



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 والحياة

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 :

**Extraction, Caractérisation et Purification des Lectines Produites
par *Chromobactérium Violaceum***

Préparé par : KASSAH LAIB Zeyneb.

LABED Maroua.

LALOUI Bouchra.

Le : 23/09/2021

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : ABDELAZIZ Wided (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : BOULAHROUF Khaled (MCB- UFM Constantine).

Examinatrice : MEZIANI Meriem (MCB- UFM Constantine).

***Année universitaire
2020- 2021***

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury.

Nous commençons d'abord par Madame ABDELAZIZ Wided maitre de conférences B à l'université des frères mentouri Constantine -1- qui a accepté de consacrer du temps à présider notre juré. Qu'elle soit assurée de notre respectueuse considération.

On remercie infiniment Madame MEZIANI Meriem pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de juger ce master et d'être examinatrice.

Un remerciement tout particulier à notre encadreur BOULAHROUF Khaled pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience,... tout au long de la réalisation de ce mémoire. Pour tout cela, nous tenons à vous exprimer nos sentiments de profonde gratitude.

Merci à tous les enseignants artisans de notre formation universitaire.

Merci.

Dédicace

A mon cher père : AHMED

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma très chère mère : SALIMA

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Puisse le tout puissant te donner la santé, le bonheur et la longue vie afin que je puisse à mon tour de te rendre la pareille.

A mon très cher frère Mohammed Taher

Je ne trouve pas les mots pour exprimer mes remerciements pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci infiniment pour tous tes encouragements permanents, et ton soutien moral. J'espère que mon effort qui est le fruit de tes encouragements, te parviendra avec ces humbles paroles, Et j'espère aussi que j'ai pu te rendre heureux et si fier de moi pour ce travail si dur. Que Dieu te protège et te garde pour moi, et qu'il m'aide à te retourner la faveur. Que Dieu réalisera tes rêves et atteindra tes objectifs.

A mon très chère frère Nabil et sa chère femme Faiza, A mon très chère et bien-aimé frère Abdelmalek et à mon très cher neveu Djawed

Un dédicace tout particulier pour vous, merci pour votre appui et votre encouragement, votre compréhension et votre grande tendresse, qui en m'avoit encouragé tout au long de mes études, Merci pour vos soutien, vos conseils et votre amour, qui m'ont permis d'arriver jusqu'à ici, Merci que vous avez toujours cru en moi, Merci d'être toujours à mes côtés. Je vous aime trop, Que Dieu vous protège de tout mal et qu'il accorde tout ce que vous voulez. Un grand merci à mes amies et partenaires, Zeyneb et Bouchra, qui Sans eux, ce travail n'aurait pas eu autant de succès.

Un immense merci à mes chères cousines Amina, Fatima, Choubaila et Dounia aussi qu'à mes chers ami(es) pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible, Merci d'être toujours là pour moi.

Maroua

Dédicace

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

Je dédie ce travail

A celui qui m'a fait de moi une femme, mon père : Saïd

J'ai toujours trouvé auprès de toi, le gout à l'effort qu'il a suscité en moi, de par sa rigueur. Ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A l'être le plus cher de ma vie, Maman : Saïda

Qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Ton amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement à Toi mon Marie : Abd El Rezek

Mercie Pour ton grand confiance, ton soutien, ton affection, Source d'espoir et de motivation.

Une spéciale dédicace à une personne qui a été mon support dans ma vie très paternaliste avec moi Ma très chère grande sœur Leila, que dieu ait pitié d'elle, j'aimerais que tu sois avec moi et son marie ma grand frère Hichem et son petit enfant Chaïte Abd El Djalil source de joie et de bonheur.

Un merci particulier A mes très chères sœurs Wissal, Radja et Hadjer et leurs maris et leurs petites enfants

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

A mes chères amies : Maroua, Zeyneb et Selma.

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mon père et ma mère à qui je dois tout et à qui j'adresse tous mes respects et affection en témoignage de leur soutien, sacrifice et patience, ainsi que pour leurs précieux conseils et orientation dans ma vie. Vous avez été pour moi l'exemple de courage et de l'optimisme.

A mes frères : Chouaib et Chihab.

A mes sœurs : Nabila, Soumia, Bouchra et Sabrina.

A mes binômes : Maroua et Bouchra et à mes chères amies : Amani, Salsabila, Nesrine.

A mes amis de promotion de master.

A mes camarades de la faculté de science de la nature et de la vie d'université des frères mentouri Constantine 1 et à tous ceux que je porte dans mon cœur.

Zeyneb

Liste des Abréviations

- AH** : Activité hemagglutinante.
- ATP**: Adénosine triphosphate.
- BSA**: *Bovine serum albumine*.
- BSL** : Bryothamnion seaforthii lectine.
- BanLec** : lectine de bananes.
- CRD** : Domaine de reconnaissance des glucides.
- CV** : *Chromobacterium violaceum*.
- Cpi** : Ilots de pathogénicité de *Chromobacterium*.
- CRC** : Contrôle de redondance cyclique.
- CR** : Régulatrice de complément.
- CaCl₂** : Chlorure de Calcium.
- EFFD**: la fluorescence à champ évanescent.
- EDTA**: Ethylene diamine tetra acetic acide.
- Fuc** : Fucose.
- Gal** : Galactose.
- GalNAc** : N-acétylglucosamine.
- HA** : Hémagglutination.
- IHA** : Inhibition de l'hémagglutination.
- LPS**: Lipopolysaccharide.
- MBL**: *Mannose-binding lectine*.
- Man** : Mannose.
- NaCl** : Chlorure de sodium.
- NaOH** : L'hydroxyde de sodium.
- NH₄** : Ammonium.
- ORF**: *Open Reading frame*.
- Psi**: *Pound per square*.
- PBS**: *Phosphate buffered saline*.
- PHA**: Polyhydroxyalcanoate.
- SBA** : l'agglutinine de soja.
- SA** : sulfate d'ammonium.
- TSI** : *Triple sugar iron*.
- TSA** : *Tryptone soy Agar*.
- UH** : Unité d'hémagglutination.

WGA : *Wheat germ agglutinin.*

Liste des Figures

Figure 1. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en Complexe avec l'acide sialique (Lenka, 2006).

Figure 2. Lectines végétales proposée par Peumans et VanDamme (houles, 2001).

Figure 3. Lectines bactérienne de surface.

Figure 4. Représente lectines avec préférence pour les oligosaccharides.

Figure 5. Technologie de matrice de lectine.

Figure 6. Essai de la puce à lectine.

Figure 7. L'hémagglutination des érythrocytes (Santose et al.,2014).

Figure 8. Inhibition des lectines par les sucres (Santose et al., 2014).

Figure 9. Ensemble des différents nanomatériaux (Kveton et Blsakova, 2020).

Figure 10. Mécanisme de bio adhésion de la lectine (Coelho et al., 2017).

Figure 11. Les lectines ont induit une activation mitogène in vitro des cellules (Coelho et al.; 2017).

Figure 12. Utilisation d'un polymère biocompatible couplé à une lectine pour détecter l'acide sialique à la surface des cellules vivantes, qui est le biomarqueur le plus important dans le diagnostic du cancer.

Figure 13. Photographie de *Chromobactérium violaceum* sous microscope électronique par balayage.

Figure 14. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Chromobactérium violaceum* (Gills et Ley, 2006 ; Gills et Logan, 2005).

Figure 15. Représente la sensibilité aux antibiotiques et modèle de résistance de *Chromobactérium violacium* par la méthode de diffusion sur disque.

Figure 16. La structure génétique des îlots de pathogénicité de *Chromobactérium violaceum* Cpi-1, Cpi-1a et Cpi-2 sur le chromosome.

Figure 17. Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

Figure 18. Séparation de petites et de grandes molécules par dialyse

Figure 19. Schéma de l'activité hémagglutinante (HA) et de l'inhibition des dosages HA.

Figure 20. Etape de la purification de la lectine CV-III.

Figure 21. SDS-PAGE de CV-III (3) et PA-III (2) purifiés, colorés au bleu brillant de Coomassie.

Figure 22. Comparaison des activités hémagglutinantes de CV-IIL, PA-IIL et RS-IIL vis-à-vis d'érythrocytes.

Figure 23. Agglutination en tube.

Figure 24. Résultat positif d'agglutination sous microscope.

Figure 25. Comparaison de l'inhibition de CV-IIL et PA-IIL par des concentrations décroissantes de divers monosaccharides et d'EDTA.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Distribution des lectines dans la nature.

Tableau 2. La taxonomie de *Chromobactérium Violaceum*.

Résumé

Ce travail décrit la production et les propriétés du CV-IIL (lectine de *Chromobacterium violaceum*) natif, qui est comme la PA-IIL (lectine de *Pseudomonas aeruginosa*) Peut également être un métabolite secondaire entraîné par la détection du quorum sensing, apparaissant en même temps que la violacéine. La souche ATCC 12472 de type sauvage de *Chromobacterium violaceum* a été utilisée afin de mettre en évidence la production des lectines, de les caractériser et de les purifier. La lectine CV-IIL a été purifiée selon différentes étapes. Le pouvoir agglutinant des extraits est mis en évidence en présence de deux types d'érythrocytes humain et animal. Les lectines obtenues après extraction ont subi une pré-purification par sulfate d'ammonium à 70 % et filtration sur gel sépharose 4B couplé au mannose. La précipitation différentielle a montré une activité hémagglutinante de 228,57UM/mg. L'activité spécifique de l'extrait brut était de 256 UH/mg et 1024 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 1024 UH/mg aussi après filtration sur gel sépharose 4B couplé au mannose. La CV-IIL reconnaît le mannose mais affiche une affinité beaucoup plus élevée pour le fucose ce qui est similaire au spectre de préférence de PA-IIL. La taille des sous-unités de CV-IIL (environ 11,86 kDa) est similaire à celles de PA-IIL (11,73 kDa), CV-IIL agglutine préférentiellement les érythrocytes humains α 1-2 H-fucosylé positive (quel que soit leur type A, B ou O) mais en diffère par n'ayant aucune interaction avec les érythrocytes de lapin et présentant une affinité plus forte pour le l-galactose que pour le l-fucose. La plus grande similitude de CV-IIL avec PA-IIL pourrait être liée à l'adaptation sélective de *Chromobacterium violaceum* et de *P. aeruginosa* au tissu animal.

Mots clés : *Chromobacterium violaceum*, lectine, purification, extraction, glycoprotéine, agglutination, chromatographie

Abstract

This work describes the production and properties of native CV-IIL (*Chromobacterium violaceum* lectin), which is like PA-IIL (*Pseudomonas aeruginosa* lectin) and can also be a secondary metabolite caused by quorum sensing, appearing together with violacein. The *C. violaceum* wild type strain ATCC 12472 strain was used to demonstrate the production of lectins, to characterize them and to purify them. The CV-IIL lectin was purified in different steps, The agglutinating power of the extracts was demonstrated in the presence of two types of human and animal erythrocytes. The lectins obtained after extraction were pre-purified with 70% ammonium sulfate and filtration on 4B sepharose gel coupled with mannose. Differential precipitation showed a hemagglutinating activity of 228.57UM/mg. The specific activity of the crude extract was 256 HU/mg and 1024 HU/mg after precipitation with ammonium sulphate and 1024 HU/mg also after filtration on mannose-coupled Sepharose 4B gel. CV-IIL recognizes mannose but shows a much higher affinity for fucose which is similar to the preference spectrum of PA-IIL. The size of the CV- IIL subunits (approximately 11.86 kDa) is similar to those of PA-IIL (11.73 kDa), CV-IIL preferentially agglutinates human α 1-2 H-fucosylated erythrocytes (regardless of their A, B, or O type), but differs in having no interaction with rabbit erythrocytes and exhibiting a stronger affinity for l- galactose than for l- fucose. The greater similarity of CV-IIL to PA-IIL may be related to the selective adaptation of *C. violaceum* and *P. aeruginosa* to animal tissue.

Key words : *Chromobactérium violaceum*, lectine, purification, extraction, glycoprotéine, agglutination, chromatography

ملخص

يصف هذا العمل إنتاج وخصائص CV-III الأصلي (*Chromobacterium violaceum lectin*) ، والذي يشبه PA-III (*Pseudomonas aeruginosa lectin*) وقد يكون أيضاً مستقلاً ثانوياً ناتجاً عن اكتشاف استئصال النصاب ، ويحدث في نفس الوقت من الكمان. تم استخدام السلالة البرية ATCC 12472 من *Chromobacterium violaceum* من أجل توضيح إنتاج الليكتين وتوصيفها وتنقيتها. تمت تنقية محاضرة CV-III وفقاً لخطوات مختلفة. تظهر قوة تكتل المستخلصات في وجود نوعين من كريات الدم الحمراء للإنسان والحيوان. خضعت الليكتينات التي تم الحصول عليها بعد الاستخراج لتنقية مسبقة مع 70 ٪ من كبريتات الأمونيوم والترشيح على هلام sepharose 4B إلى جانب المانوز. أظهر الترسيب التفاضلي نشاط تراص دموي قدره 228.57 UM / ملجم. كان النشاط النوعي للمستخلص الخام 256 UH / mg و 1024 UH / mg بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم ، ثم عند 1024 UH / mg أيضاً بعد الترشيح على هلام sepharose 4B مقترناً بالمانوز. يتعرف CV-III على المانوز ولكنه يعرض تقارباً أعلى بكثير للفوكوز والذي يشبه طيف التفضيل لـ PA-III. يتشابه حجم الوحدات الفرعية CV-III (حوالي 11.86 كيلو دالتون) مع تلك الموجودة في PA-III (11.73 كيلو دالتون) ، وتتراكم CV-III بشكل تفضيلي (α 1-2 H-fucosylated Human erythrocytes) سواء كانت من النوع A أو B أو O ولكنه يختلف عن ذلك من خلال عدم تفاعل مع كريات الدم الحمراء في الأرانج وإظهار تقارب أقوى لـ L-galactose مقارنة بـ L-fucose. يمكن أن يكون التشابه الأكبر بين CV-III و PA-III مرتبطاً بالتكيف الانتقائي لـ *Chromobacterium violaceum* مع الأنسجة الحيوانية.

الكلمات المفتاحية: كروموباكتيريوم فيولاسيوم ، ليكتين ، تنقية ، استخلاص ، بروتين سكري ، تراص ، كروماتوغرافيا

Table des Matières

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé en Français

Résumé en Arabe

Résumé en Anglais

Introduction 1

Bibliographie

| | |
|--|----|
| 1. Les lectines..... | 2 |
| 1.1. Définition..... | 2 |
| 1.2. Historique | 3 |
| 1.3. Structure des lectines..... | 3 |
| A. Les lectines simples..... | 3 |
| B. lectine en mosaïque..... | 4 |
| C. Assemblages macromoléculaires..... | 4 |
| 1.4. Distribution des lectines..... | 4 |
| 1.4.1. Les lectines végétales..... | 4 |
| 1.4.2. Lectines animales..... | 5 |
| A. Lectines de vertébrés..... | 5 |
| B. Lectines d'invertébrés..... | 6 |
| 1.4.3. Lectines des microorganismes..... | 7 |
| A. Virus..... | 7 |
| B. Bactérie..... | 7 |
| 1.5. Sites des lectines..... | 8 |
| 1.6. Spécificité et affinité..... | 9 |
| 1.6.1. Multivalence des lectines..... | 11 |

| | |
|--|----|
| 1.7. Détection des lectines..... | 11 |
| 1.8. Propriétés biologique des lectines..... | 14 |
| 1.8.1. Agglutination des cellules..... | 14 |
| 1.8.2. Liaison avec les sucres..... | 15 |
| 1.8.3. Activité mitogène..... | 16 |
| 1.8.4. Toxicité..... | 16 |
| 1.9. Intérêt des lectines..... | 17 |
| 1.9.1. Chez les animaux..... | 17 |
| 1.9.2. Chez les végétaux..... | 17 |
| 1.9.3. Chez l'homme..... | 18 |
| 1.10. Application des lectines..... | 18 |
| 1.10.1. Dans le domaine Biologique..... | 19 |
| B. Domaine Biomédecine..... | 20 |
| | |
| 2. <i>Chromobactérium violaceum</i> | 23 |
| 2.1. Morphologie et structure..... | 23 |
| 2.2. Caractères cultureux..... | 24 |
| 2.3. Caractères biochimiques..... | 25 |
| 2.3.1. Métabolisme..... | 25 |
| 2.3.2. Production de pigments..... | 26 |
| 2.4. Facteurs de virulence..... | 26 |
| 2.4.1. Mobilité..... | 26 |
| 2.4.2. Les adhésines..... | 27 |
| 2.4.3. Les systèmes de sécrétion de type3..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.4.4. Lipopolysaccharide et la biosynthèse du peptidoglycane..... | 28 |
| 2.4.5. Gènes liés à la synthèse de la violacene..... | 30 |
| 2.4.6. Les lectines..... | 30 |

Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel biologique..... | 31 |
| 1.1. Souche étudiée <i>Chromobactérium violaceum</i> | 31 |
| 1.2. vérification de la pureté de la souche..... | 31 |
| 2. Mise en évidence des lectines..... | 31 |
| 2.1. Fermentation..... | 31 |
| 2.2. Extraction des lectines..... | 31 |
| 2.3. Préparation de lectine purifiées..... | 31 |
| 2.4. Purification des lectines..... | 31 |
| 2.4.1. La précipitation au sulfate d'ammonium..... | 32 |
| 2.4.2. La Chromatographie d'affinité..... | 32 |
| 2.4.3. La dialyse..... | 33 |
| 2.4.4. SDS PAGE..... | 34 |
| 2.5. Teste d'hémagglutination..... | 34 |
| 2.6. Teste d'inhibition d'hémagglutination..... | 35 |

Résultats et discussions

| | |
|---|----|
| 1. Extraction..... | 36 |
| 2. Purification des lectines..... | 36 |
| 2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3. La Dialyse..... | 36 |
| 2.4. SDS PAGE..... | 37 |
| 3. Mise en évidence des lectines | 37 |
| 3.1. Test de l'hémagglutination..... | 37 |
| 3.2. Test d'inhibition d' hémagglutination..... | 39 |
| Discussion Générale | 40 |
| 1. Souche et milieu de culture..... | 40 |
| 2. Purification de lectine..... | 40 |
| 3. Mise en evidence de lectine | 41 |
| 3.1. Test d'hemagglutination..... | 41 |
| 3.2. Test d'inhibition d'hemagglutination..... | 42 |
| Conclusion- perspectives..... | 44 |
| Référence Bibliographique | |
| Annexes | |

Introduction

Introduction

Les lectines sont une classe spéciale de protéines largement distribuées dans la nature, qui reconnaissent sélectivement et se lient de manière réversible aux glucides et aux glycoconjugués via leurs sites de liaison. Ces protéines, qui peuvent être détectées par des tests d'hémagglutination, interagissent avec différents glucides présents à la surface des cellules. Les lectines sont généralement classées selon leur structure, leur spécificité pour les glucides. En fonction de leurs propriétés et de leur répartition dans les tissus, les lectines peuvent jouer des rôles physiologiques importants. La propriété caractéristique des lectines de reconnaître d'autres molécules de manière distincte la rend pertinente dans la recherche impliquant la purification, l'analyse structurale, les applications *in vitro* / *in vivo* de ces macromolécules et les utilisations biotechnologiques dans différents domaines.

Ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux lectines. Au vu de leur rôle, de leur importance et de leur abondance dans tous les micro-organismes ainsi qu'à une certaine facilité de leur purification. Des données considérables ont été recueillies (**Souley, 2002**). Sur la production de lectines par les bactéries pathogènes, et de leur rôle dans l'initiation et le développement du processus pathologique. Et, parmi ces bactéries pathogènes *chromobactérium violaceum*.

Cette bactérie est un habitant commun du sol et de l'eau, elle se comporte comme un saprophyte, mais sporadiquement elle devient un pathogène opportuniste agressif animal (y compris humain), provoquant des infections graves avec une mortalité élevée chez les individus immunodéficients (**Pemberton et al., 1991 ; Shao et al., 2002 ; Alves de Brito et al., 2004**). Dans ce comportement, CV ressemble à la bactérie productrice de pigment vert (pyocyanine) *Pseudomonas aeruginosa*.

En effet, le pathogène opportuniste CV produit une lectine CV-IIL qui a une affinité de plus pour le sucre fucose qu'au mannose avec une exception d'affinité au galactose qu'au fucose.

L'objectif de notre travail est subdivisé en trois étapes, la première étape est une étude bibliographique sur les lectines, la deuxième est le traitement d'un article scientifique qui s'intitule « Production et propriétés de la lectine de liaison au fucose (CV-IIL) native de *C.violaceum* par rapport aux lectines homologue de *Pseudomonas aeruginosa*(PA-IIL) et de *Ralstonia solanacearum* (RS-IIL) et qui a un objectif de caractériser et purifier les lectines ainsi que la mise en évidence de leurs activités agglutinantes, et en troisième lieu résultat et discussion.

Chapitre 1 :

Bibliographie

1. Les lectines

1.1. Définitions

Les lectines sont des protéines capable de se lier spécifiquement de manière réversible aux hydrates de carbone et aux polysaccharides et glycoprotéines agglutinants et / ou précipitants.

Le mot lectine dérive du verbe latin *legere* qui veut dire **sélectionner** ou **choisir**, un nom bien approprié pour cette très importante classe de protéines.

Pour qu'une protéine soit classée comme lectine, elle doit répondre aux trois exigences décrite :

- La lectine est une (glyco) protéine qui contient un domaine de reconnaissance des glucides (CRD).
- La lectine n'est pas une immunoglobuline.
- Biochimiquement, les lectines ne modifient pas les glucides en qu'ils lient. Cela exclut de cette définition les glycosyltransférases, les glycosidases et toute autre enzyme agissant sur les molécules de glucides.

Les lectines ont aussi défini les comme des protéines d'origine non-immune qui ont au moins un domaine non catalytique grâce à ce domaine nommé CRD, ils sont capables de se lier spécifiquement en monosaccharides ou oligosaccharides spécifiques.

Elles ne doivent pas être confondues avec les glycoprotéines (protéines contenant des chaînes de sucre ou des résidus), les lécithines (corps gras chez les animaux et les plantes), ni la leptine (le régulateur de l'appétit et de la faim, le métabolisme et le comportement). Elles sont de nature omniprésente répandues dans la nature non seulement dans les plantes, mais aussi chez les animaux et les microorganismes où elles remplissent diverses fonctions telles que la régulation, de l'adhésion cellulaire lors de la synthèse des glycoprotéines et les niveaux de protéines dans le sang récepteurs chez les animaux.

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

La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène. La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides.

1.2. Historique

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon et Lis, 2004**). À partir de ce moment-là, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes. En 1954, Boyd et Sharp Leigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné. La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction des lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (**Rudiger, 1993**) et leur caractérisation (**Goldstein et al., 1980**). Lorsque certains sucres sont ajoutés lors de l'interaction des lectines avec les érythrocytes, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (**Van Damme et al., 1998**). 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 social des cellules (**Varki, 1993**). Les interactions protéines/glucides sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissances et d'adhésion cellulaires.

1.3. Structure

L'analyse de la structure cristalline aux rayons X de différents types de lectines est utilisée pour illustrer comment la multivalence des sous sites et sous unités confère des propriétés fonctionnelles dans un contexte spécifique en terme de structure (**Rini. M, 1995**). En 1972 ils ont pu de cristalliser la première structure d'une lectine la convaline A qui a été déterminée par diffraction des rayons X, depuis cette date à nos jours, plus de 500 structures cristallines des lectines ont été déterminées (**Gianluca, 2016**). Les lectines sont caractérisés par des feuillets B antiparallèles et la présence d'ions calcium et manganèse fortement liés dans les brins B des lectines, les acides aminés sont hautement conservés.

Les lectines classer selon :

A. Les lectines simple : Ces lectines sont formées de plusieurs monomères (pas forcément identiques), dont la masse moléculaire généralement ne dépasse pas 41KD. Cette classe

Comprend pratiquement toutes les lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose) (Zitouni, 2015).

B. Les lectines en mosaïque (multi domaine) : Dans ce groupe se retrouvent les hémagglutines virales et les lectines animales des types C (encycliques, collectines et sélectines), P et I... molécules de masse variables... (Figure 1).

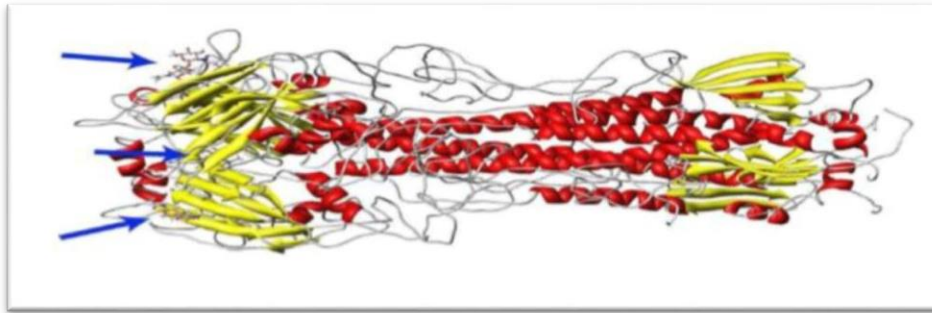


Figure 1. Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (Lenka, 2006).

C. Assemblages Macromoléculaires : Rencontrées chez les bactéries au niveau de fibrilles... de petites unités (30 à 34 kDa) s'insèrent dans la structure du filament.

1.4. Distribution des lectines

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants (Tableau 1).

Tableau 1. Distribution des lectines dans la nature.

| Sugar specificity | Source of lectin | | | |
|-------------------------|---|---|-----------------------------------|---|
| | Plants | Vertebrates | Invertebrates | Microorganisms and viruses |
| Mannose | Fava bean Jack bean Lentil Pea | Rat liver | | <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| Galactose | Castor bean <i>Erythrina cristagalli</i> <i>Griffonia simplicifolia</i> Peanut | Electric eel Human placenta Rabbit liver Snake venom | Beetle Flesh fly Sea urchin | Amoeba <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Slime mold |
| N-Acetylglucosamine | <i>Griffonia simplicifolia</i> <i>Ulex europaeus</i> Wheat | Chicken liver | | |
| N-Acetylgalactosamine | <i>Dolichos biflorus</i> Lima bean Soybean | | Garden snail Cockroach | |
| L-Fucose | <i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ulex europaeus</i> | Eel serum Rat liver | | <i>Vibrio cholerae</i> |
| N-Acetylneuraminic acid | Elderberry Wheat | Frog | Horseshoe crab Lobster Slug | Influenza virus <i>Mycoplasma gallisepticum</i> |

1.4.1. Les lectines végétales

On obtient également les lectines végétales à partir pratiquement de toutes sortes de tissus végétatifs, comme les écorces, les feuilles, les tiges, les fruits et les racines. Lorsqu'ils sont isolés de la même famille et du même tissu, ils sont structurellement similaires, mais peuvent avoir des spécificités différentes (**Santos et al., 2014**). Les lectines végétale se divisent en trois groupes selon le nombre de leur domaine CRD en mérolectines, hololectines et chimérolectines (**Figure 2**).

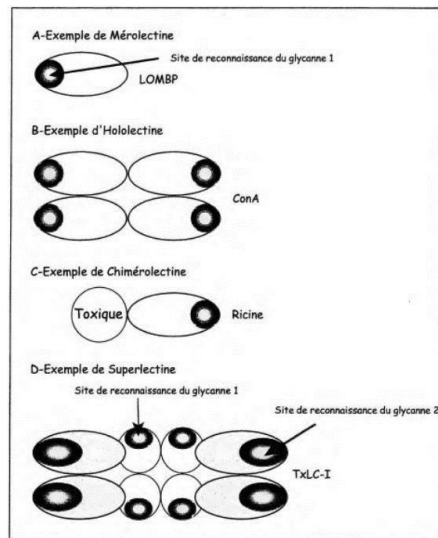


Figure 2. Lectines végétales proposée par Peumas et Van Damme (houles, 2001).

1.4.2. Lectines animales

La principale source de lectines animales était les invertébrés, jusqu'à la fin des années 80. Les lectines animales sont classés en grande partie sur la base des caractéristiques de séquence partagées de leurs domaines de reconnaissance des glucides (CRD) (**Drickamer, 1988; Dodd et Drickamer, 2001**). Selon un récent compter, au moins 12 familles structurelles de lectines animales sont connues pour exister (**Kilpatrick, 2002**), dont les principales sont les lectines de type C (une superfamille), galectines et siglecs.

A. Lectines des vertébrés

C'est La famille la plus répandue des lectines animales est celle des galectines, à l'origine S-lectines. 12 galectines de mammifères ont été décrites, ainsi que de nombreux d'autres espèces, y compris les oiseaux, les vertébrés inférieurs, les vers et les éponges (**Leffler, 2001; Rabinovich et al., 2002; Vasta et al., 1997**). Ils se produisent dans presque tous les types de cellules, à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, La plupart des lectines de vertébrés ont une localisation extracellulaire et sont capables de détecter les modifications de

Glycosylation sur les cellules environnantes. Elles jouent donc un rôle dans La vie sociale des cellules et sont impliquées dans des processus tels que la fécondation, la migration et le développement cellulaire. Par exemple, dans le processus de fécondation, un glycoconjugué de la surface de l'ovule interagit avec une lectine (spermadhésine) du spermatozoïde (**Topfer-Petersen et al., 1998**). Il a été aussi montré que L'embryon exprime à sa surface cellulaire la L-sélectine six jours après la fécondation. En se liant aux sucres spécifiques de l'endothélium utérin, la L-sélectine détermine ainsi la première étape indispensable à la fixation du blastocyste à la surface de l'endomètre et permet le début de la grossesse (**Genbacev et al., 2003**).

a. Galactines : les galectines sont une famille de lectines d'animaux omniprésentes, solubles, spécifiques des b-galactosides, telles que le lactose et la N-acetyl lactosamine. Les galectines se produisent comme monomères et homodimères de sous-unités à masses d'environ 14 kDa, ainsi que des polypeptides plus gros (30–35 kDa), dont chacun contient un ou deux exemplaires d'un domaine de reconnaissance des glucides, connu sous le nom de S-CRD. De importance particulière dans la liaison du glucide à les galectines sont des liaisons hydrogène entre l'hydroxyle C4 groupe du ligand et des chaînes latérales de trois acides aminés (histidine, asparagine et arginine), invariant parmi toutes les galectines séquencées, ainsi que des interactions hydrophobes avec un tryptophane également conservé.

b. Type c : Les lectines de type c nécessitent du Ca^{2+} pour la liaison des sucres. Leur domaine de reconnaissance CRD est désigné comme C-CRD. Leur taille moléculaire est beaucoup plus grande (jusqu'à plusieurs centaines de kDa). La caractéristique de toutes les lectines de type C est qu'elles sont composites, molécules multidomaines, dans lesquelles le CRD est attaché à un nombre variable de domaines polypeptidiques de différents types. La plupart des lectines de cette classe contiennent un étirement hydrophobe de dont ils sont ancrés à la membrane. Lectines de type C sont regroupés en trois familles sélectines, collectines et lectines endocytiques.

B. Lectines d'invertébrés

Pratiquement toutes les classes et sous-classes d'invertébrés examinées ont les lectines. Ceux-ci incluent les crabes, les escargots, les vers (*helminthes*) (**Greenhalgh et al., 1999; Hirabayashi et al., 1998**), les insectes (**Ingram et Molyneux, 1991; Kubo et al., 2001**), mollusques et éponges (**Müller et al., 1997**). Les lectines sont présentes principalement dans l'hémolymphe et les organes sexuels, par exemple les glandes d'albumine et les œufs, et se produisent également sur les membranes des hémocytes, cellules qui fonctionnent dans

L'immunité innée (**Vasta, 1992**). Les plus connus sont Les lectines d'invertébrés proviennent de l'escargot de jardin, *Helix pomatia*, du corps de la paroi de la limace *Limax flavus*, et du sérum de limace *Limulus polyphemus*.

1.4.3. Lectines des Microorganismes

De nombreux microorganismes contiennent des lectines parmi eux : les protozoaires, les virus, et les bactéries.

A. Virus

Les virus contiennent des protéines de surface spécifiques du sucre ou des glycoprotéines qui agissent comme hémagglutinines et sont donc classées comme lectines (**Sharon et Lis, 1997**). De nombreuses informations sont disponibles sur les virus de la grippe et du polyome, appartenant respectivement aux *orthomyxovirus* et aux *papovirus*. Des lectines similaires moins bien définies se retrouvent dans les *myxovirus*, tels que ceux de la maladie de Newcastle, de Sendai et du *rotavirus*. D'autres lectines virales comprennent ceux de la fièvre aphteuse (**Fry et al., 1999**), du VIH (**Haidar et al., 1992**).

B. Bactérie

De nombreuses espèces et genres bactériens expriment généralement des lectines. Souvent un seul type avec des spécificités différentes (**Ofek et Doyle, 1994; Sharon et Liss, 1997**) (**Figure 3**).

| Organism | Carbohydrate specificity | Form ^a |
|--|---|-------------------|
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | Gal β 3GalNAc | GP |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ^b | Fuc α 2Gal β 4GlcNAc | GP |
| <i>Escherichia coli</i> Type 1 | Man α 3(Man α 6)Man | GP |
| P | Gal α 4Gal | GSL |
| S | Neu5Ac α 2,3Gal β 3GalNAc | GSL |
| CFA/1 | Neu5Ac α 2,8- | GP |
| K1 | GlcNAc β 4GlcNAc | GP |
| K99 | Neu5Ac α 2,3Gal β 4Glc | GSL |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | (Neu5Ac α 2,3) _{0,1} Gal β 4GlcNAc- β 3Gal β 4GlcNAc | GSL |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Neu5Ac α 2,3Gal β 4Glc(NAc); Fuc α 2Gal β 3(Fuc α 4)Gal | GP |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Man | GP |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Neu5Ac α 2,3Gal β 4Glc(NAc) | GP |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | (Neu5Ac α 2,3) _{0,1} Gal β 4GlcNAc - β 3Gal β 4GlcNAc | GSL |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Man | GP |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | (Neu5Ac α 2,3) _{0,1} Gal β 4- GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc | GSL |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | Neu5Ac α 2,3Gal β 3GalNAc | GP |
| <i>Streptococcus suis</i> | Gal α 4Gal β | GSL |

Figure 3. Lectines bactériennes de surface.

Dans les bactéries à Gram négatif (telles que *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Salmonellae spp.*). Les lectines se présentent souvent sous la forme de poils submicroscopiques appendices, appelés fimbriae (ou pili), qui dépassent de la surface des cellules. Dans de rares cas, les lectines sont principalement intracellulaire. Deux de ces lectines, PA-IL et PA-IIL ont été isolées à partir de *Pseudomonas aeruginosa* (Gilboa-Garber *et al.*, 1997). Certaines bactéries, principalement les Gram négatif et exceptionnellement les Gram positif, présentent à leurs surfaces des organelles dites fimbriae ou pili. Les pili interviennent dans divers processus, notamment, la reconnaissance et l'adhésion sur les cellules. Ils sont donc les principaux responsables de processus pathogènes envers les organismes eucaryotes. Les pili sont des structures protéiques filamenteuses de 1 à 2 μm de longueur exprimés en centaines de copies à la surface de la bactérie. Trois types de pili ont été distingués; les pili de type IV, les pili de type P et les pili de type I (Merouane, 2016).

1.5. Sites des Lectines

Le site de liaison d'une lectine est généralement constitué par un creux sur la surface de la protéine, dont la forme ne varie pas beaucoup après la liaison du ligand. La lectine interagit avec le ligand par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (Goldstein et Portez, 1986). Les interactions de type salin ne sont pas généralement impliquées dans les interactions lectines-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide

Sialique (**Pontet, 1996**). Les lectines ne modifient pas biochimiquement les hydrates de carbone aux quels se lient (**Gabius, 1985**).

Les lectines reconnaissent et se lient aux glucides spécifiques présents à la surface des cellules. Ils jouent généralement un rôle dans l'interaction et communication entre les cellules pour la reconnaissance. Les glucides à la surface d'une cellule se lient aux sites de liaison de la lectine à la surface d'une autre cellule. La liaison est due à la forte attraction formée par de nombreuses interactions faibles. Les lectines contiennent généralement au moins deux sites de liaison pour les unités glucidiques. De plus, la spécificité de liaison aux glucides de certaines lectines est déterminée par les résidus d'acides aminés qui se lient aux glucides. Les lectines sont des protéines spécifiques de liaison aux glucides :

Une variété de glucides a une signification biologique : différents monosaccharides peuvent être connectés les uns aux autres par le biais de plusieurs groupes –OH. Une ramification étendue est possible. Par rapport aux oligopeptides de quatre acides aminés, plus d'oligosaccharides différents peuvent être formés par 4 types de sucres-lectines favorisant l'interaction entre les cellules : les lectines sont conçues pour favoriser le contact de cellule à cellule. L'interaction de type C non covalente de la lectine relie la lectine et les glucides (le calcium interagit directement avec le groupe sucre –OH, et les ions calcium sur la protéine agissent comme un pont entre la protéine et le sucre la spécificité de liaison aux glucides d'une lectine particulière est déterminée par les résidus d'acides aminés qui se lient aux glucides).

https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Carbohydrates/Lectins

1.6. Spécificité et Affinité

Les lectines présentent une affinité et une spécificité relativement élevées pour les oligosaccharides des glycoprotéines et des glycolipides.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995448/>

La caractéristique des lectines est la capacité à se lier spécifiquement aux glucides et de manière réversible. L'utilisation des lectines à des fins diverses, nécessite la connaissance de cette spécificité.

La spécificité des lectines est la capacité de différents sucres monosaccharides, oligosaccharides ou glycopeptides à inhiber soit l'hémagglutination soit la précipitation de

Polysaccharides (ou glycoprotéines) par la lectine mais la majorité de celles-ci ne reconnaissent que quelques-uns des sucres existant dans la nature (**Charon, 2009**).

La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugué.

L'affinité est généralement modulée par la présence d'un substituant sur le carbone anomérique du monosaccharide et donc ces lectines reconnaissent aussi des di- ou trisaccharides. Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnus par les lectines on retrouve le mannose, le fucose, le galactose/GalNAc et la N-acetylglucosamine. Très peu de lectines reconnaissent l'acide sialique sous la forme de monosaccharide (**cioci, 2006**).

Plusieurs lectines combinent également avec des ligands non glucidiques, soit au niveau de leurs sites de liaison glucidique, soit au niveau de sites distincts de ces derniers (**Sharon et Lis, 2003**).

Les lectines se divisent en deux catégories celles qui présentent une affinité pour les monosaccharides et l'autre pour les oligosaccharides mais l'affinité pour les monosaccharides est plus faible que les oligosaccharides (**Figure 4**).

Table 5.1 Lectin: with preference for oligosaccharides

| Lectin | Specificity | | RIA* |
|------------------------------|----------------|--|---------------|
| | Monosaccharide | Oligosaccharide structure | |
| Concanavalin A | Man | Man α 3(Man α 6)Man | 130 |
| <i>Datura stramonium</i> | GlcNAc | GlcNAc β 4GlcNAc β 4GlcNAc | 550 |
| <i>Dolichos biflorus</i> | GalNAc | GalNAc α 3GalNAc | 36 |
| Elderberry | Gal | NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal | 30-80 1600 |
| <i>Erythrina crustagalli</i> | Gal | Gal β 4GlcNAc | 30-50 |
| Peanut | Gal | Gal β 3GalNAc Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 | 50 |
| E-PHA | None | GlcNAc β 4 GlcNAc β 2Man α 3 Man β 4-R [†] | |
| L-PHA | None | Gal β 4GlcNAc β 6 Man Gal β 4GlcNAc β 2 NH ₂ -1.en | |
| <i>Vicia graminea</i> | None | (Gal β 2GalNAc α) — Ser (Gal β 2GlcNAc α) — Thr (Gal β 2GalNAc α) — Thr Glu — COOH | |
| <i>Vicia villosa</i> | GalNAc | NH ₂ (GalNAc α) — Ser (Pro) ₂ Gly (Ala) ₂ (GalNAc α) — Thr — COOH | 120 |
| Wheat germ | GlcNAc | GlcNAc β 4GlcNAc β 4GlcNAc | 3000 |

Figure 4. Représente lectines avec préférence pour les oligosaccharides.

Certaines lectines possèdent deux ou plusieurs sites de fixation. On peut classer les lectines en trois catégories selon la nature de leur domaine de reconnaissance glucidique :

Type P reconnaissant le mannose 6-phosphate, Type S reconnaissant le β -galactoside, Type C reconnaissant divers sucres par une liaison impliquant le Ca^{+2} (**Kamoun, 2003**).

La sélectivité des lectines vis-à-vis de leurs ligands est relativement importante. Par exemple, les lectines spécifiques du galactose ne réagissent pas avec le glucose, son Épi mère en C4 ou avec le mannose ; épi mère du glucose en C2. De la même manière, les lectines spécifiques du mannose, ne reconnaissent pas le galactose. Cependant, ces règles ne sont pas toujours vérifiées (**Goldstein et Poretz, 1986**). Par exemple, la plupart des lectines qui fixent le galactose, dont l'agglutinine de soja (SBA), reconnaissent aussi son homologue N-acétylé.

1.6.1. Multivalence des Lectines

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence est la propriété de base de l'activité de la lectine, qui conduit à la combinaison de plusieurs molécules de glucides avec des molécules de lectine (ou assemblages moléculaires). Cette multivalence peut provenir de la répétition de type «Tandem» de domaine lectine dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Dans certains cas, le monomère de lectine peut avoir un ou plusieurs sites de liaison aux glucides. Dans d'autres cas, les monomères de lectine à site unique sont habituellement combinés sous la forme de dimères, trimères, tétramères, etc..., qui produiront également des états multivalents pour les glucides. Un autre type de lectine montre qu'il existe deux CRD différents connectés par un domaine de liaison (linker). Comme dans le cas des lectines appelées lectines chimériques, ces deux domaines peuvent présenter des spécificités différentes, ou l'un d'entre eux peut avoir une activité enzymatique (ou autre). De multiples interactions entre les protéines et les glucides peuvent être impliquées dans le processus de reconnaissance.

Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques semblent utiliser des interactions faibles mais multivalentes plutôt que des interactions fortes uniques. Par conséquent, la multivalence est utilisée non seulement pour obtenir l'affinité ou l'avidité nécessaire, mais également pour assurer la haute spécificité pour l'interaction avec certains types de surfaces cellulaires (**Lee et Lee, 1995**).

1.7. Détection des lectines

Les lectines ont été détectées biologiquement par des tests d'héماغglutination. Actuellement elles sont détectées avec des nouvelles techniques (*lectin array technologie*) tel que : les étiquettes fluorescentes, la détection ratiométrique, la fluorescence à champ évanescent (EFFD). L'EFFD a été largement utilisé pour les biocapteurs pour étudier les événements de liaison en temps réel sur les surfaces des lames de verre. Cette méthode présente l'avantage d'analyser les interactions relativement faibles (par exemple, entre les lectines et les glycoprotéines).

La fluorescence des protéines (lectines) provient de la présence des résidus d'acides aromatiques, c'est-à-dire le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Lors de la conjugaison, il y a une diminution de l'intensité de fluorescence due à l'énergie de résonance Forster, mécanisme de transfert (FRET) (**Bala Subramaniyan et al., 2019**). Dans leur étude utilisée des QD conjugués à la lectine de Cramoll et analysé qu'il y a un décalage de pic après conjugaison de la lectine à la nanoparticule.

Cette nouvelle détection est utilisée dans une nouvelle technologie qui est *lectin microarray technologie*. Le micro réseau ou les puces des lectines c'est une technologie qui utilise un panel de lectines immobilisées sur un substrat bien défini pour une analyse complète des glycanes et des glycoprotéines. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995448/> Elles fournissent une nouvelle plate-forme d'analyse des glycanes, qui permet une analyse rapide et sensible des glycanes complexes sans nécessiter de leur libération de la protéine. Les développements récents de cette technologie permettent une analyse à haut débit de ces derniers (les glycanes) dans des échantillons biologiques complexes. Actuellement, elle est utilisée dans le domaine biomédical, elle devient un outil puissant et indispensable pour la découverte des bio marqueurs glycoprotéiques <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7050261/> , Elle est largement utilisée pour évaluer les caractéristiques du tumeur et pour cribler de nouveaux bio marqueurs diagnostiques du cancer (**Syed et al., 2016**).

Cette technique est appliquée pour la découverte de bio marqueurs tel que : Découverte de bio marqueurs du cancer, de maladies inflammatoires, et d'autres maladies comme la Néphropathie diabétique qui est une complication grave du diabète, Découverte de bio marqueurs de cellules souches, Découverte de bio marqueurs de cellules souches, tropisme bactérien, détection des pathogènes <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7050261/> (**Figure 5**).

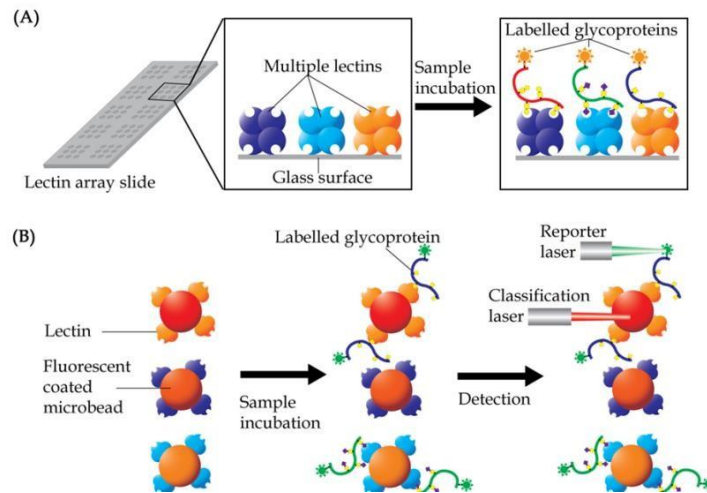


Figure 5. Technologie de matrice de lectine.

(A) Plusieurs lectines sont imprimées sur une diapositive, qui est organisée dans une grille, une seule lectine par point, format. Les échantillons, qui sont généralement pré-marqués avec un fluorophore ou un chromophore, sont ensuite autorisés à interagir avec les lectines. Les taches de lectine, qui contiennent les glycoprotéines marquées, s'illuminent sous un scanner approprié.

(B) Dans l'analyse de réseau de perles de lectine, différentes perles colorées fluorescentes, chacune correspondant à une seule lectine, sont souvent utilisées. Les billes conjuguées sont ensuite autorisées à interagir avec les échantillons et les matériaux non liés sont éliminés par lavage. Les billes sont ensuite passées à travers un détecteur avec deux sources laser, le laser de classification identifiant les billes spécifiques, tandis que le laser rapporteur quantifie la présence des échantillons marqués.

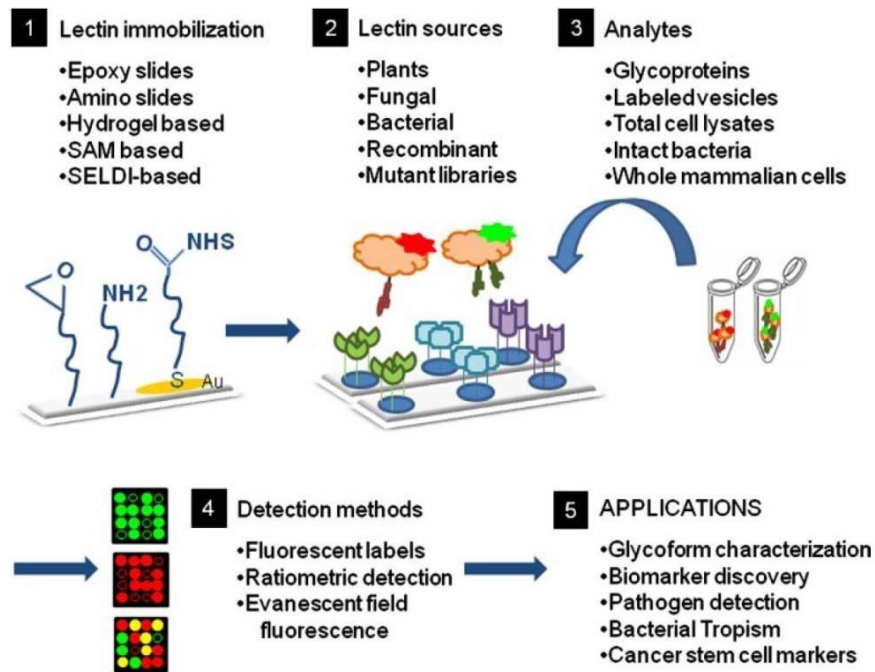


Figure 6. Essai de la puce à lectine.

1.7. Propriétés Biologiques des Lectines

1.7.1. Agglutination des Cellules

L'agglutination est la manifestation la plus facilement détectable de l'interaction d'une lectine avec les cellules, elle est utilisée pour révéler la présence d'une lectine dans une source biologique. La capacité d'agglutiner les cellules distingue les lectines des autres macromolécules liant le sucre, telles que glycosidases et glycosyltransférases. Pour que l'agglutination se produise, la lectine liée doit former plusieurs ponts croisés entre les cellules apposées. Il n'y a cependant pas de relation simple entre la quantité de lectine liée et l'agglutination. En effet, l'agglutination est affectée par de nombreux facteurs, tels que les propriétés moléculaires de la lectine (par exemple, le nombre de sites de liaison aux saccharides, la taille moléculaire), les propriétés de surface cellulaire (par exemple nombre et accessibilité des sites récepteurs, fluidité de la membrane) et état métabolique des cellules.

La contribution relative des différents facteurs dépend à la fois de la lectine et des cellules examinées. De plus, l'agglutination est affectée par les conditions externes de l'analyse telle que la température, la concentration cellulaire, le mélange etc...

L'agglutination se produit et est inhibée par un sucre approprié, elle peut être considérée comme une indication que les structures glucidiques pour lesquelles la lectine est spécifique sont présentes à la surface des cellules. L'agglutination avec des lectines est également utile pour suivre les changements sur les surfaces cellulaires au cours des processus physiologiques et pathologiques.

1.7.2. Liaison avec les Sucres

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité lectine. La détermination du sucre spécifique est déduite à partir de l'interférence avec la liaison de dérivés sucres appelés «Haptènes» par analogie avec le terme immunologique. Cette spécificité fut d'abord étudiée sur les érythrocytes, et l'on a trouvé des lectines spécifiques des groupes sanguins, A, B, O, H, M et N (**Figure 7**). <https://www.universalis.fr/encyclopedie/lectines>

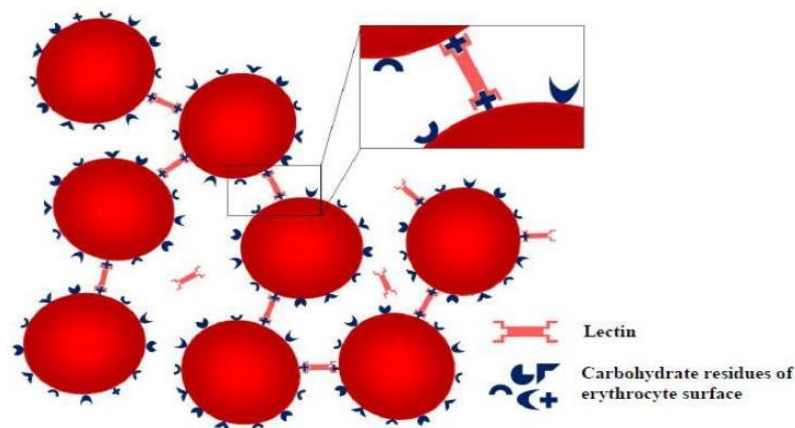


Figure 7. L'hémagglutination des érythrocytes (Santos *et al.*; 2014).

La plupart des lectines présentes plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection et leur caractérisation. 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 (**Karoline, 2008**) (**Figure 8**).

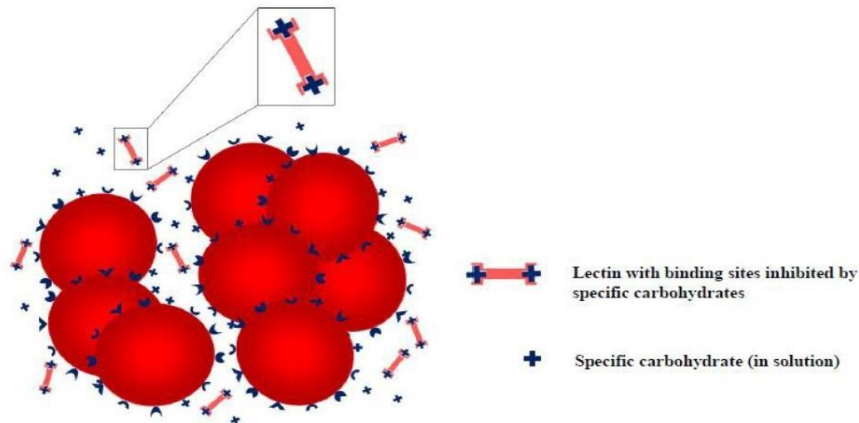


Figure 8. Inhibition des lectines par les sucres (Santos *et al.*, 2014).

1.7.3. Activité Mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (Zitouni, 2015).

1.7.4. Toxicité

Plusieurs lectines par exemple la concanavaline A, l'agglutinine de germe de blé, la PHA et la lectine de *Robinia pseudoacacia* sont toxiques pour les cellules de mammifères à la fois in vitro et in vivo. Leur toxicité est cependant beaucoup plus faible (1000-2000 fois lors des tests in vivo) que celle des toxines ricine et abrine.

Ces toxines, ainsi que la modécine des racines d'*Adenia digitata* (Olsnes *et al.*, 1978; Stirpe *et al.*, 1978) sont discutés non seulement car elles sont structurellement similaires aux lectines dérivées du même plantes mais parce qu'elles agissent aussi en se liant aux sucres de la surface cellulaire et parce que leur mécanisme d'action est compris. Les lectines toxiques sont généralement sélectives dans leur action sur les cellules. Il n'est donc pas surprenant que des tentatives aient été faites pour inhiber croissance tumorale par des lectines in vivo. L'effet protecteur de la ricine (Fodstad et Pihl, 1978, 1980; Lin *et al.*, 1970), de la concanavaline A (Itaya *et al.*, 1981; Shoham *et al.*, 1970) et la lectine Griffonia simplicifolia I (Eckhardt *et al.*, 1982; Maddox *et al.*, 1982) contre la croissance tumorale chez les animaux de laboratoire, seuls ou en association avec des médicaments anticancéreux, et de la ricine et abrin chez l'homme (Tung *et al.*, 1971) a été décrit Comme la base moléculaire de la cytotoxicité des toxines végétales la ricine. Ces toxines sont constituées de deux chaînes

Reliées par Liaisons disulfure. La chaîne la plus lourde (β) possède la liaison au site glucides, alors que la chaîne plus légère (α) inhibe la synthèse des protéines dans les cellules des systèmes, représentant ainsi le fragment toxique de la molécule; seulement la molécule intacte est active sur les cellules. Après la liaison à la surface cellulaire résidus de galactose (ou N-acétylgalactosamine) via la chaîne β , les toxines sont absorbés par la cellule où la chaîne α inhibe la synthèse des protéines par interférant avec l'élongation de la chaîne peptidique sur les polyribosomes. Une activité structurelle à une relation similaire à celle trouvée dans l'abrin, la ricine et la modécine est également trouvée dans la diphtérie et les toxines du choléra. Les toxines bactériennes sont constituées de deux domaines avec des fonctions analogues à celles des chaînes β et α de les toxines végétales; l'un d'eux se lie à la surface cellulaire, tandis que l'autre est responsable de l'effet toxique (**Liener, 2012**). En outre de l'adhésion l'hémagglutination, la toxicité et d'autre propriétés des lectines, elles ont des différents rôles de défense contre les pathogènes elles ont des activités antiviral, antifongique et antibactérienne ainsi qu'anticancéreuse... (**Nascimento et al., 2012**).

1.8. Intérêt des Lectines

1.8.1. Chez les Animaux

Les lectines remplissent de nombreuses fonctions biologiques différentes chez les animaux, de la régulation de l'adhésion cellulaire à la synthèse des glycoprotéines et au contrôle des taux de protéines dans le sang. Ils peuvent également se lier aux glycoprotéines extracellulaires et intercellulaires solubles. Certaines lectines se trouvent à la surface des cellules hépatiques de mammifères qui reconnaissent spécifiquement les résidus de galactose. Ces récepteurs de surface cellulaire sont responsables de l'élimination de certaines glycoprotéines du système circulatoire. Une autre lectine est un récepteur qui reconnaît les enzymes hydrolytiques contenant du mannose-6-phosphate, et cible ces protéines pour être délivrées aux lysosomes. Les lectines sont également connues pour jouer un rôle important dans le système immunitaire en reconnaissant les glucides qui se trouvent exclusivement sur les agents pathogènes, ou qui sont inaccessibles sur les cellules hôtes. Des exemples sont la voie d'activation du complément de lectine et la liaison mannose-lectine.

https://openwetware.org/wiki/Lectin?fbclid=IwAR08OVvHw2fWDVvjmnTwR_wY88kyhmdoo84RR0UTEj3qQlOugiw7yk0pTHg

1.8.2. Chez les végétaux

Les lectines jouent un rôle important dans la protection de la plante contre les prédateurs en affectant la croissance et le développement des insectes et en présentant des toxines aux herbivores. Les lectines ont la capacité de se lier spécifiquement aux hyphes fongiques et de prévenir la consommation de nutriments et l'incorporation des précurseurs requis pour la croissance du champignon, elles ont une Activités insecticides exemple : *Ostrinianubilabis* et *Diabroticaundecimpunctatase* nourrissent sur le maïs. La lectine du blé et la lectine des graines *Bauhinia purpurea* ont des effets létaux pour ces deux insectes (**Santos et al., 2014**).

1.8.3. Chez L'homme

Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le Secteur biomédical. Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang. D'autre lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires, Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies tel le cancer (**Karoline, 2008**).

1.9. Application des Lectines

Les lectines sont des outils biotechnologiques importants avec de nombreuses applications en biomédecine et en agriculture (**Nascimento et al., 2012**). Elles sont devenues l'un des outils les plus exploités pour étudier les glycoprotéines dans les échantillons biologiques. Elles ont été utilisées pour la purification et la détection des glycoprotéines. les lectines sont appliqué dans nouvelle technique et technologie par exemple la détection nanoélectronique des interactions lectine-glucides à l'aide de nanotubes de carbone (**Vedala et al., 2011**). leur utilisation dans le domaine de Conjugaison -lectine nanoparticule comme : Conjugaison nanoparticule métallique/ polymère-lectine tel que : Nanoparticules polymères fluorescentes marquées à la lectine pour le ciblage de l'acide sialique sur les cellules vivantes (**Cho et al., 2014**) (**Figure 9**).

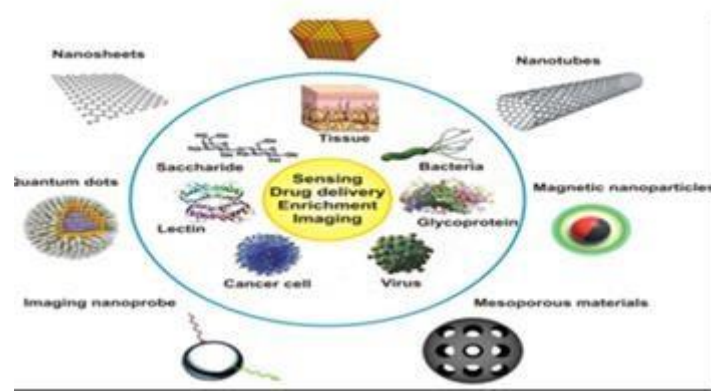


Figure 9. Ensemble des différents nanomatériaux (Kveton et Blsakova, 2020).

Les lectines marquées par fluorescence sont utilisées comme réactifs histochimiques et cytochimiques pour la détection des glycoconjugués dans les coupes de tissus sur les cellules et les organites subcellulaires, et dans les investigations des voies intracellulaires de glycosylation des protéines (Angeloni *et al.*, 2005 ; Uchiyama *et al.*, 2006).

Elles sont employées dans Séparation cellulaire, Isolement et études structurales des glycoconjugués, Identification des Microorganismes et aussi en tant que vecteurs de médicaments (Liener, 2012) (Figure 10).

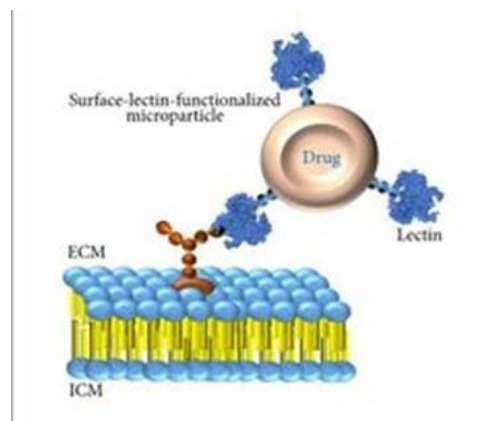


Figure 10. Mécanisme de bio adhésion de la lectine (Coelho *et al.*, 2017).

1.9.1. Dans le domaine biologique

Les lectines constituent des outils de travail remarquables dans l'étude de plusieurs problèmes biologiques, et leurs utilisations se multiplient. C'est ainsi qu'elles sont fréquemment employées en hématologie, immunologie, sérologie, cancérologie, biologie cellulaire, et en biotechnologie etc...

En Hématologie

Elles sont couramment utilisées pour caractériser les groupes sanguins, séparer les leucocytes et les érythrocytes, agglutiner les cellules sanguines afin de séparer le plasma, déceler et isoler les macromolécules contenant des résidus saccharidiques, et parmi ces macromolécules, déterminer les antigènes des groupes sanguins.

En Immunologie

Par leur interaction avec les saccharides, elles servent de modèle pour les anticorps spécifiques des hydrates de carbone. Elles offrent l'avantage d'être disponibles purifiées en quantité notable. L'autre avantage tient à ce que les sites de liaison sont homogènes et non interactifs contrairement à ceux des anticorps immuns. Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour détecter les sensibilisations dues aux maladies infectieuses, pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immunothérapies. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/lectines> Elles servent dans le diagnostic de maladies génétiques liées à des anomalies chromosomiques ainsi que dans celui d'états de poly agglutination qui accompagne certaines infections bactériennes et virales (**figure 11**).

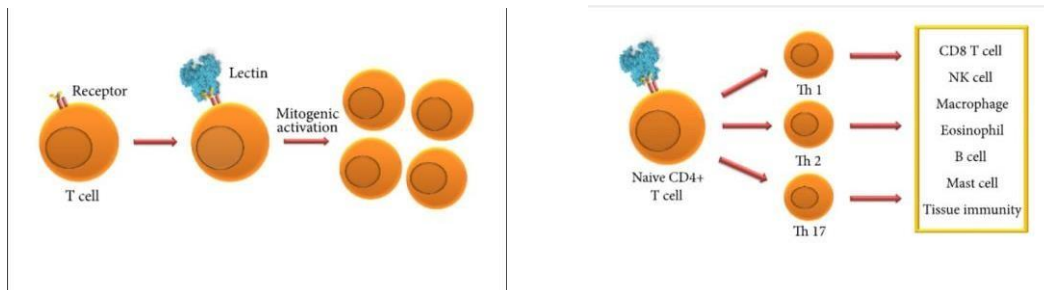


Figure 11. Les lectines ont induit une activation mitogène in vitro des cellules T et ont stimulé les réponses Th1, Th2 et Th17 in vivo (Coelho *et al.*, 2017).

1.9.2. Domaine de biomédecine

En plus de l'application clinique dans le typage des groupes sanguins des lectines elles sont également impliquées dans la cancérologie. Dans la recherche sur le cancer, les phytohématagglutinines permettent de révéler les différences de propriétés des surfaces des

Cellules tumorales et normales grâce à la visualisation des changements (**figure 12**).

<https://www.universalis.fr/encyclopedie/lectines/>

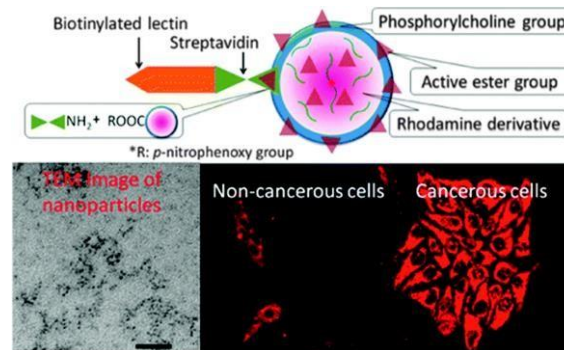


Figure 12. Utilisation d'un polymère biocompatible couplé à une lectine pour détecter l'acide sialique à la surface des cellules vivantes, qui est le biomarqueur le plus important dans le diagnostic du cancer.

Elles ont été utilisées pour la purification et la détection de glycoprotéines qui montrent une expression aberrante dans de nombreux cancers.

L'utilisation des lectines dans nouvelle technologie tel que l'Application des micros réseaux de lectines pour la découverte de biomarqueurs permet de la Découverte de biomarqueurs du cancer comme (le Cancer du poumon, Cancer de l'estomac, Cancer colorectal, Carcinome hépatocellulaire, Cancer du sein, Cancer du pancréas, cancer de la vessie, Cancer des ovaires) aussi que la détection d'autre maladie (**Dang et al., 2020**). L'histochimie de la lectine a démontré que la liaison de l'agglutinine de germe de blé (WGA), une protéine liant la lectine qui se lie spécifiquement aux résidus de GlcNAc/acide sialique, était augmentée dans les tissus du CRC, suggérant que les glycoprotéines portant des sucres spécifiques pourraient être associées à une progression maligne.

Les lectines ont aussi utilisé pour une application de guérison

- Une lectine isolée de l'algue rouge marine *Bryothamnion seaforthii* (BSL) a démontré un potentiel de guérison des plaies cutanées chez la souris.
- La thérapie de remplacement de la lectine liant le mannose (MBL) a été signalé comme une stratégie de guérison d'un ulcère chronique radio-induit.

Les lectines jouent un rôle des agents anticancéreux :

Les lectines sont capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses in vitro. Une lectine de liaison au mannose de *Clematis Montana* a induit l'apoptose dans les cellules L929 (*fibrosarcome murin*) avec activation des caspases. Les auteurs ont proposé qu'il existe une

Corrélation entre la capacité de liaison aux glucides et l'effet anticancéreux de cette lectine puisque l'activité cytotoxique diminuait avec le test réalisé en présence de mannose. Dans le même sens, ont attribué la mort des cellules NB4 (leucémie) promues par la lectine *Artocarpus heterophyllus* à la reconnaissance d'un noyau trimannosyle de N-glycanes contenant une branche β 1, 6-N-acétylglucosamine liée à l' α -1,6-mannose (Coelho *et al.*, 2017).

En biotechnologie : Une lectine (BanLec) de bananes inhibe le VIH-1 in vitro (Swanson *et al.*, 2010).

Chapitre 02 :

Chromobactérium violaceum

2. *Chromobacterium Violaceum*

C'est un habitant du sol et des eaux stagnantes des régions tropicales et subtropicales, il est essentiellement saprophyte mais parfois décrite comme pathogène chez les animaux et l'homme (**Durán et Menck, 2001**). Il peut provoquer des infections, La taxonomie de *Chromobacterium Violaceum* est représentée dans le (**Tableau 2**).

Tableau 2. La taxonomie de *Chromobacterium Violaceum*.

| Classification scientifique | |
|--|---------------------|
| Royaume | Les bactéries |
| Phylum | Protéobactéries |
| Classer | Bêtaprotéobactéries |
| Ordre | Neisseriales |
| Famille | Neisseriaceae |
| Genre | Chromobactérie |
| Espèce | <i>C. violaceum</i> |
| Nom binomial <i>Chromobacterium violaceum</i> | |

2.1. Morphologie et Structure

Il appartient aux bêta-protéobactéries, c'est un coccobacille (Bâtonnets coccoïdes), Gram négatifs à extrémités arrondies, sa taille est de $0,6-0,9 \times 1,5-3,0 \mu\text{m}$, anaérobie facultatif. Cette bactérie n'est pas acido-résistante, n'a pas de capsule ou de granules métachromatiques, et non sporulantes (**Sneath, 1956**). Elle est mobile par un seul flagelle polaire ou plusieurs flagelles subpolaires ou latéraux. Contient généralement des cristaux de poly-bêta-hydroxy butyrate, Elle est connue pour être une souche reporter dans la détection de quorum, elle produit un antibiotique naturel appelé violacéine, qui peut être utile pour le traitement du côlon et d'autres cancers voir (**Figure 13**).



Figure 13. Photographie de *Chromobactérium violaceum* sous microscope électronique par balayage.

2.2. Caractères Cultureux

La bactérie se développe rapidement sur la gélose au sang de mouton à 5%. D'autres géloses telles qu'une gélose nutritif, gélose MacConkey et la gélose au chocolat, TSI, TSA ou un bouillon nutritif peuvent également être utilisées pour cultiver cet organisme après une incubation anaérobie pendant 24 heures (Liu *et al.*, 2012). Les colonies sont produites de manière optimale pendant l'incubation à 22°C, elles apparaissent avec un éclat métallique violet foncé (en raison de la production de violacéine), mesurant environ 1mm de diamètre, elles sont circulaires, convexes basses et lisses, distinctives, de consistance butyreuse et s'émulsionnent facilement dans l'eau), elles dégagent une odeur de cyanure d'ammonium. Certaines souches de bactéries qui ne produisent pas ce pigment ont également été signalées. https://wikimili.com/en/Chromobacterium_violaceum

La plage de température de croissance est de 10-40°C optimale. PH optimal 7-8 (pas de croissance en dessous de pH 4). Elle Pousse dans 2 % de Na Cl, mais pas dans des milieux à 4 % de Na Cl (**Figure 14**).

| No. | Characteristic | Description |
|-----|-------------------|---|
| 1 | Size | (0.6–0.9 × 1.5–3.0) μm |
| 2 | Shape | Rods with rounded end |
| 3 | Motility | Motile by means of a single polar flagellum |
| 4 | Growth at 4 °C | – |
| 5 | Growth at 30 °C | + |
| 6 | Growth at 37 °C | + |
| 7 | Growth at pH 4 | + |
| 8 | Growth at pH 3 | – |
| 9 | Growth in 1% NaCl | + |
| 10 | Growth in 2% NaCl | + |
| 11 | Growth in 4% NaCl | – |
| 12 | Anaerobic growth | + |

Figure 14. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *C. violaceum* (Gills et Ley, 2006 ; Gills et Logan, 2005).

2.3. Caractères Biochimiques

2.3.1. Métabolisme

C. violaceum est connu pour son adaptabilité à métaboliser dans des conditions aérobies et anaérobies. Le principal facteur qui joue dans cette partie est un métabolisme générateur d'énergie flexible et efficace. Dans des conditions aérobies, l'organisme ne peut pas synthétiser le glucose pour produire de l'énergie et a donc recours à des processus tels que la voie Embden-Meyerhoff, l'acide tricarboxylique et d'autres chaînes respiratoires pour produire de l'énergie cellulaire. L'ATP est produite dans des conditions aérobies. quant aux conditions anaérobies, la bactérie métabolise le glucose pour produire des acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide formique (**Creczynski-Pasa *et al.*, 2004**).

Cv fermente le glucose, le tréhalose, la N- acétylglucosamine et le gluconate mais pas le L- arabinose, le D- galactose ou le D- maltose. Il est positif pour les réactions de catalase et d'oxydase voir (**Figure 15**). Les isolats bactériens dans de nombreux cas peuvent montrer une résistance de haut niveau à une gamme d'antibiotiques.

Table 2. Antibiotic sensitivity and resistant pattern of *Chromobacterium violaceum* by disc diffusion method.

| Antibiotic | Result | Antibiotic | Result |
|----------------|--------|-------------|--------|
| Norfloxacin | S | Cefotaxime | R |
| Aztreonam | S | Ceftriaxone | R |
| Nalidixic acid | S | Cefuroxime | R |
| Nitrofurantoin | S | Ceftazidime | R |
| Gentamycin | S | Cefixime | R |
| Amikacin | S | Cefdinir | R |
| Ciprofloxacin | S | TIC/CLA | R |
| Ofloxacin | S | Meropenem | R |
| Levofloxacin | S | Cefprozil | R |
| Moxifloxacin | S | Cefpirome | R |
| CEF/SUL | S | Ceftizoxime | R |
| PIP/TAZ | S | Cefpodoxime | R |
| Sparfloxacin | S | IMP-CLS | R |
| Gemifloxacin | S | Tobramycin | R |

S=Sensitive, R=Resistant, CEF/SUL=Cefoperazone/sulbactam, PIP/TAZ=Piperacillin/tazobactam, TIC/CLA, Ticarcillin-clavulanic acid, IMP-CLS=Imipenem -cilastatin

Figure 15. Représente la sensibilité aux antibiotiques et modèle de résistance de *Chromobacterium violacium* par la méthode de diffusion sur disque.

2.3.2. Pigmentation

Chromobacterium Violaceum pousse facilement sur des milieux ordinaires comme la gélose au sang, la gélose MacConkey et la gélose nutritive, produisant un pigment antioxydant violet connu sous le nom de violacéine (Yang et Li, 2011). C'est un pigment naturel qui est responsable de leur teinte violette bien distincte.

Elle possède des propriétés antibiotiques (antibactériennes, antifongiques et anti-tumeurs). Elle est active contre les compétiteurs et les prédateurs de cette bactérie (Dessaux *et al.*, 2004).

2.4. Facteur de Virulence

Sont des armes qui servent les agents pathogènes pour agresser leurs hôtes.

C. violaceum a un bagage génétique également compatible avec une bactérie potentiellement Pathogène.

2.4.1. Mobilité

Parmi les exo protéines identifiées, beaucoup sont impliquées dans la motilité cellulaire, toutes appartenant à l'appareil flagellaire (CV_1703, CV_1706, CV_1709, CV_1710, CV_2994 et CV_3011). Le flagelle peut contribuer à la pathogénicité en tant que

Système de sécrétion de protéines non flagellaires, et cet appareil peut posséder des fonctions supplémentaires telles que l'adhésion cellulaire (**Lepka et Wilharm, 2010**).

2.4.2. Les Adhésines (Systèmes de Sécrétion de Type IV Fimbriae)

Pilis sont un important facteur de virulence associé aux cellules qui joue un rôle crucial dans la médiation de l'adhérence et de la colonisation bactériennes. Il ne sont pas seulement impliqués dans les événements d'invasion, nécessaires lors du contact initial, mais qu'ils sont également impliqués dans diverses autres fonctions lors de l'infection, selon le mécanisme bactérien.

Chromobacterium Violaceum possède plusieurs gènes impliqués dans l'assemblage de la machinerie pili de type IV (**Brito et al., 2004**).

2.4.3. Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS)

Ce T3SS est important pour la pathogenèse de *C. violaceum* car il endommage les hépatocytes et favorise l'invasion des cellules non phagocytaires.

C'est un complexe multi protéique en forme d'aiguille qui injecte divers effecteurs bactériens dans les cellules hôtes (**Galán et al., 2014**). Les données génomiques ont révélé que *C. violaceum* possède deux T3SS dont les gènes ont été regroupés dans les îlots de pathogénicité de *Chromobacterium* 1 et 2 (Cpi-1 et Cpi-2) (**Vasconcelos et al., 2003 ; Alves de Brito et al., 2004**). Les Cpi-1/1a et Cpi-2 de *C. violaceum* ressemblent aux îlots de pathogénicité de *Salmonella* bien caractérisés Spi-1 et Spi-2 voir (**Figure16**) (**Betts et al., 2004**).

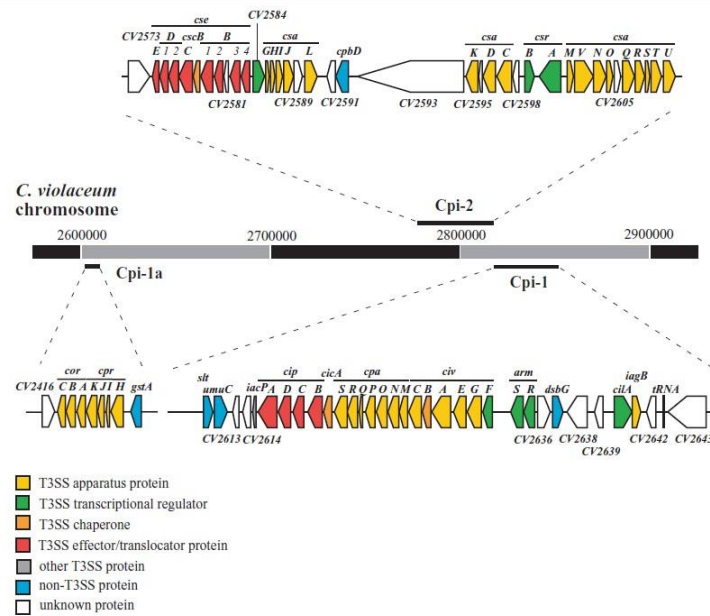


Figure 16. La structure génétique des îlots de pathogénicité de *C. violaceum* Cpi-1, Cpi-1a et Cpi-2 sur le chromosome.

La nomenclature génétique est en accord avec Betts et Brito (Betts *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2004).

2.4.4. Lipopolysaccharides (endotoxine) et à la biosynthèse du peptidoglycane

- **Le LPS** est un glycolipide complexe qui semble être un facteur important impliqué dans la Pathogénèse de l'hôte. Le LPS est l'un des principaux composants des parois cellulaires des bactéries Gram Négatives et il est largement responsable de l'activation des cellules immunitaires de l'hôte et de l'induction de cytokines pro-inflammatoires lors de l'infection par ces bactéries. Le lipide A, également appelé endotoxine, est connu pour stimuler les cellules hôtes à libérer des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, qui sont une composante importante du choc septique observé chez les personnes atteintes d'une infection bactérienne systémique. Parmi les 12 gènes impliqués dans la synthèse de la région cœur du LPS, six sont regroupés dans le génome Cv. Les six gènes impliqués dans la synthèse du lipide A présentent la plus grande similitude avec les gènes des sous-types de *N. meningitidis*, ce qui correspond à la similarité structurelle du lipide A de *Chromobacterium violaceum* et de *N. meningitidis* (Brito *et al.*, 2004).

- **Le Peptidoglycane** est présent dans la paroi cellulaire des bactéries Gram positives et Gram négatives. Comme le LPS, le peptidoglycane est connu pour provoquer la synthèse de cytokines proinflammatoires et se synergiser avec le LPS ainsi, il est considéré comme impliqué dans le choc septique chez les patients subissant une septicémie. Ils ont trouvé 25 gènes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane dans le génome *Chromobacterium violaceum*, dont 11 avaient la plus forte homologie avec les gènes de *N. Meningitidis* (**Brito et al., 2004**).
- **Enzymes** une collagénase (CV_2001), pourrait être impliquée dans la nécrose tissulaire et les effets cytopathiques (**Han et al., 2008**). Les enzymes métaboliques peuvent également jouer un rôle dans la virulence de *C. violaceum*, comme la gamma-glutamyl transférase (CV_1415). Cette enzyme périplasmique a un rôle dans le recyclage de la cystéine et le métabolisme du glutathion, et elle sert de facteur de virulence chez *Helicobacter pylori*, induisant l'apoptose et modulant l'inflammation. La riboflavine synthase telle que CV_2390, a également été décrite comme un facteur de virulence chez *Salmonella enterica*, *Mycobacterium leprae* (**Fischer et Bacher, 2008**) et *H. pylori* (**Crossley et al., 2007**).
- **Toxines** Hémolysine, colistine et autres toxines sont produites par *chromobacterium violaceum*. L'activité hémolytique de Cv a été détectée dans des isolats cliniques et des isolats de sol. Il existe 13 ORF dans le génome Cv qui présentent une homologie avec L'hémolysine ou qui sont liés à la production ou à la sécrétion d'hémolysine. Plusieurs gènes codant pour des membres de la famille de protéines RTX ont été trouvés dans CV, un groupe D'exoprotéines de bactéries à Gram négatif, notamment la cytolysine (hémolysine ou leucotoxine), La métallopeptidase extracellulaire et la lipase. Le génome CV contient plusieurs gènes homologues à des composants du système de sécrétion de l'hémolysine A d'*E.coli* (HlyA). Cela inclut le produit du gène RTX A (CV0311), qui contient des répétitions en tandem composées de caractéristiques nonamères RTX, présentes à l'extrémité amino de la protéine cible de sortie. Il a été découvert que le gène RTX C (CV01917) est apparenté au gène de l'hémolysine A (CV01918), qui code pour un produit impliqué dans l'activation de la cytolysine. Ces gènes ont une homologie élevée avec les protéines correspondantes de *Serratia marcescens*, *Yersinia pestis* et *Proteus mirabilis*, mais ont une faible homologie avec les gènes RTX A et C de *E. coli*. Gènes homologues à RTX B (CV0513) et RTX D

(CV0516), ils sont également présents dans les génomes de *Trichoderma fastidiosa* et *Neisseria meningitidis* (Brito *et al.*, 2004).

2.4.5. Gènes Liés à la Synthèse de la Violacéine

La violacéine est le principal pigment produit par Cv. la majeure partie de son activité peut être liée à ses propriétés cytotoxiques généralisées. Un rôle possible de la violacéine dans la pathogenèse humaine pourrait être lié à son activité cytotoxique, dont il a été démontré qu'elle induit l'apoptose l'association probable entre la violacéine et la pathogénicité du Cv a été contestée par des rapports d'isolement de souches de Cv non pigmentées dans au moins un cas d'infection humaine (Brito *et al.*, 2004).

2.4.6. Les lectines

Les lectines produites par les agents pathogènes sont impliquées dans la reconnaissance des cellules hôtes et l'adhésion ultérieure à la surface cellulaire au cours de l'étape initiale de l'infection, et donc les lectines sont souvent comptées comme facteurs de virulence (Audfray *et al.*, 2013).

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Souche étudiée : *Chromobacterium violaceum*

L'ATCC 12472 de type sauvage de *C. violaceum* a été achetée auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)

1.2. Vérification de la pureté de la souche

La bactérie a été isolée dans la gélose nutritive et incubée à 37°C pendant 48h. Des colonies individuelles des bactéries de forme variée avec de couleur violette ont été ramassées. La souche a été repiquée en stries sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une souche pure. La pureté est vérifiée par l'aspect uniforme des colonies de la souche sur milieu gélosé et par la coloration de Gram.

2. Mise en évidence des lectines

2.1. Fermentation

La souche bactérienne a été cultivée à 28 °C sous agitation vigoureuse pendant 3 jours dans un bouillon nutritif (Defco) et alimentée avec 0,4 % de tréhalose. Le niveau de lectine est augmenté par addition de tréhalose au milieu.

2.2. Extraction des lectines

Les cellules récoltées à partir de l'étape précédente ont été lavées trois fois et rompues à l'aide de vibrations ultrasoniques. La libération des lectines est obtenue par perturbation des cellules à l'aide de vibrations ultrasonores ou d'une presse française Aminco à 20 000 psi. La préparation brute (environ 16 mg de protéines par millilitre) contenant de la lectine (le surnageant) obtenue après centrifugation à 30 000 g pendant 20 min peut être conservée à -20° pour être utilisée ultérieurement pour la purification des lectines.

2.3. Préparation de lectines purifiées

Cette étape est basée sur la préparation des extraits cellulaires bactériens (de type sauvage) et les procédures de purification de lectine CV- IIL. Différentes stratégies de purifications sont utilisées pour obtenir des lectines pures. L'étape de purification initiale est l'extraction des protéines suivie d'un fractionnement salin et dialyse. L'échantillon préparé est soumis à des méthodes chromatographiques, telles que l'affinité pour obtenir des lectines pures, Mais avant ces méthodes de purification et après extraction, un chauffage à 65 °C pendant 15 min et une centrifugation sont nécessaires pour éliminer toutes protéines étrangères thermolabiles.

2.4. Purification des lectines

2.4. 1. La Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines contaminants dans une solution contenant un mélange complexe de protéines. Cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium (SA) dans la solution dont ils veulent précipiter les protéines. Cette quantité est celle nécessaire pour arriver à une concentration équivalente à un certain pourcentage de la quantité de SA suffisante pour saturer cette solution à la température et au pH où ils travaillent. http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/proprecip.html

Dans cette expérience la lectine est précipitée du surnageant à 70% de saturation de sulfate d'ammonium à 4°. Cette saturation a été réalisée en ajoutant 4.32g du sulfate d'ammonium (494g pour 1litre) (**Annexe 4**) Six volumes de solution saturée de sulfate d'ammonium sont ajoutés lentement sous agitation à 4° à 4 fois volumes de surnageant. Après 30 min le précipité est recueilli par centrifugation à 18 000 g pendant 15 min. Le précipité est dissous dans PBS à un cinquième du volume original.

2.4.2. La Chromatographie d'affinité

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire Chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Cette chromatographie contient 3 étapes (**Figure 17**).

- **Etape de Fixation:** Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.
- **Etape de Purification :** En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminants sont éliminées et éluées.
- **Etape D'éluition :** La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluât <https://www.studocu.com/fr/document/universite-de-la-reunion/biologie-biochimie/chromatographie-daffinite/6077493>

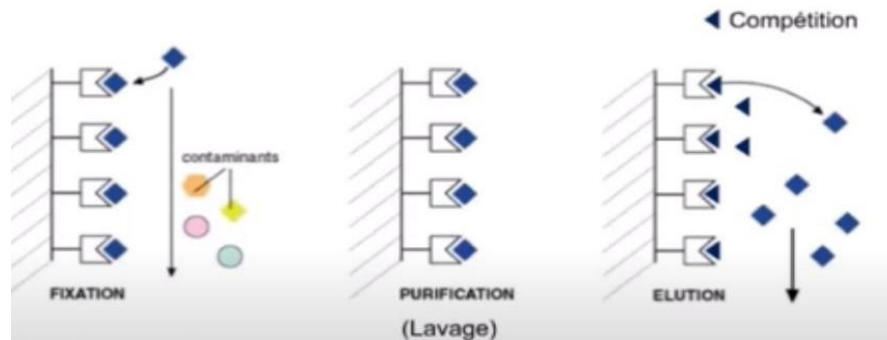


Figure 17. Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

Le précipité de sulfate d'ammonium dissous est purifié par chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B porteur de D-mannose.

Trente millilitres de la préparation de lectine sont chargés sur une colonne (dimensions 4 x 20 cm) contenant le Sepharose modifié. Quatre grammes de ce Sepharose sont mélangés à 400 mg de D-mannose dissous dans 8 ml de NaOH 0,1 N. Le mélange contenant du sucre est mis en rotation mécaniquement à 37° C pendant 24 h, après l'adsorbant d'affinité est collecté par filtration et lavé avec 500 ml de tampon borate 0,1 M (à pH 8) suivi d'un grand volume d'eau distillée. La colonne modifiée adsorbe bien le CV -IIL et Après son adsorption, la colonne est lavée avec du PBS pour l'élimination des protéines non adsorbées. La lectine a été éluée de la colonne avec 0,1 M d'EDTA, puis elle a été dialysée concentré par lyophilisation et maintenu à -20° C. (*Pseudomonas lectins*).

2.4.3. La dialyse

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille. En utilisant des membranes semi-perméables à base de cellulose dont les pores ont une taille inférieure aux macromolécules (**Figure 18**).

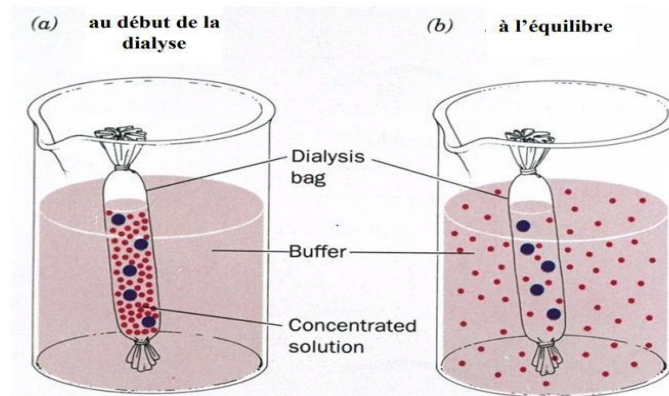


Figure 18. Séparation de petites et de grandes molécules par dialyse

<https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/chartpra/MonDepotPublic/Chartrand/Cours/BC M1521/Biochimie/2-Chromatographie.pdf>

La lectine a été dialysée une nuit contre une solution saline contenant 0,01 M de CaCl_2 , suivie d'une autre dialyse similaire contre du PBS ou de l'eau distillée deux fois (à d'autres fins et pour la concentration des préparations).

2.4.4. SDS-PAGE

En utilisant la chromatographie d'affinité sépharose-mannose avec élution EDTA, un très faible rendement de CV- IIL a été obtenu permettant de réaliser les analyses essentielles. La préparation de lectine purifiée a été analysée par SDS-PAGE avec coloration au bleu brillant de Coomassie.

La présence d'une lectine dans un échantillon est mise en évidence par le test d'activité d'hémagglutination (HA) suivi d'un test d'inhibition de HA avec une solution contenant des glucides ou glycoprotéines.

2.5. Test d'hémagglutination

Le test HA est caractérisé par une liaison entre les sites d'une lectine et les glucides présents à la surface des érythrocytes, formant un réseau. **(Voir la Figure a N° 19).**

L'activité hémagglutinante est généralement mesurée utilisant des érythrocytes humains traités à la papaïne. Le traitement enzymatique (avec la neuraminidase ou des enzymes protéolytiques, comme la papaïne) augmente considérablement l'agglutination des érythrocytes. Une autre amplification significative de l'hémagglutination est obtenue par addition de dextrane ou de bovine albumine sérique (BSA) à l'hémagglutination.

Dans cette expérience ils ont utilisés deux types de l'érythrocyte humain et animal qui sont fournis par le *Magen David Adom National Blood Services* en Israël et le centre animalier de l'Université Bar-Ilan, Israël.

Les érythrocytes humains ont été lavés trois fois avec un tampon phosphate (0,025 M, pH 7,2) isotonique solution de NaCl (PBS) puis traitée par 0,1 % de papaïne avec 0,01 % de cystéine. Le traitement à la papaïne comprend l'incubation de 9 volumes de la suspension cellulaire à 5 % avec 1 volume de papaïne à 1 % p/v (préparation brute, Sigma) dans une solution de cystéine à 0,1 % p/v à 37° pendant 30 min. Les cellules traitées aux enzymes sont lavées trois fois dans du PBS et remises en suspension à 5 % **(Gilboa-Garber, 1982).**

Un échantillon de 50 μl de la préparation de lectine examinée a été dilué en série avec 50 μl de PBS pour produire des dilutions doubles. Du PBS et des suspensions d'érythrocytes (50 μl chacun) ont été ajoutés à chaque tube. L'albumine de sérum bovin peut être incluse dans le PBS de dilution (à une concentration de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lorsqu'une augmentation de l'agglutination est souhaitée. Après incubation pendant

30 min à température ambiante les tubes ont été centrifugés pendant 30 s (1000 g), et l'activité hémagglutinante a été examinée et noté sur une échelle (-) à (+++).

2.6. Test d'inhibition d'hémagglutination

Dans l'inhibition du HA testé, les sites de liaison de la lectine sont occupés par des glucides libres empêchant ainsi la formation du réseau cité ci-dessus.

Une série de glucides sont utilisés dans ce test : fucose, L-Gal, Ara, Fru, Man, Glc, D-Gal mais le fucose et le mannose sont l'objectif dans cette expérience.

Dans le test d'inhibition de l'hémagglutination, chaque solution examinée (glucides à 0,3 M ou EDTA à 0,1 M) a été diluée deux fois en série dans 50 μ l de PBS puis 50 μ l de la solution de lectine (en utilisant la dilution la plus élevée conduisant à l'agglutination de tous les érythrocytes en une grande masse) a été ajouté à chaque tube. Après 30 min à température ambiante, 50 μ l de suspension d'érythrocytes humains de groupe sanguin O traités à la papaïne à 5% ont été ajoutés à chaque tube (**Gilboa-Garber, 1982**) et après 30min supplémentaires, l'hémagglutination a été examinée comme décrit ci-dessus.

L'intensité de l'inhibition de l'hémagglutination était représentée par le plus grand nombre de dilutions (\log_2 dilution⁻¹) auxquelles aucune hémagglutination significative ne s'est produite (**Figure b N 19**).

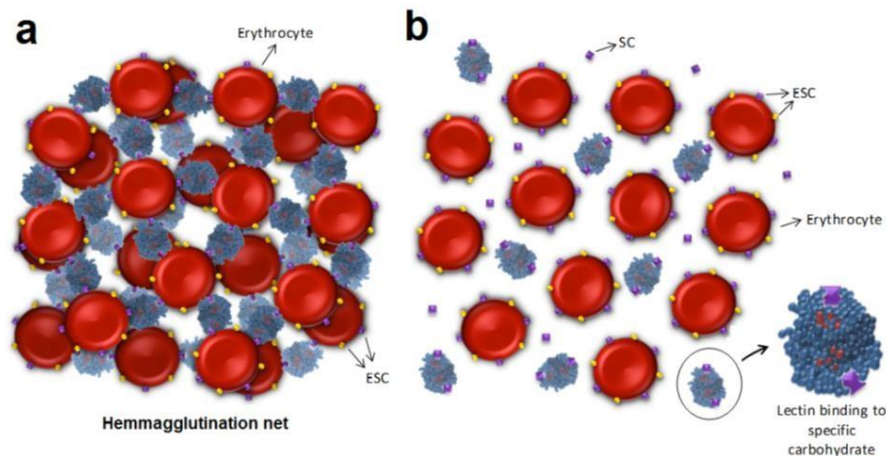


Figure 19. Schéma de l'activité hémagglutinante (HA) et de l'inhibition des dosages HA.

Résultats et Discussions

1. Extraction

Une activité de lectine peut être détectée dans les cellules de *chromobacterium* âgées de 3 jours, elle est répartie dans l'espace péri plasmique et à l'intérieur de celui-ci (**Gilboa-Garber, 1982**) aussi qu'au surface cellulaire mais en très faible quantité avec une faible activité hémagglutinante. Cette activité est plus prononcée avec les extraits intracellulaires.

2. Purification de lectine

| Fraction | Volume (ml) | Protein ^a (mg/ml) | Hemagglutinating titer ^b | Purification (fold) | Yield (%) |
|----------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------|
| Crude extract | 280 | 16.4 | 256 | — | — |
| 70° supernatant | 250 | 4.6 | 256 | 3.56 | 89 |
| Ammonium sulfate precipitate | 60 | 8.9 | 1024 | 7.37 | 85 |
| Mannose-coupled Sepharose eluate | 48 | 0.60 | 1024 | 109.20 | 68 |

Figure 20. Etapes de la purification de la lectine CV-III.

a : Les protéines ont été déterminées selon O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R.J. Randall [J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)], en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme standard.

b : L'activité hémagglutinante a été testée en utilisant des érythrocytes traités à la papaine, comme décrit précédemment.

Les résultats montrent une obtention d'une très faible quantité de protéine purifiée qui est 0.6 mg/ml par rapport à la quantité des protéines qui étaient présentes dans l'extrait brut et cela indique la purification de la CV-III. Malgré cette quantité est faible, elle est suffisante pour faire les tests qui récitent les étapes de purification.

2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ est le sel le plus utilisé, sa solubilisation ne dénature pas les protéines (**Scope, 1994**). Avec une saturation de 70% du SA ils ont précipité 8,9mg/ml des protéines d'extrait brute.

2.2. Dialyse

Seules les molécules dont la taille est inférieure au diamètre des pores de la membrane Capable de diffuser de chaque côté et de s'équilibrer avec le volume total de Solution dans le système, telles que solvants, sels et petits métabolites contrairement aux grosses molécules comme les protéines « lectines » qui ne peuvent pas diffuser. Elles sont Conservées dans le même compartiment membranaire qu'au début de l'expérience.

2.3. SDS-PAGE

Les résultats montrent que la préparation de lectine de CV purifiée donne une seule bande en SDS.

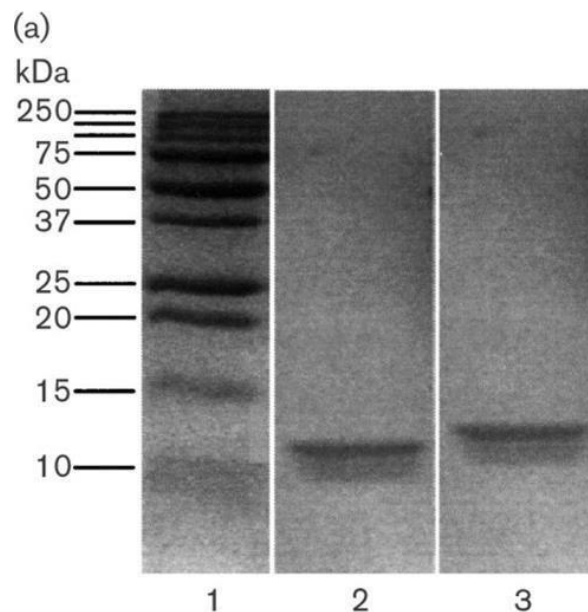


Figure 21. SDS-PAGE de CV-IIL (3) et PA-IIL (2) purifiés, colorés au bleu brillant de Coomassie.

3. Mise en évidence des lectines

Après dialyse un test d'hémagglutination a été réalisé.

3.1. Test d'hémagglutination

Le test d'agglutination est une méthode basée sur l'agglutination cellulaire provoquée par les lectines. Les lectines multivalentes reconnaissent et lient spécifiquement les fragments de sucre présents à la surface des types particuliers des cellules (par exemple les

Érythrocytes), ce qui conduit à la réticulation des cellules et à la formation d'amas cellulaires appelés agglutinats (**Sharon et Lis, 1972**).

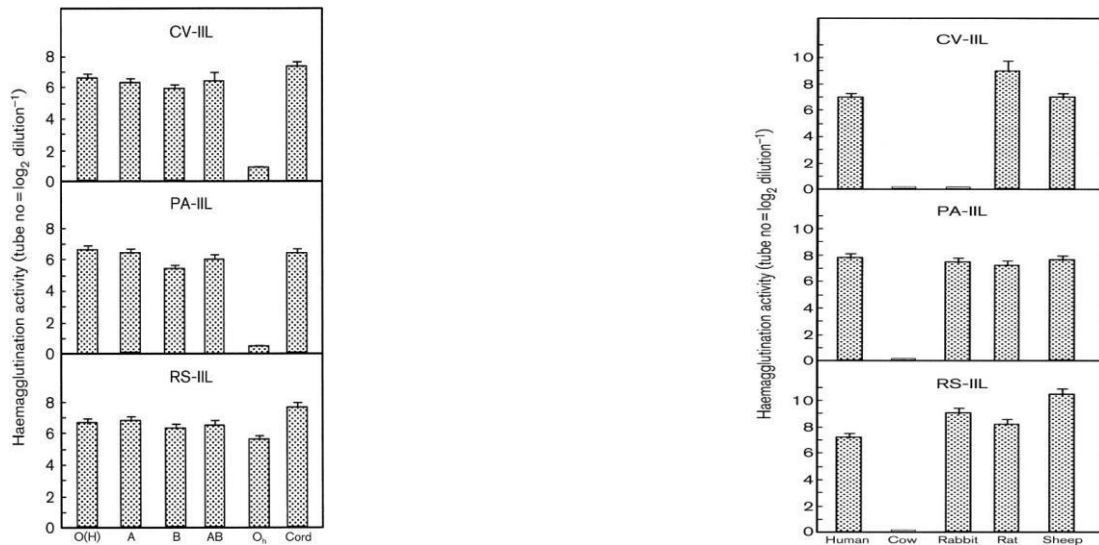


Figure 22. Comparaison des activités hémagglutinantes de CV-IIL, PA-IIL et RS-IIL sur des érythrocytes humains et animal.

L'utilisation des globules rouges humains H-positifs adultes de types O, A, B et AB montre que les lectines agglutinent tous indépendamment de leurs types ABO par opposition à l'O h Type Bombay, Les lectine CV-IIL et PA-IIL n'ont pas réagi du tout avec les érythrocytes de vache tout en réagissant avec les érythrocytes de lapin, de rat et de mouton pour la PA-IIL. Le CV-IIL a agglutiné plus fortement les érythrocytes de rat et n'a pas agglutiné du tous les cellules de lapin.

D'après l'expérience, l'activité était représentée par le nombre de tubes dans lesquels il y avait hémagglutination, le long des dilutions doubles (par exemple 7 tubes positifs = réaction positive jusqu'à la dilution de 1:128, ou activité initiale de 128 unités d'hémagglutination (UH).

L'activité hémagglutinante a été examinée et noté sur une échelle (-) à (+ + + +). L'agglutination apparait doit être confirmée par un témoin négatif et un témoin positif.

La lecture des tubes sans les secouer sur un fond noir, montre l'aspect du surnageant et la présence d'un dépôt. La Confirmation de cette lecture est en remettant en suspension le dépôt et en comparant l'aspect avec les contrôles positifs et négatifs.

Résultat Positif : surnageant plus ou moins clair, avec un culot plus ou moins important. Granulations franches lors de la remise en suspension.

Résultat Négatif : pas de changement d'aspect du surnageant, et aspects caractéristiques en « volutes de fumée », sans agrégats au cours de l'agitation voir (**Figure 23**).

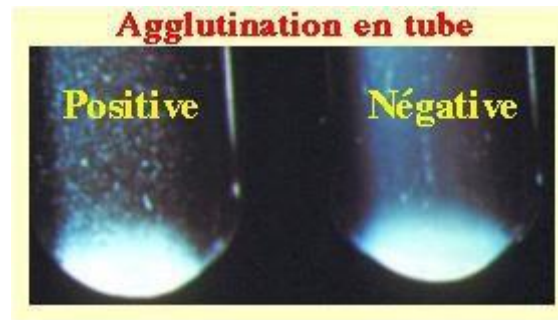


Figure 23. Agglutination en tube.

Pour la confirmation du résultat, un examen microscopique sur une lame de verre est nécessaire. L'aspect des agrégats est spécifique pour les résultats positifs et l'absence de ces derniers dans les résultats négatifs.

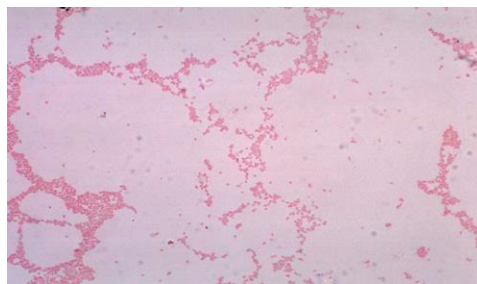


Figure 24. Résultat positif d'agglutination sous microscope.

3.2. Test d'inhibition d'hémagglutination

L'inhibition des activités hémagglutinantes de CV-III purifiée par l'EDTA et une série de monosaccharides (**Figure 25**) a révélé que cette lectine n'interagit pas avec le D -glucose ou le D -galactose et la comparaison de cette inhibition avec PA-III montre qui sont très similaires dans leur sensibilité à l'EDTA et leur ordre de spécificité Fuc>Ara>Fru>Man. Bien que ces lectines se lient aux saccharides avec un arrangement similaire, ils diffèrent dans leurs préférences envers ces saccharides (avec de subtiles différences d'affinité).

Une exception à la similitude d'ordre est l'affinité plus élevée de CV-III pour le L- galactose que pour le L- fucose.

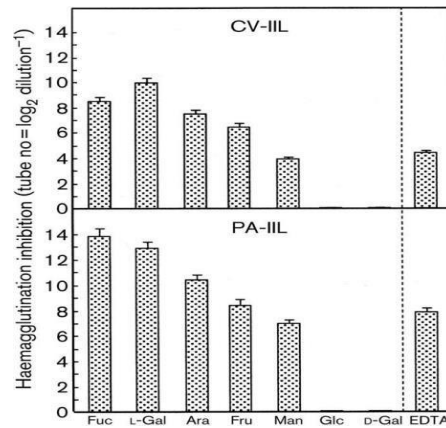


Figure 25. Comparaison de l'inhibition de CV-IIL et PA-IIL par des concentrations décroissantes de divers monosaccharides et d'EDTA.

Discussion Générale

1. Souche et milieu de culture

Chromobacterium violaceum a été choisi comme souche pour sa capacité à produire des lectines solubles qu'ils ont obtenus après le test d'hémagglutination en présence de différents types d'érythrocytes humain et animal. Ainsi, pour mettre en évidence la production de lectines chez cette souche. La bactérie a été cultivée premièrement dans une gélose nutritive milieu favorable à la croissance et à la sporulation, ensuite elle a été cultivé dans un bouillon nutritif alimenté avec 0,4 % de tréhalose à fin d'augmenter le niveau des lectines dans ce milieu. La production des lectines est corrélée à la croissance et l'optimum de production se situe dans la phase exponentielle de croissance. Donc cette production est liée au choix de milieu de culture et y compris sa composition de base. Cette dernière est un facteur qui a été pris en compte par plusieurs auteurs dans la recherche des lectines bactériennes (**Gilboa-Garber, 1983 ; Chiba *et al.*, 2001 ; Podgorski *et al.*, 2014**).

2. Purification de lectine

L'étape de purification initiale est l'extraction des protéines suivie d'un fractionnement salin et d'une dialyse. Les protéines sont toutes précipités par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles sont remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement (**Rosenberg, 1996 ; Shuler et Kargi, 2002**), C'est cette différence de solubilité qui permet de séparer les proteines. Pour cela le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le sel le plus utilisé, sa solubilisation ne dénature pas les protéines (**Scope, 1994**). La dialyse est une technique de séparation basée sur le mouvement des molécules à travers une

Membrane semi-perméable (Boudin) du milieu plus concentré au moins concentré.

L'échantillon préparé est soumis à des méthodes chromatographiques suivie d'une SDS-page. La chromatographie d'affinité sur colonnes Sepharose couplées à différents sucres ou glycoprotéines est décrite par plusieurs auteurs comme la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la purification de ces protéines. La plupart des lectines sont purifiées en une seule étape sur des colonnes d'affinités couplées à différents ligands saccharidiques (**Peumans et Van Damme, 1995**), 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. Dans cette expérience ils ont utilisé le Sepharose 4B car il est fréquemment utilisé pour coupler des ligands d'affinité à la matrice. Il a de large plage de fractionnement qui a été adaptée à la caractérisation ou au nettoyage d'échantillons contenant des composants de poids moléculaires divers. Il offre une sélectivité avec de meilleures caractéristiques d'écoulement. Ce gel réticulé est résistant aux solvants organiques et donc c'est le choix pour la séparation dans ces derniers (solvant organique). L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. La SDS-PAGE permet la séparation des particules en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille <https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/?article605>

Le bleu de Coomassie est un colorant bleu communément employé pour colorer les protéines. Une fois lié aux protéines, il permet de les doser en solution par colorimétrie (méthode de Bradford) ou de les visualiser en gel d'électrophorèse type SDS-PAGE https://fr.wikipedia.org/wiki/Bleu_de_Coomassie

3. Mise en évidence des lectines

La présence d'une lectine dans un échantillon est mise en évidence par un test d'HA suivi d'un test d'IHA avec une solution contenant des glucides ou glycoprotéines.

3.1. Test d'héماغلутination

Le test d'agglutination est une méthode basée sur l'agglutination cellulaire provoquée par les lectines. Les lectines multivalentes reconnaissent et lient spécifiquement les fragments de sucre présents à la surface des types particuliers des cellules (par exemple les érythrocytes), ce qui conduit à la réticulation des cellules et à la formation d'amas cellulaires appelés agglutinats (**Sharon et Lis, 1972**). La réaction entre les lectines et érythrocytes

Est similaire à celle d'antigène et d'anticorps. Les extraits intracellulaires purifiés ont été testés pour leur activité hémagglutinante. Les résultats montrent une agglutination des lectines avec tous les globules rouges humains tout indépendamment de leurs types ABO.

La lectine CV-III n'a pas réagi du tout avec les érythrocytes de vache tout en réagissant avec les érythrocytes de mouton et de rat.

Ces résultats sont concordants avec ceux de (Gilboa-Garber *et al.*, 2001) et de (Sudakevitz *et al.*, 2004) qui ont démontré une absence d'activité hémagglutinante avec les érythrocyte de vache et une présence d'activité hémagglutinante spécifique (9UH/mg) avec les érythrocyte de rat pour la CV-III. ils ont expliqué l'absence de l'activité hémagglutinante par l'activation de la chaîne du complément après la fixation d'anticorps de la vache à son antigène membranaire qui induit la lyse des hématies (Boscher et Guerin-Fauble, 1994 ; Michell *et al.*, 1989) tout en constatant que les anticorps chez les vaches sont au laboratoire plus hémolysants qu'agglutinants et donc cela explique l'absence d'agglutination du lectine CV-III ,PA-III et RS-III avec les érythrocytes de vache.

la CV-III a agglutiné plus fortement les érythrocytes de rat tout comme la PA-III et la RS-III qui ont montré des activités agglutinantes avec les hématies du rat et du lapin. Cette spécificité est expliqué par la richesse de la surface des hématies des rongeurs en protéines hautement glycosylées, par rapport aux hématies de type humain.

3.2. Test d'inhibition d'hémagglutination

Le test IHA est couramment utilisé pour étudier la spécificité de liaison au sucre de la lectine. Dans cette méthode, divers sucres sont utilisés pour trouver les saccharides capables d'inhiber le processus d'agglutination cellulaire ce qui signifie qu'ils sont spécifiquement liés par une lectine particulière.

Tous les saccharides sont dilués en série pour déterminer la concentration la plus faible de chaque sucre encore capable d'inhiber l'agglutination. Par conséquent, ce test peut également servir à une détermination semi-quantitative de l'affinité de la lectine (Adamova *et al.*, 2001).

Les résultats ont révélé que cette lectine n'interagit pas avec le D -glucose ou le D – galactose et la comparaison de cette inhibition explique qui sont très similaires dans leur sensibilité à l'EDTA et leur ordre de spécificité Fuc>Ara>Fru>Man. L'affinité à ces sucres s'explique par le fait que la plupart des lectines sont des protéines multivalentes. D'après (Leonidas *et al.*, 1998) les lectines sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides.

La multivalence peut provenir de la répétition de type «tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire.

Bien que les lectines se lient aux saccharides avec un arrangement similaire, ils diffèrent dans leurs préférences envers ces saccharides (avec de subtiles différences d'affinité). La préférence de sucre de chaque lectine est déterminée par trois acides aminés consécutifs qui forment ce qu'on appelle la « boucle de liaison de spécificité ». Le premier acide aminé de cette boucle est crucial pour la spécificité de la lectine. Le motif d'acides aminés 22-24, qui est impliqué dans la spécificité des monosaccharides, est Ser-Ser-Gly dans PA-IIL, et Ser-Ala-Ala dans CV-IIL (**Imberty *et al.*, 2004 ; Sudakevitz *et al.*, 2004**).

L'exception à la similitude d'ordre est l'affinité plus élevée de CV-IIL pour le L-galactose que pour le L-fucose est probablement liée à de petites variations d'acides aminés qui sont associées à une attraction plus forte du site de liaison CV-IIL par le 6ème CH₂OH du l-galactose tandis le PA-IIL est plus fortement attirées par le CH₃ terminal de l-fucose.

La CV-IIL natif (11,86 kDa) est homologue au PA-IIL (11,7KDa) dans sa structure et ses propriétés, y compris la sensibilité au sucre et à l'EDTA et dans la régulation de sa production par sa sélectivité pour les cellules H-positives et son affinité plus forte pour le fucose par rapport au mannose.

Les résultats de cette expérience montrent une grande similitude de CV-IIL avec PA-IIL qu'avec RS-IIL et cela pourrait être lié au spectre d'hôte de *C. violaceum* et de *P. aeruginosa* qui est animal par rapport à celui de *R. solanacearum* qui est végétal.

Conclusion et Perspectives

Les lectines solubles sont par définition toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie, d'origine non immunitaire, se liant spécifiquement à des glucides et ne montrant pas d'activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand..

Dans cette expérience, Ils ont choisi comme souche *Chromobacterium violaceum* pour sa capacité à produire des lectines solubles qu'ils ont obtenus après le test d'hémagglutination en présence de différents types d'érythrocytes humain et animal. La lectine CV-IIL est également similaire à PA-IIL dans ses interactions avec les érythrocytes humains H-positifs quel que soit leur type ABO, et avec les érythrocytes de rat et de mouton, mais pas les érythrocytes de vache.

Après la purification d'extrait, un test d'hémagglutination a révélé la présence d'une agglutination.

Le test d'inhibition d'hémagglutination, montre un effet positif sur plusieurs sucres tels que Fuc, Ara, Fru, Man, l'activité sensible au fucose/mannose et à l'EDTA, ressemblant à celle de PA-IIL, était l'objectif de cette recherche.

La CV-IIL présente des structures tétramériques dont deux ions calcium sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre.

La CV-IIL natif (11,86 kDa) est homologue au PA-IIL (11,7) dans sa structure et ses propriétés, y compris la sensibilité au sucre et à l'EDTA, et dans la régulation de sa production, par sa sélectivité pour les cellules H-positives et son affinité plus forte pour le fucose par rapport au mannose, Cette similitude pourrait être liée à leur spectre d'hôtes commun qui est principalement animal. Cependant, il diffère à la fois du PA- IIL par l'absence d'interaction avec les érythrocytes de lapin et par sa préférence pour le l- galactose > l- fucose

Références Bibliographiques

Les Références bibliographique**A**

Adamova L, Malinovska L, Wimmerova M. Nouvelle méthode de détection sensible pour l'hémagglutination de la lectine par microscopie. *Microsc Res Techniq* . 2014 ; 77 (10) :841-9.

Alves de Brito, CF, Carvalho, CB, Santos, F., Gazzinelli, RT, Oliveira, SC, Azevedo, V., et al. (2004). Génome de *Chromobacterium violaceum* : mécanismes moléculaires associés à la pathogénicité. *Genet. Mol. Rés.* 3, k148-161.

Angeloni S, Ridet JL, Kusy N, Gao H et al. Glycoprofiling avec des microréseaux de glycoconjugués et de lectines. *Glycobiologie*. 2005 ; 15 : 31–41.

Audfray A, Varrot A, Imberty A. Les bactéries adorent nos sucres : Interaction entre les lectines solubles et les glycanes fucosylés humains, structures, thermodynamique et conception de glycocomposés concurrents. *Cr Chim*. 2013; 16 (5) : 482–90.

B

Bala Subramaniyan S, Senthilnathan R, Arunachalam J, Anbazhagan V (2019) Revealing the significance of glycan binding property of butea monosperma seed lectin for enhancing the antibiofilm activity of silver nanoparticles against uropathogenic *Escherichia coli*. *Bioconjug Chem* 31:139–148.

Betts, HJ, Chaudhuri, RR et Pallen, MJ (2004). Une analyse des groupes de gènes de sécrétion de type III chez *Chromobacterium violaceum*. *Tendances Microbiol.* 12, 476-482. Doi : 10.1016/j.tim.2004.09.010

Boscher M.Y., Guerin-Fauble V. (1994) Les groupes sanguins chez les bovins. *Point Vét.*, 25 (157), 841-844.

Boulahrouf, K. (2017). "Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par des souches pures d'actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de *Lactuca sativa*, *Vicia fabae*, *Prunus domestica* et *P inus halepensis*." P. 33

Brito, C., C. B. Carvalho, F. Santos, R. T. Gazzinelli, S. C. Oliveira, V. Azevedo and S. J. G. M. R. Teixeira (2004). "*Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity." 3(1): 148-161.

C

Cho, J., et al., Lectin-tagged fluorescent polymeric nanoparticles for targeting of sialic acid on living cells. 2014. 15(6): p. 2012-2018.

Chiba, H. et al. Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 595–601 (2001).

Cioci, G. (2006). Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

Coelho, L.C.B.B., et al., Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. 2017. 2017.

Creczynski-Pasa, Tânia B. et Regina V. Antônio. "Métabolisme énergétique de *Chromobacterium violaceum*." *Genet. Mol. Rés.* 3 (1) : 162-166. 31 mars 2004.

Crossley RA, Gaskin DJ, Holmes K et al (2007) La biosynthèse de la riboflavine est associée à la réduction ferrique assimilatrice et à l'acquisition du fer par *Campylobacter jejuni* . *Appl Environ Microbiol* 73:7819–7825

D

Dang, K., et al., Application of lectin microarrays for biomarker discovery. 2020. 9(3): p. 285-300.

Dessaux, Y., C. Elmerich and D. J. L. R. d. m. i. Faure (2004). "La violacéine: une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*." 25(9): 659-662.

Dodd, R. B. & Drickamer, K. (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11, 71R79R.

Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263, 9557-9560.

Durán N, Menck CFM. *Chromobacterium violaceum* : arevjeenonFperspectives pharmacologiques et industrielles. *Crit Rev Microbiol*2001; 27:201–22.

E

Eckhardt, A. E., Malone, B. N., and Goldstein, I. J. (1982). *Cancer Res.* 42, 2977-2979.

F

Fischer M, Bacher A (2008) Biosynthèse de la vitamine B2 : structure et mécanisme de la riboflavine synthase. Arch Biochem Biophys 474:252-265

Fodstad, O., and Pihl, A. (1978). Int. J. Cancer 22, 558-563.

Fry, E. E., Lea, S. M., Jackson, T., Newman, J. W., Ellard, F. M., Blakemore, W. E., AbuGhazaleh, R., Samuel, A., King, A. M. & Stuart, D. I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. EMBO J. 18, 543-554.

G

Gabius. H.J, Springer W.R and Barondes S.H. (1985). Receptor for the cellbinding site of discoidinI.Cell.(42),449-456.

Galán, JE, Lara-Tejero, M., Marlovits, TC et Wagner, S. (2014). Systèmes de sécrétion bactérienne de type III : nanomachines spécialisées pour l'administration de protéines dans les cellules cibles. Annu. Rév. Microbiol. 68, 415-438. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155725

Genbacev, O. D. et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. Science 299, 405–8 (2003).

Gilboa-Garber, N., Avichezer, D. & Garber, N. C. (1997). Bacterial lectins: properties, structure, effects, function and applications. In Glycosciences: Status and Perspectives (Gabius, H.-J. & Gabius, S., eds.), pp. 369-398. Chapman & Hall, Weinheim.

Gilboa-Garber, N. (1982). [32] *Pseudomonas aeruginosa* lectins. Methods in enzymology, Elsevier. 83: 378-385.

Gilboa-Garber, Nechama; Sudakevitz, Dvora. Usage of Aplysia lectin interactions with T antigen and poly- N -acetyllactosamine for screening of *E. coli* strains which bear glycoforms cross-reacting with cancer-associated antigens. Immunology and Medical Microbiology, v. 30, p. 235–240, 2001.

Gilboa-Garber, N. The biological functions of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. Biol. Biochem. Clin. Biochem. (1983), 3, 495-502 (1983).

Gills M, Ley JD. Les genres *Chromobacterium* et Janthio-bactérie. Dans : Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, éditeurs. Les Procaryotes. 3e éd., vol. 5. Singapour : Springer ; 2006, p. 738.

Gills M, Logan LA Gills M, Logan LA. Genre IV *Chromobacterium*. Dans : Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, éditeurs. vol. 2. Manuel de systématique de Bergey bactériologie . 2e éd. New York : Springer ; 2005, p. 827. Genre IV *Chromobacterium*. Dans : Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, éditeurs. vol. 2. Manuel de systématique de Bergey bactériologie . 2e éd. New York : Springer ; 2005, p. 827.

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

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

Greenhalgh, C. J., Beckham, S. A. & Newton, S. E. (1999). Galectins from sheep gastrointestinal nematode parasites are highly conserved. Mol. Biochem. Parasitol. 98, 285-289.

H

Haidar, M., Seddiki, N., Gluckman, J. C. & Gattegno, L. (1992). Carbohydrate binding properties of the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. Glycoconjugate J. 9, 315-323.

Han HJ, Taki T, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2008) Potentiel pathogène d'un gène de la collagénase d'*Aeromonas veronii*. Can J Microbiol 54:1-10

Hirabayashi, J., Dutta, S. K. & Kasai, K. (1998). Novel galactose-binding proteins in Annelida. Characterization of 29-kDa tandem repeat-type lectins from the earthworm *Lumbricus terrestris*. J. Biol. Chem. 273, 14450-60.

Houles, C. (2001). Etude structurale et fonctionnelle de lectines végétales mannose spécifiques apparentes à la jacaline. L'institut de Pharmacologie et Biologie Structurale du CNRS-IPBS. Université Paul Sabatier. France. Pp: 11-35

I

Ingram, G. A. & Molyneux, D. H. (1991). Insect lectins: role in parasite-vector interactions. In *Lectin Reviews* (Kilpatrick, D. C., van Driessche, E. & Bøg-Hansen, T. C., eds.), Vol. 1, pp. 103-128. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Itaya, K., Itoh, M., Tanaka, I., and Ishii, S. (1981). *Biomed. Res.* 2, 501-508.

K

Kamoun P. (2003) Oses et Polysaccharides In *Biochimie et Biologie Moléculaire. Médecin-Sciences/Flammaration* : 62

Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 401-413.

Kubo, T., Arai, T., Kawasaki, K. & Natori, S. (2001). Insect lectins and epimorphosis. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 8, 357-364.

Kveton, F., A. Blsakova, P. Kasak and J. J. N. Tkac (2020). "Glycan Nanobiosensors." 10(7): 1406.

L

Lee, Y. C., & Lee, R. T. (1995). Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research*, 28(8), 321–327.

Leffler, H. (2001). Galectins structure and function - a synopsis. In *Mammalian Carbohydrate Recognition Systems* (Crocker, P., ed.), pp. 57-83. Springer, Berlin.

Leonidas, D. D. et al. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37, 13930–13940 (1998).

Lepka D, Wilharm G (2010) Gènes de flagelline de *Yersinia enterocolitica* biotype 1A: terrain de jeu de l'évolution vers de nouvelles fonctions de flagelline. *Microb Res* 2:31-36

Liener, I. (2012). *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*, Elsevier.

Lin, J.-Y., Tserng, K.-Y., Chen, C.-C, Lin, L.-T., and Tung, T.-C. (1970). *Nature* {London} 227, 292-293.

Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674 (1998).

Liu, D. X., P. J. Didier and G. B. J. J. o. m. p. Plauche (2012). "*Chromobacterium violaceum* infections in 13 non-human primates." 41(2): 107-114.

M

Maddox, D. E., Goldstein, I. J., and LoBuglio, A. F. (1982). Cell. Immunol. 71, 202-207.

Maddox, D. E., Shibata, S., and Goldstein, I. J. (1982). Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A. 79, 166-170.

Merouane, F. (2016). Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c, et tests biologiques.

Michell A.R., Bywater R.J., Clarke K.W., Hall L.W., Waterman A.E. (1989). Blood transfusion In: Veterinary fluid therapy. 1st ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications LTD, 149-165

Müller, W. E. G., Blumbach, B., Wagner-Hülsmann, C. & Lessel, U. (1997). Galectins in phylogentetically oldest metazoa, the sponges. Trends Glycosci. Glycotechnol. 9, 123130.

N

Nascimento, K.S., et al., An overview of lectins purification strategies. 2012. 25(11): p. 527-541.

O

Ofek, I. & Doyle, R. J. (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. pp. 578. Chapman and Hall, London.

P

Pemberton J. M , Vincent K. M , Penfold R. J . 1991 ; Clonage et expression hétérologue du groupe de gènes de biosynthèse de la violacéine de *Chromobacterium violaceum* . Curr Microbiol 22: 355- 358

Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. 109, 347–352

Podgorsky, V., Kovalenko, E., Karpova, I., Sashchuk, E. & Getman, E. New Extracellul

Pontet M. (1996). Structure et activité biologique d'une nouvelle famille de lectines aniprix

R

Rabinovich, G. A., Rubinstein, N. & Fainboim, L. (2002). Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J. Leukoc. Biol.* 71, 741-752.

Rüdiger, H. in *Lectins and Glycobiology* 31–46 (Springer Berlin Heidelberg, 1993).
doi:10.1007/978-3-642-77944-2_4

S

Santos, A.F.S., Silva, M.C.D., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. (2014). "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications". *Current Topics in Peptide & Protein Research*, Vol. 15, 2014.

Shao P. L , Hsueh P. R , Chang Y. C , Lu C. Y , Lee P. Y , Lee C. Y , Huang L. M . 2002 ;
Infection à *Chromobacterium violaceum* chez l'enfant : un cas de septicémie mortelle avec abcès nasopharyngé et revue de la littérature. *Pediatr Infect Dis J* 21: 707 : 709

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

Sharon, N. and H. Lis (2003). *Lectins*, Springer Science & Business Media.

Sharon, N. (2009). "lectines". Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000708.pub2.

Sharon N, Lis H. Lectines—Protéines agglutinantes cellulaires et spécifiques au sucre . *Sciences*. 1972; 177 (4053):949-&. 10.1126/science.177.4053.949 PubMed PMID : WOS : A1972N431600008.

Sharon, N. & Lis, H. (1997). Microbial lectins and their glycoprotein receptors. In *Glycoproteins II* (Montreuil, J., Vliegenthart, J. F. G. & Schachter, H., eds.), pp. 475-506. Elsevier, Amsterdam.

Shoham, J., Inbar, M., and Sachs, L. (1970). *Nature (London)* 227, 1244-1246.

Sneath PH. Caractéristiques culturelles et biochimiques du genre *Chromobacterium* . *J Gen Microbiol.* 1956 ; 15 :70-8.

Souley Moustapha F S. 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G. Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.

Sudakevitz D , Kostlanova N , Blatman-Jan G , Mitchell E. P , Lerrer B , Wimmerova M , Katcoff D. J , Imberty A , Gilboa-Garber N . 2004 ; Une nouvelle lectine RS-IIL de liaison au mannose de haute affinité de *Ralstonia solanacearum* ressemblant structurellement à la lectine PA-IIL spécifique du fucose de *Pseudomonas aeruginosa* . Mol Microbiol 52: 691- 700

Swanson, M. D., H. C. Winter, I. J. Goldstein and D. M. J. J. o. B. C. Markovitz (2010). "A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication." 285(12): 8646-8655.

Syed P., Gidwani K., Kekki H., Leivo J., Pettersson K., Lamminmaki U., Proteomics. 2016, 16 , 1257-1265.

T

Töpfer-Petersen, E. et al. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. Andrologia 30, 217–24

Tung, T. C, Hsu, C. T., and Lin, J. Y. (1971). J. Formosan Med. Assoc. 70, 569-578.

U

Uchiyama N, Kuno A, Koseki-Kuno S, Ebe Y et al. Développement d'un microréseau de lectine basé sur un principe de fluorescence à champ évanescent. Méthodes Enzymol. 2006; 415 : 341–351.

V

Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology 3, 97–130 (1993).

Vasconcelos, ATR, Almeida, DF, Hungria, M., Guimarães, CT, Antônio, RV, Almeida, FC, et al. (2003). La séquence complète du génome de *Chromobacterium violaceum* révèle une adaptabilité bactérienne remarquable et exploitable. Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis 100, 11660–11665. doi: 10.1073/pnas.1832124100

Vasta, G. R., Ahmed, H., Amzel, L. M. & Bianchet, M. A. (1997). Galectins from amphibian species: carbohydrate specificity, molecular structure and evolution. Trends Glycosci.

Vasta, G. R. (1992). Invertebrate lectins: distribution, synthesis, molecular biology and function. In Glycoconjugates(Allen, H. J. &Kisailus, E. C., eds.), pp. 593-634. Marcel Dekker, New York.

Vedala, H., et al., Nanoelectronic detection of lectin-carbohydrate interactions using carbon nanotubes. 2011. 11(1): p. 170-175.

Z

Zitouni, A. (2015). Extraction, purification, caractérisation et effet immuno-modulateur Des lectines fongiques de *Terfèzia boudiéri* (Truffe Blanche du Sahara).

Annexes

ANNEXE 1

Milieux de culture

Gélose nutritive

| | |
|-------------------------|----------|
| Extrait de viande..... | 1,0 g/L |
| Extrait de levure..... | 2,5 g/L |
| Peptone..... | 5,0 g/L |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g/L |
| Agar-agar..... | 15,0 g/L |

pH = 7,0

Bouillon nutritif Difco « extrait de levure »

| | |
|-------------------------|--------|
| Tryptone..... | 16 g/L |
| Extrait de viande..... | 5 g/L |
| Extrait de levure..... | 10 g/l |
| Chlorure de sodium..... | 5g/L |

pH =7,2

ANNEXE 2

Tampons

Tampon PBS 0.025M, ph 7,2

Pour 1000 ml d'eau distillée : 25 mM (NaCl) ; 2.7 mM (KCl) ; 10 mM (Na₂HPO₄) ; 1.76 mM (KH₂PO₄).

Tampon Borate

Borate de sodium..... 10 mM

Na Cl 150 mM

PH= 8

ANNEXE 3

Suspension

Suspension d'hématies à 5%

Erythrocytes humains (séparés du sang hépariné ou citraté) sont lavés trois fois avec une solution de Na Cl à 0.9% p/v (solution saline) et mis en suspension à une concentration de 5% v/v en phosphate (0.25 M à pH 7.4), solution saline tamponnée (PBS). Le traitement à la papaine comprend l'incubation de 9 volumes de la suspension cellulaire à 5 % avec 1 volume de papaine à 1 % p/v (préparation brute, Sigma) dans une solution de cystéine à 0,1 % p/v à 37° pendant 30 min. Les cellules traitées aux enzymes sont lavées trois fois dans du PBS et remises en suspension à 5 %

ANNEXE 4

Tableau très simplifié de saturation du sulfate d'ammonium (4°C, pH 7)

| Concentration initiale de sulfate d'ammonium (% de la saturation à 4°C et pH 7.0) | Concentration finale de sulfate d'ammonium (% de la saturation à 4°C et pH 7.0) | | | | |
|--|--|------|------|------|------|
| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
| | g de sulfate d'ammonium à ajouter par 100 mL de solution | | | | |
| 0% | 0 | 13.6 | 29.5 | 48.3 | 70.7 |
| 25% | | 0 | 14.8 | 32.1 | 52.9 |
| 50% | | | 0 | 16.1 | 35.3 |
| 75% | | | | 0 | 17.6 |
| 100% | | | | | 0 |

Les valeurs sont données en termes de % de saturation, c'est-à-dire en proportion de la quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour saturer complètement une solution d'eau à pH 7.0 à 4°C (3.90 mol/L). Ce tableau est évidemment très simplifié pour des fins explicatives, les vrais tableaux donnent des valeurs à tous les 5% de saturation.

Extraction, Caractérisation et Purification des Lectines Produit par *Chromobactérium Violaceum*

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

Résumé

Ce travail décrit la production et les propriétés du CV-IIL (lectine de *Chromobacterium violaceum*) natif, qui est comme la PA-IIL (lectine de *Pseudomonas aeruginosa*) Peut également être un métabolite secondaire entraîné par la détection du quorum sensing, apparaissant en même temps que la violacéine. La souche ATCC 12472 de type sauvage de *Chromobacterium violaceum* a été utilisée afin de mettre en évidence la production des lectines, de les caractériser et de les purifier. La lectine CV-IIL a été purifiée selon différentes étapes. Le pouvoir agglutinant des extraits est mis en évidence en présence de deux types d'érythrocytes humain et animal. Les lectines obtenues après extraction ont subi une pré-purification par sulfate d'ammonium à 70 % et filtration sur gel sépharose 4B couplé au mannose. La précipitation différentielle a montré une activité hémagglutinante de 228,57UM/mg. L'activité spécifique de l'extrait brut était de 256 UH/mg et 1024 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 1024 UH/mg aussi après filtration sur gel sépharose 4B couplé au mannose. La CV-IIL reconnaît le mannose mais affiche une affinité beaucoup plus élevée pour le fucose ce qui est similaire au spectre de préférence de PA-IIL. La taille des sous-unités de CV-IIL (environ 11,86 kDa) est similaire à celles de PA-IIL (11,73 kDa), CV-IIL agglutine préférentiellement les érythrocytes humains α 1-2 H-fucosylé positive (quel que soit leur type A, B ou O) mais en diffère par n'ayant aucune interaction avec les érythrocytes de lapin et présentant une affinité plus forte pour le l-galactose que pour le l-fucose. La plus grande similitude de CV-IIL avec PA-IIL pourrait être liée à l'adaptation sélective de *Chromobactérium violaceum* et de *P. aeruginosa* au tissu animal.

Mot clés : *Chromobactérium violaceum*, lectine, purification, extraction, glycoprotéine, agglutination, chromatographie

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : ABDELAZIZ Wided (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : BOULAHROUF Khaled (MCB- UFM Constantine).

Examinatrice : MEZIANI Meriem (MCB- UFM Constantine).

Présentée par :

kassah laib Zeyneb

Labed Maroua

Laloui Bouchra

Date de Soutenance Le 21/09/2021