spécificités aux glucides, l'effet du pH et de température ainsi que leurs activités antimicrobiennes.

Le test d'hémagglutination de l'extrait brut montre une activité hémagglutinante totale de 1260 UH vis-à-vis les érythrocytes de lapin. La purification primaire par chromatographie sur gel filtration G-50 a montré deux pics (pic A et pic B). Seul le pic B présente une activité hémagglutinante. L'activité spécifique de l'extrait brut est passée de 50.09 UH/mg à 20.08 UH/mg après purification.

La purification secondaire a été réalisée sur une colonne échangeuse d'anion (DEAE-Cellulose). Deux pics ont été observés (pic A1 et pic B1). Seul le pic B1 présente une activité hémagglutinante avec une activité spécifique de 14.8 UH/mg.

Après cette purification, la fraction active a subi un test d'inhibition de l'hémagglutination et un test d'étude des caractères chimiques et physiques (température, pH). La fraction protéique active a été inhibée seulement par le monosaccharide lactose à une concentration minimale d'inhibition de 0.125 mg/ml. Notre fraction active partiellement purifiée présente une stabilité entre pH 5 et 9, ainsi qu'une thermostabilité entre 40° C et 80°C.

L'activité antibactérienne de l'extrait brut et de la fraction active B1 n'ont pas montré un résultat vis-à-vis les souches tests de la collection américaine ATCC, par contre, l'activité antifongique a montré une inhibition de l'extrait brut et de la fraction B1 vis-à-vis la souche *Candida albicans* 570 à une concentration de :

- pour l'extrait brut pour les trois volumes de 30 $\mu$ l, 50  $\mu$ l et 70  $\mu$ l les concentrations sont comme suit : 1.74 mg/ml, 2.9 mg/ml et 4.06mg/ml.

- pour la fraction B1 quatre volumes utilisés pour le test de 30 $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 70  $\mu$ l et de 100  $\mu$ l, les concentrations sont comme suit : 0.002 mg/ml, 0.74mg/ ml, 1.03mg/ ml et 1.48 mg/ml.

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

- La purification des lectines par chromatographie d'affinité et HPLC.
- La détermination du poids moléculaire par électrophorèse.
- La réalisation d'autres tests biologiques antiviraux, anticancéreux...

# **Références bibliographiques**

## Référence bibliographique

1. Bradford, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, vol. (72), p 248–254.
2. Budu C. V., 1988. Isolation of two lectins from fir (*Abies alba* Mill.) bark tissue on immobilized peroxidase and some of their properties. Preliminary study. *Rev. Roum. Biochim.* 25 (1), p 3-7.
3. Cammue B., Stinissen W. J., & Peumans W. J., 1985. Lectins in vegetative tissues of adult barley plants grown under field conditions. *Plant Physiol*, vol. (78), p 384-387.
4. Crocker, P. R. & Zhang, J., 2002. New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics. *Biochem. Soc. Symp.* 83–94.
5. Cummings, R. D. & Kornfeld, S., 1982. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* 257, 11230–4.
6. Dam, T. K. & Brewer, C. F., 2002. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.* 102, 387–429.
7. Drickamer, K., 1993. A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* 3, 2–3.
8. Edelman, G. M. *et al.* , 1972. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2580–4.
9. Fergus, C. L & Fergus, C., 2003. Common edible & poisonous mushrooms of the northeast. Stackpole books.
10. Gerlach, D., Wagner, M., Schlott, B., Zähringer, U. & Schmidt, K.-H., 2002. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 61–8.
11. Giollant M., Guillot J., Damez M., Dusser M., Didier P., 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.
12. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285, 66–66.
13. Guillot J., Kanska G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 203-230.

14. Harold, H. Burdsall, J.R. & Bank, M. T., 2001. The genus *Laetiporus sulphureus* in north America. *Harvard papers in botany*, vol 6, no.1, 43-55.
15. Henri Romagnesi, *Atlas des champignons d'Europe* Bordas Nature Paris 1995 p : 274.
16. Imberty, A. & Varrot, A., 2008. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 567–76.
17. Imberty, A., Mitchell, E. P. & Wimmerová, M., 2005. Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 525–34.
18. Imberty, A., wimmerová, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-Garber, N., 2004. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* 6, 221–8.
19. Isu N. R., Onyegba R. 2002. Basic Praticals in microbiology. 2<sup>nd</sup> edition. Fasmen Communication, Okigwe. 25-45.
20. Lee, Y. C. & Lee, R. T., 1995. Carbohydrate-protein interactions: Basis of glycobiology. *Acc.Chem. Res.* 28, p 321–327
21. Lee, Y. C. & Lee, R. T., 1995. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 28, 321–327.
22. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F., 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19, 433–40.
23. Leonidas, D. D. *et al.*, 1998. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37, 13930–40.
24. Lis, H. & Sharon, N., 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674.
25. Mohamed Ali A. H. ; Razina R. ; Evelin T. ; Tom W. M. & Joe T., 2015. Mushroom Lectins: Specificity and Bioactivity Relevant to Human Disease. *International Journal of Molecular Siences.* 16, p 7804.
26. Ng T. B., 2004. Peptide and proteins from fungi. *Peptides*, 25, 1055-1073.
27. Nussenzweig, R. S., 1967. *Exp. Parasit.*, 21, 224.
28. Ota, Y. Hattori, T. Banik, M.T. Hagerdorn, G. Sotome, K. Tokuda, S. & ABE, Y., 2009. The genus *Laetiporus sulphureus* (Basidiomycota, Polyporales) in east Asia.
29. Park, S., Lee, M.-R. & Shin, I., 2008. Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1579–91.
30. Pemberton R. T., 1994. Agglutinins (lectins) from some British higher fungi. *Mycological Res* 98: 277-290.



31. Petrovic, J. Papandreou, M. Galamoclija, J. Ciric, A. Baskakis, C. Proestos, C. Lamari, F. Zoumpoulakis, P. & Sokovic, M. 2014. Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill.
32. Petrovic, J. Glamoclija, J. Stojkovic, D. S. Ciric, A. Nikolic, M. Bukvicki, D. Guerzoni, M. E. & Sokovic, M. D. ., 2013. *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from: investigation volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspegillus flavus* in tomato paste.
33. Renato A. M., Iracema L. A., José T. A. O. & Benildo S. C. 1991. Plant lectins, chemical and biological aspects. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 86:211-218.
34. Rüdiger, H., 1993. Purification of plant lectins. In H. J. G. Gabius (Ed.), *Lectins and Glycobiology* (Springer, pp. 31–46). Berlin.
35. Santos A. F. S.; da Silva M. D. C.; Napoleão T. H.; Paiva P. M. G.; Correia M. T. S. & Coelho L. C. B. B. 2014. Lectins : Function, structure, biological properties and potential application. Current topics in peptide & protein research. 15: 41-62.
36. Santosh K. G., Madan L. V. & Shamsheer S. K. 2014. Lectins: Properties and Application. Nom de journal. p 65.
37. Sharon N. & Lis H., 1989. Function in nature; LECTINS. SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA. p 97-107.
38. Sharon N. & Lis H., 1989. Molecular properties; LECTINS. SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA. p: 47.
39. Sharon, N. , 1996. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408, 1–8.
40. Sharon, N., 2007. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 282, 2753–64.
41. 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.
42. Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M. & Suroliya, A., 2007. Subunit assembly of plant lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 498–505.
43. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T., 2000. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 103, 467–79.

44. 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. Biol. Chem.* 92, 1193-1202.
45. Tortorano G. J., Funke B. R., Case C. L., 2003. Introduction à la microbiologie. Editions du Rrenouveau Pédagogique. France.
46. Turkoglu, A. Duru, M. E. Mercan, N. Kivrak, I. Gezer, K. 2007. Antioxydant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill; *Food chemisteris* .101, 267-273.
47. Umetsu K., Yamashita K. & Suzuki T. 1991. Purification and Carbohydrate-Binding Specificities of a Blood Type B Binding Lectin from Hemolymph of a Crab (*Charybdis japonica*). *J. Biochem.* 109, 718-721.
48. Van Damme E. J. M., Willy J. P., Annik B. and Pierre R., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Science*, Vol. 17, 575-692.
49. Van Damme, E. J. M., 2014. History of plant lectin research. *Methods Mol. Biol.* 1200, 3–13.
50. Van Liempt, E. *et al.* , 2006. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Letters* 580.
51. Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97–130.
52. Vasta G. R. 1992. Invertebrate lectins: Distribution, synthesis, molecular biology and function. In: Allen HJ, Kisailus EC, editors. *Glycoconjugates: Composition, structure and function*. New York, NY: Marcel Dekker. 593-634.
53. Vincent J., van Buul, Fred J.P.H. Brouns., 2014. Health effects of wheat lectins: A review. *Journal of Cereal Science*. 1-6.
54. Weis, W. I., Brünger, A. T., Skehel, J. J. & Wiley, D. C., 1990. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J. Mol. Biol.* 212, 737–61.
55. Xiuli D., Wenlong L. & Tzi B. N., 2015. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Medicinal Research Reviews*, 1-27.
56. Yamada, Y. & Aketa, K., 1982. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Biochim. Biophys. Acta* 709, 220–6.
57. Yu, X. Q. & Kanost, M. R., 2000. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 275, 37373–81.

# **Annexes**

## Annexe 1

### Solutions

#### Tampon PBS (Ph 8.4, 20 mM)

Na Cl (137 mmol).....	8 g
K Cl (2.7 mmol) .....	0.2 g
Na HPO <sub>4</sub> (10 mmol) .....	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.76 mmol) .....	0.24 g
EDTA.....	0.744 g
Eau distillé .....	1000 ml

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

Glycine-NaOH (1mol).....	200ml
Eau distillé .....	800ml
Ajuster avec NaOH jusqu'à avoir pH=9	

#### Tampon citrate buffer

Citrate de sodium .....	24.087 g
Acide citrique.....	3.471 g
Eau distillé.....	800 ml
Ajuster avec NaOH ou HCl jusqu'à avoir pH=5 et 4	

## **Annexe 2**

### **Suspension**

#### **Suspension d'hématies à 4%**

Les hématies préalablement prélevé a partir d'un lapin de laboratoire sont centrifugés à 3000 g pendant 10 min, les culots récupérés sont lavé trois fois avec de l'eau physiologique est subis une centrifugation à 1200 g pendant 5 min pour chaque fois. Une suspension d'hématies à 4% v/v dans la solution saline à 150 mM (à raison de 4 ml de culot dans 96 ml d'eau physiologique).la conservation de cette suspension peut être allé jusqu'à 5 jours à 4°C.

## Annexe 3

### Dosage colorimétrique des protéines (Bradford, 1976)

#### Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie.....100 mg

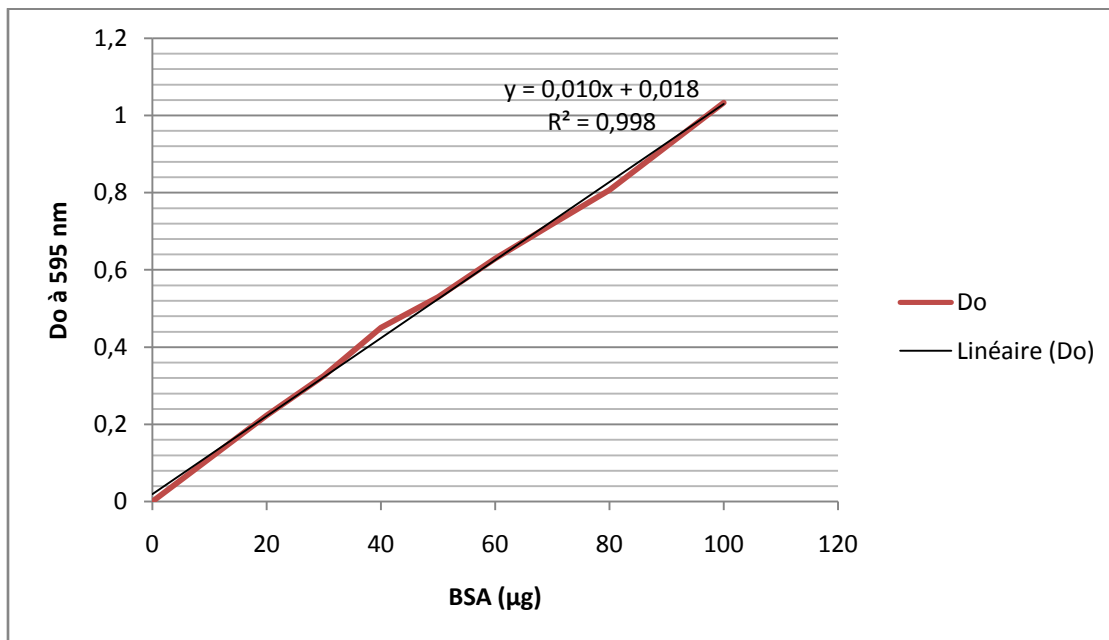
Ethanol absolu.....50 ml

Acide phosphorique à 85% .....100 ml

Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée. Conservation à 4C pendant 3 à 4 semaines à l'abri de la lumière.

#### La courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparé avec des concentrations croissantes de solution mère BSA (1 mg/1 ml) (0 : 10 :20 :30 :40 :50 :60 :70 et 80 µl) les volumes sont ajusté à 100 µl. 3 ml de réactif sont rajouté a chaque tube et laisser agir pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc (les tubes doit être agiter avant la mesure).



**Thème : Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des lectines extraites et partiellement purifiées du champignon *Laetiporus sulphureus***

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

**Résumé**

Ce travail, repose sur l'extraction, la purification des lectines du champignon de l'espèce *Laetiporus sulphureus*, et l'étude de leurs propriétés glucidiques et activités antimicrobiennes. Les lectines de la fraction intracellulaire de *Laetiporus sulphureus* ont subi une purification primaire sur gel G-50. Deux pics ont été observés (pics A et B). Le pic A ne présente aucune activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 58.09 UH/mg, et elle est passée à 20.08 UH/mg.

Deux pics ont été observés (pics A1 et B1) après la deuxième purification sur une colonne échangeuse d'anion (DEAE-Cellulose). Le pic B1 représente une activité hémagglutinante, ainsi qu'une activité spécifique de 14.8 UH/mg.

La fraction active est inhibée par le monosaccharide (lactose) à une concentration de 0.125 mg/ml. Cette dernière persiste à des pH entre 5 et 9 et diminue à des pH moins de 5. Ainsi, elle persiste à des températures entre 40-60°C, diminue à 80°C et totalement inhibée à 100°C.

L'activité antimicrobienne de la fraction active et de l'extrait brut présente une inhibition contre la souche *Candida albicans 570* à une concentration :

-pour l'extrait brut pour les trois volumes de 30µl, 50 µl et 70 µl les concentrations sont comme suit : 1.74 mg/ml, 2.9 mg/ml et 4.06mg/ml.

- pour la faction active B1 quatre volumes utilisés pour le test de 30µl, 50 µl, 70 µl et de 100 µl, les concentrations sont comme suit : 0.002 mg/ml, 0.74mg/ ml, 1.03mg/ ml et 1.48 mg/ml.

**Mots clés :** *Laetiporus sulphureus*, lectines, activité hémagglutinante, chromatographie G-50, chromatographie (DEAE-Cellulose), activité antimicrobienne.

**Laboratoire de recherche : laboratoire de génie microbiologique et applications**

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** ZITOUNI Abdelbaki (Maitre de conférences classe B- UFM Constantine),

**Rapporteur :** BOULAHROUF Khaled (Maitre assistant classe-UFM Constantine).

**Examineur :** ABDELAZIZ Ouidad (Maitre assistant classe A- UFM Constantine)

**Date de soutenance : 07/07/2019**