



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية العلوم الطبيعية 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 :

**Mise en évidence des lectines produites  
par *Acinetobacter baumannii***

Le:23/09/2021

Présenté par : - Abderzak Sara  
-Betchim Nouha

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : ABDLAZIZ Wided (MC.B - UFM Constantine 1).

Rapporteur : BOULAHROUF Khaled (MC.B- UFM Constantine 1).

Examinatrice : MAZIANI Meriem (MC.B.- UFM Constantine 1).

*Année universitaire  
2020- 2021*

# *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout-puissant et le miséricordieux de nous avoir guidé à chaque fois que nous nous sommes sentis perdus, et de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien cet humble travail.*

*Nos plus sincères remerciements vont à notre encadreur*

*Monsieur **BOULAHROF Khaled** pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience, sa persévérance et surtout ses judicieux conseils tout en nous accordant sa confiance et une large indépendance dans l'exécution de ce modeste mémoire. Veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre profond respect à Madame **ABDLAZIZ Wided** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations, un grand merci pour tout ce que nous avons appris grâce à vous au cours de nos années de graduation.*

*Nous remercions vivement à Madame **MAZIANI Meriem** d'avoir eu l'amabilité de bien avoir examiner ce travail.*

*Nous exprimons nos sincères reconnaissances à tous les enseignants de la microbiologie pour leurs efforts fournis tout au long de notre cursus.*

# Dédicaces

*C'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie ce mémoire à  
Le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite qui m'a toujours  
comblé par son amour, qui m'a consenti et m'a soutenue dans les moments les plus difficiles  
de ma vie, à ma très chère **maman**.*

*À celui qui m'a servi de conseiller, a un homme que j'admire de plus en plus en découvrant à  
travers l'âge et le savoir son ultime sacrifice physique et matériel, à **mon père** ; l'école de mon  
enfance. Merci pour les valeurs noble, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Qu'ils trouvent ici le fruit de leur labeur et le témoignage de mon grand amour.*

*Que dieu vous procure longue vie et bonne santé.*

*À mon frère **Samy** qui a été là pour moi tout au long de ce processus et m'a apporté beaucoup  
de soutien.*

*À mes frères **Mehdi et Mounir** pour leur amour et leurs encouragements.*

*À mes cousines **Sophie, Sabrina, Asma, Ines** qui ont toujours était a mes cotée et cru en moi*

*À mon binôme **Nouha**, avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler, nous avons  
formé une belle équipe. On a vécu cette aventure ensemble. On est devenu plus patient et on  
a appris que tout est possible quand on a la bonne volonté.*

*À mon meilleure ami **Yahia** qui depuis des années m'encourage, me comprend et a toujours  
été à mes côtés, que dieu lui donne du bonheur, santé et réussite.*

*Mes pensées vont aussi à tous mes amis à savoir **Dalia, Kouki, Roumaissa, Sabi, Ines,  
Zeyneb, Asma** qui m'ont toujours motivé et encouragé. Nos fous rires et les bons moments  
passés ensemble vont me manquer. Je n'oublierais jamais ces instants magiques. Ils seront  
gravés à jamais dans mon esprit.*

*À toute personne m'ayant soutenu et que j'aurais pu oublier de citer mais ceci ne change rien  
à la considération que j'ai et que j'aurais toujours pour chacun de vous.*

*Enfin, je prie Allah d'accepter cet effort et de le rendre réellement bénéfique à tous ceux qui  
le lisent.*

SARA

# Dédicaces

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

*A mon père : **ABDENACER***

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

*A ma mère*

*Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit.*

*A mes très chers : Ma sœur **Dounia** et Mon frère **Amine***

*Un énorme merci à vous pour votre soutien*

*Et ses enfants : **Iyed, Anes et Ayla***

*la source de mon bonheur que dieux vous garde*

*Un merci particulier à mon amie, mon binôme **Sara** qui  
sans elle ce travail n'aurait pas été aussi réussi, avec sa détermination mais aussi ses colères,  
aussitôt suivi de sonsourire et de sa bonne humeur.*

*A mes chères amies : **Ryma, Ariba, Noussa, Ikram et Wafa.***

*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.*

**NOUHA**

## Liste des abréviations

<b>BHAL:</b>	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
<b>BSA :</b>	<i>Bovine sérum albumin</i>
<b>CFA :</b>	<i>Facteurs de colonisation antigens</i>
<b>CRD:</b>	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's modified egale medium</i>
<b>ELLA:</b>	<i>Enzyme Linked Lectin Assay</i>
<b>Fuc:</b>	Fucose
<b>Gal:</b>	Galactose
<b>GalNAc :</b>	N-acétylgalactosamine
<b>LPS:</b>	Lipopolysaccharide
<b>Man:</b>	Mannose
<b>MTT:</b>	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2h-tetrazoliumbromide
<b>PBS:</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PLA:</b>	Phospholipase A
<b>PLC:</b>	Phospholipase C
<b>PLD :</b>	Phospholipase D
<b>SDS-PAGE :</b>	Sulfate de sodium-polyacrylamide
<b>T2SS :</b>	Système de sécrétion de type II
<b>T6SS :</b>	Système de sécrétion de type VI
<b>UH :</b>	Unité hémagglutinante
<b>VME :</b>	Vésicules de la membrane externe
<b>VIH :</b>	<i>Humanimmunodeficiency virus</i>
<b>WGA :</b>	Agglutinine de germe de blé

## Liste des figures

**Figure 01** : représentation graphique d'un monomère de concanavale A de *canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannosoïde

**Figure 02** : représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique

**Figure 03** : représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia*

**Figure 04** : images microscopique d'*Acinetobacter baumannii*

**Figure 05** : test d'hémagglutination des isolats

**Figure 06** : électrophorèse sur gel pour le gène lec (résultats positifs avec un amplicon de 625bp).

**Figure 07** : test d'hémagglutination en plaque de microtitration par les isolats étudiés

**Figure 08** : SDS-PAGE de la lectine purifiée à partir de AB119

**Figure 09** : Valeur m/z de la lectine AB119 par HPLC

**Figure 10** : mise en évidence la production des biofilm par des isolats bactériennes

**Figure 11** : l'échelle d'inhibition des biofilms par la lectine purifiée pour les isolats bactériens

**Figure 12** : mise en évidence l'activité antimicrobienne de la lectine

**Figure 13** : résultat de test MTT montre Les effets antiprolifératifs de la lectine contre les cellules HeLa

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : historique de découverte des lectines

**Tableau 02** : les lectines dans différents tissus végétaux et leurs activités biologiques distinctes

**Tableau 03** : taxonomie d'*Acinetobacter baumannii*

**Tableau 04** : détails de l'amorce de la lectine

**Tableau 05** : antibiogrammes avec lectine comme complément

## Résumé

Les lectines sont une classe particulière de protéines largement distribuées dans la nature, qui reconnaissent sélectivement et se lient de manière réversible aux glucides et aux glycoconjugués par l'intermédiaire de 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. Le but de ce travail est d'isoler et de caractériser la lectine de bactéries d'origine végétale et de cribler sa capacité en tant qu'agent antibactérien, antibiofilm et antiprolifératif. Les sources d'origines végétales ont été examinées pour l'isolement d'organismes ayant une activité lectine. Pour trouver une source bactérienne pour la lectine. Sept isolats bactériens ont montré une activité lectine. La souche AB119 de *A. baumannii* s'est avérée produire une hémagglutination abondante et bien qu'elle ait été sélectionnée pour la récolte de la lectine et a été retenues Pour mettre en évidence la production des lectines, de les purifier, de les caractériser et d'étudier leurs activités biologiques. La Précipitation maximale a été obtenue par la méthode du sulfate d'ammonium à une concentration de 80 % et La purification a été réalisée par des chromatographies d'échange d'ions et d'affinité. La lectine a été identifiée à partir d'une nouvelle espèce bactérienne non signalée auparavant et purifiée à partir d'une souche *Acetobacter baumannii* AB119, isolée d'une origine végétale. La lectine est considérée comme le composant le plus virulent de *A. Baumannii* lié à des saccharides particuliers et contribue fondamentalement aux Micro-organismes à se fixer à différentes surfaces. Le Sulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-PAGE) a montré que la masse moléculaire de la lectine était de 30 000 daltons. La lectine montre une activité antibiofilm et inhibitrice de croissance contre les bactéries Gram-positives (*E. Fecalis*) et Gram-négatives (*K. pneumoniae* & *P. aeruginosa*). Cette lectine a montré aussi une bonne efficacité dans l'inhibition de la prolifération quand elle a été testée pour son activité antiproliférative sur des cellules HeLa avec un taux d'alcoolémie de 1,5 % avec une IC50 de 10.0 µM trouvée in vitro.

**Mots clés :** *Acetobacter baumannii*, lectines, glycoconjugués, hémagglutination, purification, Activité antimicrobienne, activité antiproliférative, activité anti-biofilm



## Abstract

Lectins are a particular class of proteins widely distributed in nature, which selectively recognize and reversibly bind to carbohydrates and glycoconjugates via their binding sites. These proteins, which can be detected by hemagglutination assays, interact with various carbohydrates present on the cell surface. The aim of this work is to isolate and characterize lectin from plant-derived bacteria and to screen its capacity as an antibacterial, antibiofilm and antiproliferative agent. Sources of plant origin were examined for isolation of organisms with lectin activity. To find a bacterial source for lectin. Seven bacterial isolates showed lectin activity. The strain AB119 of *A. baumannii* was found to produce abundant hemagglutination and although it was selected for lectin harvesting and was retained To highlight the production of lectins, purify them, characterize them and study their biological activities. The maximum precipitation was obtained by the ammonium sulfate method at a concentration of 80% and the purification was carried out by ion exchange and affinity chromatography. The lectin was identified from a new and previously unreported bacterial species and purified from an *Acientobacter baumannii* AB119 strain, isolated from a plant origin. Lectin is considered the most virulent component of *A. Baumannii* bound to particular saccharides and basically contributes to the Micro-organisms to attach to different surfaces. Sodium sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) showed that the molecular weight of lectin was 30,000 dalton The lectin shows anti-biofilm and growth inhibitory activity against Gram-positive (*E. Fecalis*) and Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae* & *P. aeuroginosa*). This lectin also showed good efficacy in inhibiting proliferation when tested for its antiproliferative activity on HeLa cells with a BAC of 1.5% with an IC50 of 10.0  $\mu$ M found in vitro.

**Keywords** *Acientobacter baumannii* , lectins, glycoconjugates, hemagglutination, purification, antimicrobial activity, antiproliferative activity, anti-biofilm activitys .

## ملخص

الليكتين هي فئة خاصة من البروتينات الموزعة على نطاق واسع في الطبيعة ، والتي تتعرف بشكل انتقائي على الكربوهيدرات و glycoconjugates وترتبط بها بشكل عكسي من خلال مواقع الارتباط الخاصة بها. تتفاعل هذه البروتينات ، التي يمكن الكشف عنها عن طريق اختبارات التراص الدموي ، مع الكربوهيدرات المختلفة الموجودة على سطح الخلايا. الهدف من هذا العمل هو عزل وتوصيف الليكتين من البكتيريا ذات الأصل النباتي وفحص قدرتها كعامل مضاد للجراثيم ومضاد حيوي ومضاد للتكاثر. تم فحص مصادر أصل نباتي لعزل الكائنات الحية ذات نشاط الليكتين. للعثور على مصدر بكتيري للكتين. أظهرت سبع عزلات بكتيرية نشاط الليكتين. تم العثور على سلالة *A. baumannii* AB119 لإنتاج التراص الدموي الغزير وعلى الرغم من اختيارها لحصاد الليكتين والاحتفاظ بها لإثبات إنتاج الليكتين وتنقيتها وتوصيفها ودراسة أنشطتها البيولوجية. تم الحصول على الحد الأقصى من الترسيب بواسطة طريقة كبريتات الأمونيوم بتركيز 80٪ وتم إجراء التنقية عن طريق التبادل الأيوني وكروماتوجرافيا التقارب. تم التعرف على الليكتين من نوع بكتيري جديد لم يتم الإبلاغ عنه سابقًا وتنقيته من سلالة *Acientobacter baumannii* AB119 ، معزولة من أصل نباتي. يعتبر Lectin هو المكون الأكثر ضراوة في *A. Baumannii* المرتبط بسكريات معينة ويساعد بشكل أساسي الكائنات الحية الدقيقة على الارتباط بأسطح مختلفة أظهرت كبريتات بولي أكريلاميد الصوديوم (SDS-PAGE) أن الوزن الجزيئي هو 30000 دالتون للكتين يُظهر Lectin نشاطًا مضادًا للبيوفيلم ونشاطًا مثبطًا للنمو ضد البكتيريا موجبة الجرام (*E. Fecalis*) وسالبة الجرام (*K. pneumoniae & P. aeuroginosa*). أظهر هذا الليكتين أيضًا فعالية جيدة في تثبيط التكاثر عندما تم اختباره لنشاطه المضاد للتكاثر على خلايا هيلا بمستوى كحول في الدم بنسبة 1.5 ٪ مع IC50 من 10.0 ميكرومتر موجود في المختبر. أبلغت الدراسات السابقة عن مسببات الأمراض عن التأثيرات المثبطة للكتين.

الكلمات الرئيسية *Acientobacter baumannii* ، الليكتين ، glycoconjugates ، التراص الدموي ، التنقية ، النشاط المضاد للميكروبات ، النشاط المضاد للتكاثر ، النشاط المضاد للأغشية الحيوية

## Table des matières

Introduction .....	1
1. Les lectines .....	4
1.1. Généralité .....	4
1.2. Historique .....	5
1.3. Structure des lectines .....	7
1.3.1. Lectines simples .....	7
1.3.2. Lectines en mosaïques .....	8
1.3.3. Les assemblages macromoléculaires .....	9
1.3.4. Structure tridimensionnelle .....	9
1.4. Spécificité et affinité .....	10
1.5. Les activités biologiques des lectines .....	11
1.5.1. Interaction lectine-hydrates de carbone .....	11
1.5.2. Agglutination cellulaire .....	11
1.5.3. Activité mitogène .....	12
1.5.4. Lectines contre les micro-organismes .....	12
1.5.5. Activité antiproliférative .....	13
1.5.6. Activité cytotoxique .....	13
1.6. Distribution des lectines dans le monde de vivant .....	13
1.6.1. Les lectines animales .....	14
1.6.2. Les lectines des plantes .....	15
1.6.3. Les lectines des microorganismes .....	17
1.6.3.1. Les lectines bactériennes .....	17
1.6.3.2. Les lectines viral .....	18
1.6.3.3. Les lectines des champignons .....	18
1.7. Intérêt des lectine pour l'homme .....	18
2. Acinetobacter baumannii .....	20
2.1. Morphologie et structure .....	21
2.2. Caractères cultureux .....	22
2.3. Caractère biochimique .....	23
2.4. Facteur de virulence .....	23
2.4.1. Les Porines .....	23
2.4.2. Polysaccharides capsulaires et Lipopolysaccharides (LPS) .....	24
2.4.3. Les Phospholipases .....	24

2.4.4. Les Vésicules de la membrane externe (VME).....	25
2.4.5. Systèmes de sécrétion de protéines .....	26
2.4.6. Les Protéines de liaison à la pénicilline 7/8 (PBP7/8) et b-Lactamase PER-1.....	26
2.4.7. Autres .....	27
Matériel et méthodes .....	30
1. Matériel biologique .....	28
1.1. Echantillons et analyse bactériologique .....	28
1.2. La souche étudiée .....	28
2. Mise en évidence des lectines .....	29
2.1. Détection phénotypique et moléculaire de la lectine.....	29
2.2. Fermentation.....	30
2.3. Extraction des lectines.....	30
2.4. Purification des lectines.....	30
2.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	30
2.4.2. Dialyse.....	30
2.4.3. Chromatographie.....	31
2.4.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions CM-Sepharose.....	31
2.4.3.2. Chromatographie sur gel filtration Sephadex75.....	31
2.4.3.3. Estimation de la teneur en protéines et du poids moléculaire .....	31
3. Les activités biologiques .....	31
3.1. Mise en évidence de l'activité antibiofilm .....	31
3.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	32
3.3. Mise en évidence de l'activité antiproliférative .....	33
Résultat et discussions .....	37
Résultat.....	38
1. Identification bactérienne .....	34
1.1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinine .....	34
2. Purification de la lectine.....	35
2.1. Fermentation.....	35
2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	35
2.3. Chromatographie.....	36
3. mise en évidence des activités bactériennes .....	37
3.1. Activité anti-biofilm de la lectine.....	37

3.2. Activité antimicrobienne .....	39
3.3. Activité antiproliférative .....	40
Discussion.....	44
Conclusion et prescriptives.....	47
Références bibliographiques.....	50

# Introduction

### Introduction

Les lectines sont des protéines qui se lient aux mono- et oligosaccharides de manière spécifique et réversibles, mais sont dépourvues d'activité catalytique (ce ne sont pas des enzymes). et contrairement aux anticorps, ne sont pas le produit d'une réponse immunitaire.

Les lectines contiennent généralement deux ou plusieurs sites de combinaison des hydrates de carbone par molécule, c'est-à-dire qu'elles sont divalentes ou polyvalentes, bien qu'il existe des exceptions. Par conséquent, la liaison d'une lectine aux sucres présents à la surface des cellules, par exemple les érythrocytes, est un facteur important peut provoquer la réticulation des cellules et leur précipitation. Un phénomène appelé agglutination cellulaire. L'érythrocyte agglutinant, ou hémagglutination des lectines est un attribut majeur de ces protéines et sert systématiquement à leur détection et leur caractérisation. (**Sharon *et al.*, 2002**).

C'est d'ailleurs cette activité par laquelle les lectines ont été détectées pour la première fois, au début du siècle, dans des extraits de graines de plantes. Pendant longtemps, ces protéines hémagglutinantes ont été communément appelées "phytohémagglutinines", parce qu'elles étaient car elles se trouvaient presque exclusivement dans les plantes. Un tournant dans la recherche sur les lectines a été marqué en 1936 par les travaux de James B. Sumner sur la lectine du haricot. Sumner sur la lectine du haricot, la concanavaline A, qui reste la protéine la mieux caractérisée de cette famille. Il a rapporté que concanavaline A précipite également les polysaccharides et les glycoprotéines et que les activités d'hémagglutination et de précipitation sont inhibées par le mannose et le glucose (les sucres sont de configuration D, sauf le fucose qui est de configuration L). Avec beaucoup de clairvoyance, Sumner a suggéré que ces activités pourraient être la conséquence d'une réaction de la lectine avec les hydrates de carbone à la surface des érythrocytes. En effet, en testant l'inhibition de l'hémagglutination ou de la précipitation des polysaccharides par un panel de sucres reste le moyen le plus simple d'établir la spécificité des lectines. (**Sharon *et al.*, 2002**).

La fin des années 1980. On peut facilement les obtenir sous forme purifiée, principalement par chromatographie d'affinité sur des sucres immobilisés, une méthode mise au point par Irwin J. Goldstein en 1965, et plus récemment par des techniques d'ADN recombinant.

Les lectines constituent un groupe hétérogène de protéines que l'on peut retrouver des organismes les plus simples, tels que les virus, aux animaux et aux plantes. Au cours de

## Introduction

l'évolution, ces protéines ont conservé une caractéristique commune : la capacité de reconnaître et de se lier de manière réversible à des hydrates de carbone spécifiques sans que leur structure soit modifiée. réversible à des hydrates de carbone spécifiques sans altérer la structure de l'hydrate de carbone. (Cavada *et al.*, 2018).

Ces protéines sont connues pour posséder des propriétés inflammatoires, nociceptives, vasoactives, antiprolifératives, antimicrobiennes, immunomodulatrices et antidépressives, entre autres. La plupart de ces activités biologiques sont directement liées à la capacité de ces protéines à interagir avec les hydrates de carbone via le domaine de reconnaissance des glucides (CRD) . (Marques *et al.*, 2017).

Actuellement, les lectines font l'objet d'une attention particulière en raison de la prise de conscience qu'elles agissent comme des déterminants de la reconnaissance dans divers processus biologiques. Ces processus comprennent la clairance des glycoprotéines du système circulatoire, le contrôle du trafic intracellulaire des glycoprotéines, l'adhésion des agents l'adhésion des agents infectieux aux cellules hôtes, le recrutement des leucocytes à l'intérieur des cellules. Inflammatoires, ainsi que les interactions cellulaires dans le système immunitaire, dans la malignité et les métastases. La base de cette reconnaissance est l'ajustement moléculaire entre des paires de structures complémentaires, dans ce cas le site de combinaison d'une lectine et d'un hydrate de carbone (souvent désigné comme le ligand de la lectine), sur les surfaces de cellules en interaction ou entre celles d'une cellule et d'une molécule en solution. Elle est analogue à celle qui existe entre une enzyme et son substrat (ou inhibiteur) et entre un anticorps et un antigène, et peut être bloqué par des sucres appropriés, non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*. Cette inhibition est à la base des tentatives actuelles de développer de nouvelles

Les bactéries pathogènes se fixent sur les cellules des organes cibles grâce à des lectines, protéines qui se lient aux sucres complexes arborées par les membranes cellulaires. Une fois fixées, elles vont former des colonies, puis des biofilms, à l'origine des infections bactériennes. Et parmi ces bactéries pathogènes *Acinetobacter baumannii* , dont les lectines ont fait l'objet de nombreuses études .

Notre travail sera divisée en Trois sections: la première section est une étude bibliographique comprendre deux chapitres, dont le premier chapitre est consacré à une revue sur les lectines, en particulier une généralité, historique, structure , spécificité et affinité ,



## Introduction

distribution, les activités biologiques et leur application dans différents domaines. Nous avons ensuite dans un deuxième chapitre, nous avons présenté la bactérie *Acinetobacter baumannii* bactérie pathogène sur laquelle nous avons basé sur leur morphologie et structure, caractères culturels et biochimiques et leurs facteurs de virulence.

La seconde section est sur le matériel et les méthodes, c'est un traitement de l'article scientifique « Isolement et caractérisation d'une lectine ayant des activités antibactériennes, anti-film et antiprolifératives à partir d'*Acinetobacter baumannii* d'origine environnementale » (Alyousef *et al.*, 2018) elle contient trois parties, dont la première partie nous avons décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail, la deuxième est sur l'étude biologique qui se manifeste dans plusieurs tests ; détection phénotypique et moléculaire, fermentation, extraction des lectines, Purification Par Chromatographie échangeuse d'ions CM-Sepharose Chromatographie et Chromatographie sur gel filtration Sephadex75 afin de Mettre en évidence de les activités biologiques de cette bactérie (antibiofilm, antibactérienne et antiproliférative).

Concernant la troisième section, elles abordent les résultats et la discussion respectivement.

# Bibliographie

### 1. Les lectines

#### 1.1. Généralités

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire, largement distribué dans la nature, qui reconnaissent et se lient de manière spécifique et réversible aux glucides (mono et oligosaccharide) et aux glycoconjugués, elles sont libres ou liées aux surfaces cellulaires par des sites de liaison spécifiques, généralement deux ou plusieurs sites de combinaison des hydrates de carbone par molécule, c'est-à-dire qu'elles sont divalents ou polyvalents, bien qu'il existe des exceptions (**Santos *et al.*, 2014**). En plus de leur spécificités élevée, les lectines présentent différents architectures et modes de multivalence attaché à leur fonctions. Certaines lectines présentent une "multivalence architecturale", consistant en une structure macromoléculaire avec plusieurs domaines de reconnaissance des glucides équivalents. D'autres lectines, comme les adhésines, sont attachées aux membranes et ne comprennent qu'un seul domaine de reconnaissance des glucides, attachées à des fimbriae ou des flagelles fixés à la surface de la cellule. Divers structures fimbriales regroupées à la surface de la cellule permettent également une présentation multivalente des lectines dans l'environnement extracellulaire. Tous ces processus de reconnaissance jouent un rôle primordial dans la fécondation, l'embryogenèse, l'inflammation, les métastases et la reconnaissance parasite-symbiote chez les microbes, les invertébrés, les plantes et les vertébrés. La liaison entre une lectine et son polysaccharide spécifique est comparable à une réaction anticorps-antigène. L'agglutination des hématies est le test principal permettant de détecter ces molécules (**Hirabayashi, 2020**). Elles ont une masse moléculaire comprise entre 50 et 120Kda (**Kokourek et Horejsi, 1981**).

La capacité d'agglutination des cellules distingue ces protéines des autres macromolécules capables de se lier aux glucides. En outre, leur origine non immunitaire les différencie des immunoglobulines anti-glucides qui agglutinent les cellules. Alors que les anticorps sont structurellement similaires, les lectines diffèrent par leurs acides aminés, Peptides et protéines, composition, implication des métaux, structure tridimensionnelle et poids moléculaire (**Lis et Sharon, 1989**).

### 1.2. Historique

Un aperçu de l'histoire des lectines est intéressant car il donne un aperçu du développement d'un domaine de recherche qui a de larges implications et qui est de plus en plus important. Il sert également d'introduction appropriée à la discussion de certaines propriétés exceptionnelles de ces protéines. Comme l'histoire de nombreux domaines de recherche, celle-ci est également riche en exemples de hasard et de sérendipité.

Les lectines ont d'abord été désignées sous le nom d'"hémagglutinines", ou plus communément de "phytohémagglutinines" (**Aragao, 2009 ; Poiroux, 2011**), car elles se trouvent presque exclusivement dans les plantes. Le site premier rapport sur la présence dans les plantes de protéines qui agglutinent les érythrocytes humains ou animaux est apparu en 1888 dans la thèse de doctorat de Hermann Stillmark, étudiant de Robert Kober à l'université de Dorpat, en Estonie (aujourd'hui Tartu en URSS), l'une des plus anciennes universités de la Russie tsariste.

En 1919, J. B. Summer a réalisé la purification et la caractérisation de la concanavaleine A ou Con A (*Concavaliaensiformis*), cette phytoagglutinine pouvait également précipiter le glycogène en solution et agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (par exemple comme les levures et les bactéries) (**Liener et al., 1986**).

Aujourd'hui sont appelées lectines toutes protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître et de se fixer spécifiquement sur des structures oligosaccharidiques de manière non covalente, réversible et sans les modifier (**Sharon and Lis, 2004**).

## Bibliographie

**Le Tableau 1** : l'historique de découverte des lectines. (Ramata, 2010)

Année	Auteurs	Découverts
1884	Warden et addel/Bruyllant et Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i>
1888	Stillmark	Activité hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton triglium</i>
1890	Erllich	Utilisation de l'abrine et le ricin dans les recherches immunologiques
1891	Hellin	Activité hémagglutinante de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1902	Kauss	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par le sérum non immunitaire
1909	Landsteiner	L'inhibition de l'activité hémagglutinante par un traitement thermique de sérum
1919	Sumner	Isolement et cristallisation de la Concanavaleine A (Con A)
1926	Marcusson-Begun/Siever	Application des lectines sur les groupes sanguins

## Bibliographie

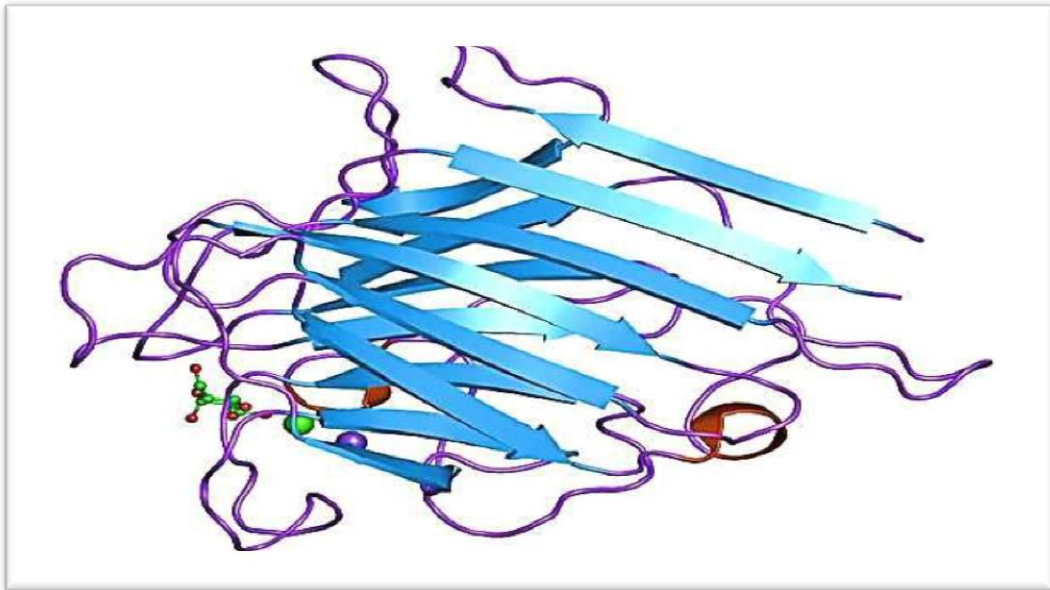
<b>1949</b>	Jaffé	Inactivation Thermique des hémagglutinines de <i>Phaseolusvulgaris</i>
<b>1952</b>	Watkins &Morgan	L'inhibition de lectines par les sucres simples Démonstration avec l'aide de lectines que les sucres sont des déterminants de groupe sanguin
<b>1960</b>	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolusvulgaris</i>
<b>1965</b>	Agrawal &Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
<b>1990</b>	Yamauchi&Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>Escherichia coli</i>

### 1.3. Structure des lectines

Les lectines sont classés en quatre grandes catégories.

#### 1.3.1. Lectines simples

Ces lectines sont composer de nombreux monomères, ils peuvent être identiques ou non, généralement leur masse moléculaire ne dépasse pas 40KDa. Cette classe regroupe toutes les lectines végétales, bactériennes solubles et galectine (Famille des lectines animales spécifique pour le galactose) (**Lenka, 2006**). (**Figure 1**)

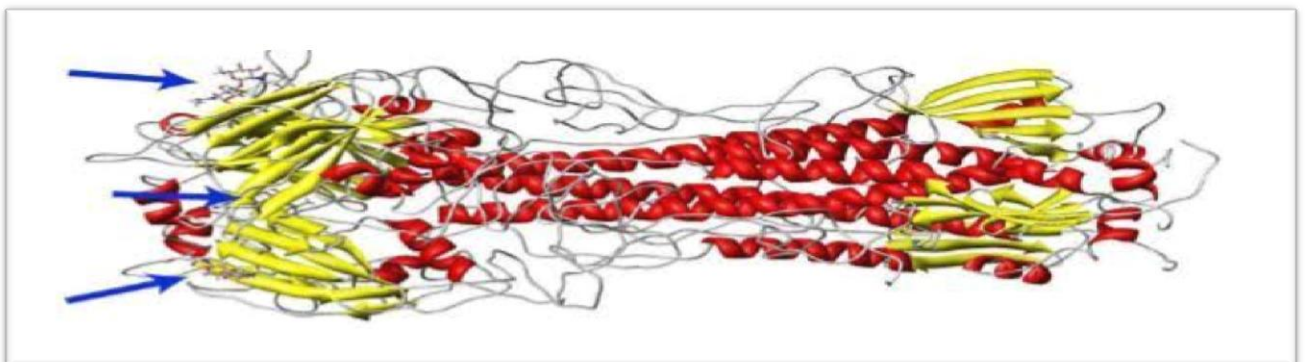


**Figure 01 :** représentation graphique d'un monomère de concanavoline A de *canavaliaensiformis* en complexe avec le trimannosoïde (Lenka, 2006).

La protéine est représenté par un ruban rouge pour les hélices  $\alpha$ , un ruban bleu pour les brins  $\beta$  et un fil pour les autres zones. Le sucre est représenté sous forme de bâton et les cations en boule (Lenka, 2006).

### 1.3.2. Lectines en mosaïques

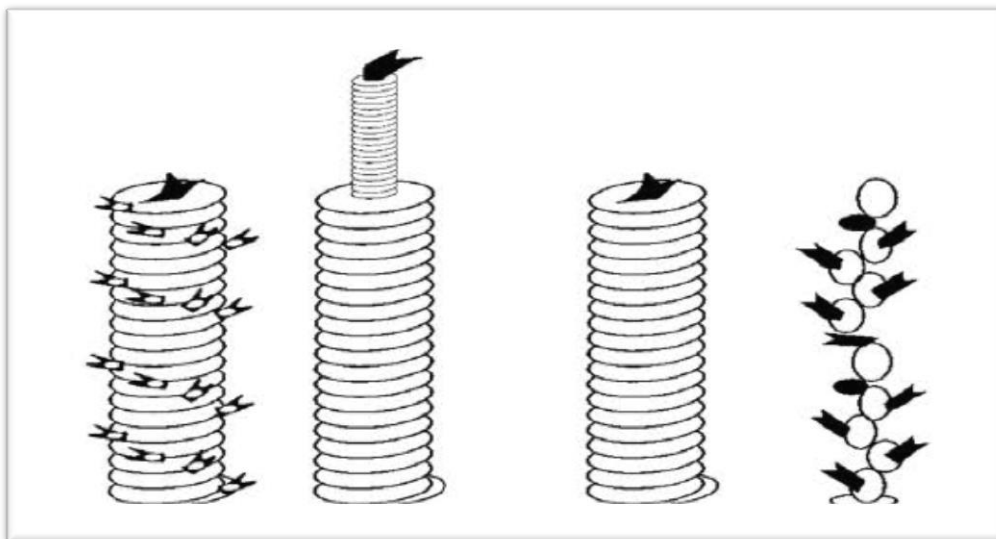
Dans cette classe, on trouve différentes lectines de divers sources (animal, virus...). Il s'agit d'un complexe composé de plusieurs types, dont un seul possède le site de liaison (Lenka *et al.*, 2006). (Figure 02 )



**Figure 02 :** représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine de virus influenza en complexe avec de l'acide sialique (Lenka *et al.*, 2006).

### 1.3.3. Les assemblages macromoléculaires

Trouvé fréquemment chez les bactéries, où elles construisent des structures filamenteuses de 3 à 7 nm de diamètre Jusqu'à 100 Nm de longueur, dites fimbriae ou pili. La plus longue partie d'un filament fimbrial est construit par la polymérisation d'une unité prédominante qui ne joue aucun rôle structural. Seul un type d'unité, généralement une composante minoritaire, possède le site de liaison pour les glucides et donc est responsable de la capacité d'adhésion du fimbriae (Lenka, 2006). ( Figure 3 )



**Figure 03** : représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie d'*Escherichia Coli* (Lenka, 2006).

### 1.3.4. Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle des lectines est composé des feuilles  $\beta$  contactées par un nœud forment des chaines antiparallèles avec des hélices  $\alpha$ , la stabilité des dimères est assurée par des interactions hydrophobiques et hydrogènes (Sharon et Lis, 1990).



### 1.4. Spécificité et affinité

Sharon et Lis à base de lectine en mannose (Man), galactose (Gal) ou N-acétylgalactosamine (GalNAc), fucose (fuc) ou acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (**Lis et Sharon, 1998**). Ces monosaccharides et leurs dérivés sont des unités typiques de la structure oligosaccharidique de la surface cellulaire, et d'autres sont rares. La lectine reconnaît également spécifiquement les oligosaccharides. Comparée à leur affinité pour les oligosaccharides, l'affinité des lectines pour les monosaccharides. (**Dam et Brewer, 2002**).

L'affinité est généralement régulée par la présence de substituant sur le carbone anomérique des monosaccharides, de sorte que ces lectines reconnaissent également les disaccharides ou les trisaccharides. La similitude topologique entre certains monosaccharides est critique pour la spécificité : par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent Gal se lient également à GalNAc. Certaines lectines présentent une affinité pour les monosaccharides, qui ne semblent pas être structurellement apparentés, comme le Fuc, l'homme et le Fru (fructose). Cependant, les trois fonctions hydroxyles sur lesquelles le sucre se lie à la lectine ont des structures topologiques très proches, ces trois ligands sont donc connectés à la lectine A2L de *Pseudomonas aeruginosa*. (**Loris et al., 2003**).

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet de préciser la spécificité des lectines (**Park et al., 2008**). La spécificité des lectines peut être déterminée en utilisant la technologie de test ELLA (enzyme-linked lectin assay) et glycanarray (puces de glycane avec différents monosaccharides et oligosaccharides). ces techniques sont simples, rapides et nécessitent peu de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Ils peuvent se lier à plusieurs molécules glucidiques. La multivalence peut être causée par des répétitions « en tandem » de lectines dans le polypeptide, la combinaison de plusieurs monomères ou la présentation de plusieurs lectines à la surface cellulaire.

D'une part, les lectines multivalentes et d'autres part des glycoconjugués, qui participent au processus de reconnaissance (**Lee et Lee, 1995**). Dans la plupart des cas, les

systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multivalentes plutôt que des interactions fortes uniques. Par conséquent, ils peuvent assurer un degré élevé de spécificité et d'affinité entre ces récepteurs et la surface cellulaire des systèmes biologiques.

### 1.5. Les activités biologiques des lectines

Comme toutes protéines les lectines sont des molécules aux propriétés biologiques multiples

#### 1.5.1. Interaction lectine-hydrates de carbone

Toutes les lectines sont composée d'au moins une cavité de reconnaissance des glycanes, qui présentent une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués qu'avec d'autres composés (**Jain *et al.*, 2001 ; Jeyaprakash *et al.*, 2003**), ces glycanes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine . La partie non glycanique des glycoconjugués à la capacité d'interagir avec les acides aminés à proximité de la cavité de reconnaissance (**Jeyaprakash *et al.*, 2003**).

#### 1.5.2. Agglutination cellulaire

L'agglutination est la manifestation la plus visible de l'interaction d'une lectine avec les cellules, résultant de la création des liaisons transversales entre les cellules en suspension. La liaison d'une lectine aux cellules est indispensable, mais non suffisante pour que l'agglutination se réalise. La raison en est que l'agglutination est simple en apparence mais en réel est un processus compliqué qui est affecté par de nombreux facteurs, tels que les propriétés moléculaires de la lectine (par exemple, la taille moléculaire et le nombre de sites de liaison des saccharides), les propriétés de la surface cellulaire (par exemple, le nombre et l'accessibilité des sites de liaison de la lectine, la fluidité de la membrane) et l'état métabolique des cellules. L'agglutination est aussi affectée par des conditions externes tels que la croissance, le développement ou la transformation maligne (**Sharon *et al.*, 1998**). De plus, il a été découvert que les lectines agglutinaient les cellules malignes plus facilement que leur homologue normal (**Wright, 1980**).

### 1.5.3. Activité mitogène

L'activité mitogène est une propriété commune à de nombreuses lectines, elle se distingue par son pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastique résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (**Brabosa, 2001 ; Falasca, 1989 ; Nachbar et Oppenheim, 1980**).

### 1.5.4. Lectines contre les micro-organismes

Les lectines, en particulier celles qui sont spécifiques au mannose ou au N-acétyl-glucosamine, ont une remarquable activité anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine), comme l'ont montré des essais sur culture cellulaire (**Molchanova et al., 2007**) non seulement en inhibant l'infection des cellules mais aussi en empêchant la propagation de l'infection virale des cellules infectées aux lymphocytes T non infectés (**Balzarini, 2006**). Quelques lectines peuvent également agir en inhibant l'activité de la transcriptase inverse du VIH-1. Plusieurs lectines ont montré une activité contre les bactéries, les protozoaires, les champignons et les nématodes, ce qui prouve que ces protéines peuvent être utiles dans de futurs traitements cliniques.

Les protéines antimicrobiennes suscitent l'intérêt de nombreux chercheurs en raison de leur potentiel en tant qu'outils de lutte contre les infections fongiques et bactériennes dans les pathologies végétales ou humaines. De telles protéines, une fois incorporées dans des plantes transgéniques favorisent la résistance aux pathogènes ; de plus, les lectines peuvent servir de principes actifs d'usage clinique antifongique ou antibactérien. Les protéines ou les peptides antibactériens que l'on retrouve dans différents organismes agissent comme des enzymes ou représentent de nombreux groupes de protéines, comme les lectines de type C présentes dans les crevettes et les coquilles Saint-Jacques et les lectines végétales.

L'évaluation de l'effet des lectines contre les bactéries d'importance médicale suscite un intérêt croissant. Ces lectines sont capables d'interagir et d'inhiber le développement des cellules microbiennes car les lectines reconnaissent les glucides ou les glycoconjugués à la surface des cellules, en fonction de leur spécificité. Les lectines provenant de différentes sources peuvent agir comme agents antibactériens contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, telles que la lectine de l'espèce marine *Holothuriscabra*, la lectine des graines d'*Araucaria angustifolia* et les lectines de type C provenant d'œufs de poule et d'œuf

et d'oïe (toutes deux actives contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*) (**Santos et al., 2014**).

### 1.5.5. Activité antiproliférative

Les lectines présentent une activité antiproliférative dans les cellules cancéreuses humaines, telles que la leucémie, le cancer de la prostate, le cancer du poumon, les cellules d'hépatome (Hep G2) et le cancer du sein (**Santos et al., 2014**).

### 1.5.6. Activité cytotoxique

La lectine de *Bauhinia forficata* provenant des graines présente un effet cytotoxique sélectif et une inhibition de l'adhésion dans les cellules cancéreuses du sein MCF7.

Parmi les lectines commerciales qui ont une action cytotoxique sur les cellules de mammifères : la ricine et l'abrine et à un degré moins intense la concanavaline A, et l'agglutinine de germe de blé (WGA).

L'effet toxique des lectines sur les cellules est généralement sélectif. Elles sont beaucoup plus actives dans les cellules transformées, qui sont plus sensibles aux effets des lectines que les cellules normales on peut citer comme exemple l'apoptose dans les cellules HeLa du cancer du col de l'utérus humain.

Une lectine se liant au mannose provenant de *Sophora flavescens* est un agent antitumoral puissant avec des propriétés cytotoxiques et apoptotiques sur les cellules HeLa (**Santos et al., 2014**).

## 1.6. Distribution des lectines dans le monde de vivant

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se trouvent dans tous les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plants, les insectes et les animaux (**Van Damme et al., 1998**). Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle d'environ 770 lectines (**Aragao, 2009**).

### 1.6.1. Les lectines animales

La présence de lectines chez les animaux invertébrés se produit dans presque tous les phyla dans l'hémolymphe et le liquide coelomique. De nombreuses lectines ont été isolées d'invertébrés, tels que les protozoaires, les insectes, les mollusques, les crustacés, les concombres de mer, les polychètes et les éponges de mer. (Moura *et al.*, 2006)

Chez les vertébrés, les lectines ont été isolées et caractérisées chez des poissons, des serpents et d'autres animaux. Chez l'homme en particulier, il existe de nombreuses lectines bien caractérisées dans différents tissus et cellules, tels que les poumons, le sérum et les dendrites. (Kanazawa *et al.*, 2004)

Chez les vertébrés, il existe deux classes de lectines, en fonction de leur localisation : les lectines intégrales des membranes et les lectines solubles présentes dans les fluides intra et intercellulaires. Les lectines intégrales sont celles qui sont situées dans les membranes en tant que composants structuraux, et diffèrent par leur spécificité aux hydrates de carbone ainsi que par leurs propriétés physiques et chimiques. Les lectines solubles peuvent se déplacer librement dans les environnements intra- et intercellulaires. (Barondes, 2004)

Les lectines animales sont divisées dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont :

- Les lectines de type C, elles sont soit circulantes dans le plasma, ou attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire (Somers *et al.*, 2000), dont l'interaction glucide-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium (Drickamer, 1999).

- La famille des galectines, elle regroupe des lectines solubles qui reconnaissent le  $\beta$ -Gal, et sont caractérisées par la présence d'un domaine bien conservé appelé *S-type carbohydrate recognition domain* (S-CRD) (Leffler *et al.*, 2004).

- Les Siglecs, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique et leur CRD adopte un repliement de type immunoglobuline (Crocker, 2002).

La plupart des lectines des 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 (**Aragao, 2009**).

### 1.6.2. Les lectines des plantes

Les plantes constituent une source riche en lectines et servent de principale source pour l'isolement et l'analyse de ces molécules. Les lectines sont présentes dans divers tissus végétaux et ont des propriétés biologiques différentes (**tableau2**). La principale source de lectines est souvent les graines ; les graines qui escentes de légumineuses sont particulièrement riches en ces protéines. (**Santos et al., 2014**)

Des lectines végétales ont été purifiées à partir d'écorces, du bois de cœur, des feuilles et des fruits. D'autres sources de lectines sont les racines, les tubercules, les bulbes, les rhizomes, les coléoptiles , les cotylédons et l'exsudat du phloème .(**Santos et al., 2014**)

Les lectines végétales ont été classées en sept familles de protéines qui sont liées structurellement et évolution. Ce sont les lectines du phloème des Cucurbitaceae , des lectines se liant à la chitine contenant des domaines de l'hévéine, les lectines des légumineuses, la protéine d'activation des ribosomes type 2 , des lectines se liant au mannose lectines de monocotylédones, lectines liées à la jacaline et la famille des amarantins. (**Santos et al., 2014**).

La famille des légumineuses offre le plus grand nombre d'espèces contenant des lectines végétales, telle que la ConA se retrouvent dans de nombreux tissus mais sont très abondantes dans les parties de la plante susceptibles de subir une attaque par des organismes étrangers (**Nachbar et Oppenheim, 1980**).

**Tableau 2** : Lectines dans différents tissus végétaux avec des activités biologiques distincts (Santos et al., 2014).

<b>Tissus</b>	<b>Activités biologiques</b>
Les graines	Propriétés agrégantes anticoagulantes et antiplaquettaires ; coagulant, activités mitogènes, antibactériennes, antifongiques et anti tumorales
l' écorce	Activités antifongiques et insecticides
Bois de cœur	Activité termiticide
Tige	Activités antivirales et inductrices d'apoptose
Feuilles	Activités antivirales, antibactériennes et antifongiques
Fruits	Activités mitogènes et antivirales
Racines	Activités antifongiques et termiticides
Tubercules	Activités insecticides et antitumorales
Ampoules	Activité protéolytique
Rhizomes	Antiprolifératif, immunostimulant, antiviral, antifongique, activités antitumorales et induisant l'apoptose

### 1.6.3. Les lectines des microorganismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasite eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les glycanes présents sur la surface des cellules hôte.

#### 1.6.3.1. Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol, elles jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules hôtes (**Sharon, 1996**). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles: les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles (**Imberty *et al.*, 2005**).

Les lectines fimbriales sont trouvées dans des organelles de surface des bactéries (pili et flagelles) qui présentent diverses fonctions telles que la reconnaissance des glycanes de l'hôte et l'adhésion sur les surfaces de cellules cibles. Il existe trois types de pili : les types IV, les types I et les types P. Par exemple, la PapG est une adhésine du pili de type P trouvée chez les souches uropathogènes de la bactérie *Escherichia coli*. PapG présente une grande importance dans la phase d'adhésion sur les globoside (GbO4) des cellules humaines du rein lors des infections urinaires et la structure en complexe avec la partie tétra-saccharide du GbO4 a été résolue (**Dodson *et al.*, 2001**). Les lectines de cette famille sur une structure allongée avec un repliement de type b-sandwich.

La famille des toxines est constituée par des protéines secrétées par les bactéries et qui exercent une activité toxique sur les cellules de l'hôte. Les toxines du type AB5 sont secrétées par différentes bactéries comme *Shigella dysenteriae*, *Borderella pertussis* et *Vibrio cholerae*. Le domaine lectine de la toxine sécrétée par le *Vibrio cholerae* est un b-pentamère et sa structure a été résolue complexée avec le penta-saccharide GM1 qui est un ganglioside présent sur les epithelia (**Miyishi *et al.*, 1982**).

La famille de lectines solubles comprend des protéines cytoplasmiques telles que PAII et PA-III de *Pseudomonas aeruginosa* respectivement spécifiques pour le a-D-galactose et le a-L-fucose. Elles présentent des structures tétramériques ou un ou deux ions



calciums respectivement sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre (**Kairies et al., 2001**).

### 1.6.3.2. Les lectines viral

L'exemple le plus marquant de lectine de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, qui est l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique) (**Weiset al., 1990**).

### 1.6.3.3. Les lectines des champignons

L'abondance des lectines dans les champignons est tout à fait remarquable. Elles ont principalement des propriétés pharmacologiques intéressantes, par exemple la stimulation du système immunitaire contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (**She et al., 1998 ; Sze et al., 2004**).

## 1.7. Intérêt des lectine pour l'homme

Les lectines peuvent interagir avec les systèmes biologiques et produire divers événements et fonctions dans l'organisme vivant. Elles présentent aussi plusieurs avantages, particulièrement la disponibilité de divers lectines avec des spécificités spéciales ainsi qu'une vaste stabilité.

De nos jours les lectines sont largement utilisées dans le secteur biomédical et la recherche scientifique ainsi que dans le domaine agronomique (**Lis et Sharon, 1998**).

- **Dans le domaine biomédical**

### **Hématologie**

Certains lectines ont une reconnaissance spécifique d'antigènes des groupes sanguins humains elles possèdent aussi un pouvoir précipitant spécifique pour ces derniers (**Boyd et Shapleigh, 1954**) et sont utilisés pour leur identification dans des banques de sang.

### **Immunologie**

## Bibliographie

De par leur spécificité, on peut utiliser les lectines immobilisées sur colonne afin d'identifier, de purifier et de caractériser les glycoconjugués (**Hirabayashi, 2004**). Il y en a aussi des lectines mitogène qui sont utilisées pour détecter les allergies médicamenteuses, Identifier les immunodéficiences congénitales ou acquises, étudier la sensibilisation causée par les maladies infectieuses et juger de l'impact de plusieurs utilisations d'immunosuppression et d'immunothérapie (**kenoth et al., 2001**).

### Biologie cellulaire

Dans des conditions normales et pathologique, on peut effectuer l'étude de la nature, la structures et la dynamique des membranes cellulaires par les lectines (**kenoth et al., 2001**).

La lectine des graines de *Lonchocarpus sericeus* inhibe la réponse inflammatoire et la colonisation bactérienne de la péritonite infectieuse chez le rat et de cela, nous concluons que certaines lectine purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (**Alencar et al., 2005**).

### En biochimie et protéomique

Les lectines fournissent des outils pour étudier les glycoprotéines (anticorps, cytokines, hormones, facteurs de croissance, enzymes, récepteurs et même toxines et virus) pour les purifier (par affinité, lorsqu'elles sont couplées à des supports chromatographiques) ; pour les détecter (par fluorescence). Ou enzymatique, immunoblot, immunoprécipitation...). Il est donc possible de caractériser quantitativement les glycoprotéines, éventuellement après clivage enzymatique (structure et interaction du complexe). (**Dole.A et Lindeberg.S, 2005**).

- **Dans le domaine agronomique**

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

### 2. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* est une bactérie ubiquitaire isolée de l'environnement mais aussi de la flore cutanée humaine (**Bouvet et Joly-Guillou, 2007**). Elle existe dans le sol, l'eau, les égouts et de plusieurs environnements de soins de santé. *Acinetobacter baumannii* est également un micro-organisme commensal existant sur la peau et les muqueuses humaines et peut provoquer des infections opportunistes, en particulier chez les immunodéprimées, notamment la pneumonie, la méningite, la septicémie et les infections des voies urinaires (**Perez et al., 2007 ; Peleg et al., 2008**).

Un mystère demeure quant à l'habitat primaire d'*Acinetobacter baumannii*. Bien que l'idée soit répandue que son habitat principal est l'hôpital, il s'agit bien entendu de son habitat secondaire. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a pu démontrer la véritable origine de cette espèce (**Bouvet et Joly-Guillou, 2007**).

Étymologiquement, *Acinetobacter* est un mot composé issu du grec scientifique [ $\alpha$  + κίνητο + βακτηρ(ία)], signifiant tige non mobile.

Le mot *baumannii*, de Baumann, nommé en l'honneur de Paul et Linda Baumann (<http://www.bacterio.net/Acinetobacter.html>).

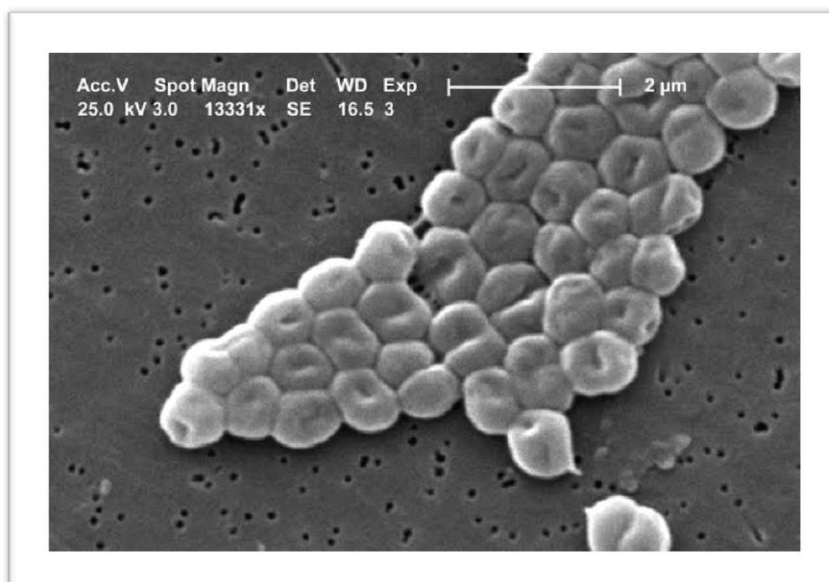
*Acinetobacter baumannii* est l'espèce type du genre *Acinetobacter* qui est composé de 43 autres membres (**Perez et Bonomo, 2017**). La taxonomie d'*Acinetobacter baumannii* est représentée dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : taxonomie d'*Acinetobacter baumannii* (Bouvet et Grimon, 1968)

Régne	Bacteria
Embranchement	Protobacteria
Classe	Gamma protobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Moraxellaceae
Genre	<i>Acinetobacter</i>
Espèce	<i>Acinetobacter baumannii</i>

## 2.1. Morphologie et structure

*Acinetobacter baumannii* regroupe des bacilles a gram négatif d'aspect coccoïde en phase stationnaire de 1 à 1,5µm de large et de 1,5 à 2,5µm de long parfois est difficilement décolorables. Comme son nom l'indique elle est non motile donc dépourvu de flagelle et non sporulé (Poly *et al.*, 2007 ; Monteil *et al.*, 1992) 30% des souches d'*Acinetobacter baumannii* possèdent une capsule que l'on peut distinguées lors de la coloration de Gram par l'apparition d'un halo claire au tour de la bactérie ce qui lui permet de formé des colonies mucoïdes capables de former des biofilms et ainsi de coloniser aussi bien les surfaces inertes que vivantes (Russo *et al.*, 2010) (Figure 4).



**Figure 4** : image microscopique d'*Acinetobacter baumannii* (Morshedtalab et al., 2020)

## 2.2. Caractères cultureux

*Acinetobacter baumannii* peut facilement être cultivée sur les milieux des non sélectif gélose trypto-caséinesoja), sélectifs (géloses Drigalski, Hektoen, MacConkey) et chromogènes en aérobiose et à une température de 30-37°C.

Sur gélose de Drigalski, elles apparaissent lactose négatif, sur gélose chromogène de type UTI elles apparaissent blanches (Hidri, 2012) et sur gélose nutritive, la colonie apparaît ronde, légèrement bombée, translucide ou opaque, lisse, blanc-jaunâtre, d'aspect beurré, à bords réguliers, le diamètre atteint 1 à 4 mm en 24 heures à 30°C (Monteil et al., 1992).

Les souches capsulées sont facilement identifiables en culture. Elles présentent un aspect muqueux alors que les colonies de souches non capsulées sont plus petites et présentent un aspect rugueux.

*Acinetobacter baumannii* est capable de croître à 44 °C, ce qui facilite son identification vis à vis la complexité de l'identification biochimique d'espèce (Hidri, 2012).

### 2.3. Caractère biochimique

*Acinetobacter baumannii* est une bactérie aérobie stricte non fermentaire, oxydase négative, catalase positive ; les tests classiques sont le plus souvent négatifs :

- ne réduit pas les nitrates.
- pas de gélatinase.a
- manque de décarboxylase pour la lysine, l'ornithine et l'arginine.
- absence de thiosulfate réductase de tryptophane, de désoxyribonucléase et de bêta-galactosidase.
- ne contient pas la désaminase pour la phénylalanine et le tryptophane.
- acidification sans production de gaz, du glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose et lactose (**Monteil *et al.*, 1992**).

### 2.4. Facteur de virulence

*Acinetobacter baumannii* est un pathogène opportuniste, peu ou pas virulent chez l'individu sain. Cependant, la bactérie peut compter sur un certain nombre de facteurs de virulence pour se développer chez des patients fragilisés ou persister à l'hôpital. En voici quelques exemples

#### 2.4.1. Les Porines

Les porines sont des protéines de la membrane externe associées à la modulation de la perméabilité cellulaire. OmpA est une porine à barillet b et l'une des porines les plus abondantes de la membrane externe. Chez *A. baumannii*, L'OmpA est le facteur de virulence très bien caractérisé, avec une variété de propriétés biologiques intéressantes identifiées dans des systèmes modèles (**Smith *et al.*, 2007 ; McConnell *et al.*, 2013**). Grâce notamment à la protéine de membrane externe OmpA qui a des propriétés cytotoxiques et pro-apoptotiques. , *A. baumannii* peut adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte.(**Choi *et al.*, 2008**).

### 2.4.2. Polysaccharides capsulaires et Lipopolysaccharides (LPS)

Le lipopolysaccharide ou LPS, un composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, induit chez l'Homme des signes cliniques tels que l'hyperthermie, l'agrégation des hématies, un choc septique, la diminution de la pression artérielle. Le LPS altère aussi l'activité bactéricide du complément dans le sérum humain en agissant de façon synergique avec la capsule polysaccharidique.

Au-delà d'OmpA, l'enveloppe d'*A. baumannii* est associée à de nombreux facteurs qui contribuent à la pathogénicité. à de nombreux facteurs qui contribuent à la pathogénicité. Parmi eux, les exopolysaccharides capsulaires et les LPS sont des facteurs de facteurs de pathogénicité. Notamment, de nombreux isolats provenant de patients atteints d'infections à *A. baumannii* expriment des polysaccharides capsulaires de surface et contiennent un groupe de gènes conservés, appelé locus K, qui peut déterminer la production de polysaccharides capsulaires (**Koeleman *et al.*, 2001 ; Geisinger et Isberg, 2015**).

Une étude a démontré que les polysaccharides capsulaires sont impliqués dans la résistance antimicrobienne de *A. baumannii* (**Geisinger et Isberg, 2015**). Les mutants déficients en polysaccharides capsulaires présentent une résistance intrinsèque plus faible aux antibiotiques peptidiques. En outre, la présence d'antibiotiques induit une hyperproduction de polysaccharides capsulaires polysaccharides capsulaires. Le site induit par les antibiotiques production de polysaccharides capsulaires induite par les antibiotiques augmente la résistance au complément de l'hôte et augmente la virulence dans un modèle d'infection systémique chez la souris (**Geisinger et Isberg, 2015**). Cette étude a également démontré que la production accrue de capsules après l'exposition à un antibiotique dépend de l'augmentation transcriptionnelle de l'expression du gène du locus (**Geisinger et Isberg, 2015**).

### 2.4.3. Les Phospholipases

La phospholipase est une enzyme lipolytique essentielle au métabolisme des phospholipides. et constitue un facteur de virulence chez de nombreuses bactéries, telles que bactéries, telles que *P. aeruginosa*, *Legionellamonocytogenes*, et *Clostridium perfringens* (**Camarena *et al.*, 2010 ; Flores-Diaz *et al.*, 2016**). Trois classes de phospholipases, telles que la phospholipase A (PLA), phospholipase C (PLC), et la phospholipase D (PLD), ont été définies en fonction du site de clivage. La PLA hydrolyse les acides gras à partir du squelette

de glycérol, tandis que la PLC coupe le groupe de tête phosphorylé du phospholipide. La dégradation des phospholipides affecte la stabilité des membranes des cellules hôtes., et le groupe de tête clivé peut interférer avec la signalisation cellulaire, ce qui entraîne des changements dans le fonctionnement de la cellule., ce qui entraîne des modifications de la réponse immunitaire de l'hôte (**Songer, 1997 ; Flores-Diaz et al., 2016**). Le PLC et la PLD ont été identifiés comme des facteurs de virulence chez *A. baumannii*(**Camarena et al., 2010 ; Jacobs et al., 2010 ; Stahl et al., 2015**). *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 possède deux PLC (A1S\_0043 et A1S\_2055) et l'inactivation du gène A1S\_0043 entraîne une modeste réduction de l'effet cytotoxique de *A. baumannii* sur les cellules épithéliales par rapport à celui de la souche parentale (**Camarena et al., 2010 ; Fiester et al., 2016**). La perturbation de l'un (A1S\_2989) des deux gènes PLD présents dans la souche 98-37-09 d'*A. baumannii* entraîne une résistance réduite au sérum humain, une diminution de la capacité à envahir les cellules épithéliales et une virulence réduite dans un modèle murin de pneumonie murin de pneumonie (**Jacobs et al., 2010**). Un autre rapport a montré qu'*A. baumannii* ATCC 19606 possède trois gènes PLD et qu'ils jouent tous trois un rôle important dans la virulence. trois jouent un rôle important dans la virulence et l'invasion des cellules hôtes. de manière concertée (**Stahl et al., 2015**). Ces résultats suggèrent que les enzymes phospholipases sont des facteurs de virulence importants dans la pathogenèse d'*A. baumannii* dans la pathogenèse.

#### 2.4.4. Les Vésicules de la membrane externe (VME)

Les OMV sont des vésicules sphériques de 20-200 nm de diamètre sécrétées par les membranes externes de divers pathogènes Gram-négatifs. par les membranes externes de diverses bactéries pathogènes Gram-négatives (**Kulp et Kuehn, 2010**). Elles sont composées de LPS, de protéines de la membrane externe et périplasmiques, de phospholipides et d'ADN ou d'ARN. des effecteurs bactériens aux cellules hôtes (**Ellis et Kuehn, 2010**). OMVs délivrent simultanément divers facteurs de virulence à l'intérieur des cellules hôtes simultanément et permettent aux agents pathogènes d'interagir avec l'hôte sans contact étroit entre les bactéries et les cellules de l'hôte (**Jun et al., 2013**). De nombreuses souches d'*A.*



*baumannii* sécrètent des OMVs qui contiennent divers facteurs de virulence, dont OmpA, des protéases, et des phospholipases (**Kwon et al., 2009**).

### 2.4.5. Systèmes de sécrétion de protéines

Plusieurs systèmes de sécrétion de protéines ont été identifiés chez *A. baumannii* (**Weber et al., 2015**). Le système de sécrétion le plus récemment décrit chez *A. baumannii* I est un système de sécrétion de type II (T2SS) (**Johnson et al., 2015**). Le T2SS est un complexe multiprotéique qui est structurellement très similaire aux systèmes de pili de type IV, qui est un appendice que l'on trouve couramment chez les bactéries Gram-négatives (**Korotkov et al., 2012**). T2SS transloque un large éventail de protéines de l'espace périplasmique au milieu extracellulaire hors de la cellule ou de la surface de la membrane externe. Le rôle d'un T2SS fonctionnel pour la virulence totale d'*A. baumannii* a été démontré dans des modèles d'infection pulmonaire de *G. mellonella* et des modèles d'infection pulmonaire murine. Les lipases (LipA, LipH et LipAN) et la métallopeptidase CpaA ont été identifiées comme des substrats du T2SS (**Harding et al., 2016**).

*Acinetobacter baumannii* possède également un système de sécrétion de type VI (T6SS). Le T6SS a été identifié pour la première fois chez *Vibrio cholera* et *P. aeruginosa*. De nombreuses bactéries utilisent le T6SS pour injecter des protéines effectrices, ce qui leur confère un avantage en matière de colonisation lors de l'infection de l'euphorie (**Mougous et al., 2006**) ou pour tuer des bactéries concurrentes (**Basler et al., 2013**).

Une étude a montré que le T6SS est actif dans six souches pathogènes d'*A. baumannii* (**Ruiz et al., 2015**). Cependant, le T6SS semble jouer un rôle important dans la virulence de *A. baumannii* d'une manière spécifique à la souche (**Repizo et al. 2015**).

### 2.4.6. Les Protéines de liaison à la pénicilline 7/8 (PBP7/8) et b-Lactamase PER-1

Bien que les PBP soient généralement impliquées dans la résistance aux antibiotiques b-lactamines, PBP7/8, codée par le gène *pbpG*, est un facteur de virulence chez *A. baumannii*. La souche mutante *pbpG* se développe similaire à celle de sa souche sauvage dans le milieu Luria-Bertani, mais le mutant présente une croissance réduite dans le sérum humain et son survie diminue significativement dans des modèles d'infection des tissus mous et de pneumonie chez le rat (**Russo et al., 2009**). Une étude de la morphologie bactérienne en

utilisant la microscopie électronique a suggéré que la perte de PBP7/8 pourrait avoir affecté la structure du peptidoglycane, ce qui pourrait affecter la sensibilité aux facteurs de défense de l'hôte (**Russo et al., 2009**). Il est intéressant de noter que la b-lactamase PER-1 a été suggérée comme étant un agent virulent de *A. baumannii*. facteur de virulence d'*A. baumannii*. PER-1 est une b-lactamase à spectre étendu b-lactamase (ESBL), mais ce gène est associé à l'adhésion cellulaire (**Sechi et al., 2004**). Notamment, de nombreuses b-lactamases sont associées à la virulence de diverses bactéries pathogènes, comme *E. coli* (**Dubois, 2009**), *P. aeruginosa* (**Moya et al., 2008**), et *K. pneumoniae* (**Sahly et al., 2008**).

### 2.4.7. Autres

La CipA d'*Acinetobacter baumannii* est une nouvelle protéine se liant au plasminogène et inhibant le complément, qui joue un rôle dans la résistance au sérum. Le plasminogène se liant à la CipA est converti en plasmine active qui dégrade le fibrinogène et le C3b du complément, ce qui contribue à la résistance sérique d'*A. baumannii*. Par conséquent, la souche mutante CipA est efficacement tuée par le sérum humain et présente également un défaut de pénétration des monocouches endothéliales (**Koenigs et al., 2016**).

Le quorum-sensing est un mécanisme de régulation largement présent chez les bactéries à Gram négatif. *A. baumannii* possède quatre de ces systèmes ayant un rôle dans l'auto-induction de multiples facteurs de virulence. réponse SOS, a été identifié comme un facteur de virulence de *A. baumannii* par exemple L'antigène de surface protéine 1 (SurA1) joue un rôle important dans la capacité d'adaptation et la virulence d'*A. baumannii* (**Aranda et al., 2011**).

Le biofilm correspond à un mode de vie communautaire pouvant être adopté transitoirement par certaines espèces bactériennes, dans lequel des micro-colonies produisent et s'entourent de polymères complexes (polysaccharides, ADN...) et visqueux. Le biofilm permet de résister aux défenses immunitaires, aux antibiotiques et aux antiseptiques, ainsi qu'aux environnements hostiles. Il joue notamment un rôle important dans le développement des infections sur matériel étranger (sonde endotrachéale, sonde urinaire, cathéter...). Donc La formation du biofilm joue un rôle important dans l'évasion immunitaire par *A. baumannii* (**de Breij et al., 2010**), et les pili sont essentiels pour l'adhésion d'*A. baumannii* et la formation de biofilms sur des abiotiques ainsi que pour la virulence (**Tomaras et al., 2003, 2008**).

## Bibliographie

Synthèse des pili de type IV (**Dhabaan et al., 2015**), ce qui suggère que la capacité de surproduire des pili confère un avantage biologique à *A. baumannii* d'autres protéines liées à la virulence ont été identifiées, notamment OmpR/EnvZ(**Tipton et Rather, 2016**) et FhaBC (**Perez et al., 2016**).

# **Matériel et Méthodes**

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Echantillons et analyse bactériologique

Ce travail a été réalisé par les chercheurs qui ont utilisé différentes espèces bactériennes pour les tests antibactériens et antibiofilm qui ont été utilisées à partir de leur collection de stock. Pour le test antiprolifératif, ils ont utilisé la lignée cellulaire cancéreuse humaine (lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus (HeLa).

Ils ont collectées aussi plusieurs parties de plantes, principalement les feuilles, d'origine environnementales d'une région voisine au cours de leur période d'étude et envoyées au laboratoire de microbiologie pour des tests de routine d'identification des micro-organismes basée sur la culture microbienne.

Afin de mettre en évidence la production de lectines chez ces espèces bactériennes, ils ont émulsionnés les échantillons dans une solution saline tampon phosphate (PBS) et bien secoués pour que les microbes se détache du sable. A partir de suspension, ils ont étalés 10µl de PBS sur plusieurs plaques de culture dont la gélose au sang, Agar MacConkey et le bouillon d'infusion de cœur de cerveau qui ont été incubés à 37°C pendant 24-36 heures.

Les colonies qui ont poussé sur les plaques ont été observées pour leurs caractères morphologiques. Et les colonies individuelles distinctes ont été identifiées de manière présomptive en utilisant un kit biochimique API 20<sup>E</sup> Selon le protocole standard du laboratoire. Il ont confirmé l'identification de chaque isolat par le système Vitek 2 en utilisant la carte Vitek GNI (bio Mérieux, France) conformément aux instructions du fabricant.

#### 1.2. La souche étudiée

Parmi les isolats étudiés, ils ont choisi l'isolat AB119 qui s'est avéré avoir une activité lectinique abondante. Et identifié comme *Acientobactor baumannii*.

**2. Mise en évidence des lectines**

**2.1. Détection phénotypique et moléculaire de la lectine**

Une réaction en chaîne par polymérase conventionnelle a été réalisée pour détecter la présence du gène de la lectine dans les isolats individuels. Une seule colonie a été sélectionnée comme modèle pour la PCR directement dans un mélange de réaction (eau MilliQ 38 µl, tampon de réaction 10X -5.0µl(1x), mélange de dNTP(10mM)-1 µl(200µM), Taq ADN polymérase 1 µl(1U/Réaction) et amorce lectine comme indiqué dans le **tableau 4**. Le contenu a été mélangé et placé dans le thermocycleur (M.J. Recherche – 150 minicyler).

Les produits PCR amplifiés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d’agarose à 1% et à une échelle d’ADN de 100 Pb (Kapa, Afrique du sud) et visualisés sous lumière UV.

Le criblage quantitatif phénotypique de la lectine a été effectué en utilisant des plaques de microtitration comme décrit précédemment. En bref ; la suspension a été diluée (100 µl) de chaque culture pure individuelle. Isolat bactérien avec du PBS 0,02M (pH 7,2) a été mélangée avec une suspension de 3 % d’érythrocytes humaines (O+ ; 100 µl) dans une plaque de microtitration et a été incubée à 37°C pendant 2-4 heures. L’activité a été exprimée en unités d’hémagglutination (U.H.), qui est définie comme l’inverse de la plus haute dilution qui montre une agglutination (**Lotan et al., 1975**).

**Tableau 4** : détails de l’amorce de la lectine

Lectine	Amorce
Primaire	5’-GGTCTTGTTATGTAAGTCTT-3’
Inversé	5’-GGCGCATAGTCCTCTATAG-3’

### 2.2. Fermentation

L'isolat AB119 sélectionné a été cultivé sur le milieu facteurs de colonisation antigènes(CFA) (acide aminé gazeux, 10g/L ; extrait de levure, 1,5 g/L ; MgSO<sub>4</sub> 0,05 % ; MnCl<sub>2</sub>, 0,005 %), à 37°C pendant 24-36 heures.

### 2.3. Extraction des lectines

Les cellules bactériennes ont été récoltées par une centrifugation à 6000 rpm pendant 30mn, lavées trois fois afin d'éliminer le milieu des cellules puis remises en suspension dans du PBS 0.05 M (pH 7,2). Les cellules ont été perturbées par sonification (40 hz, 30%) pendant 20 minutes à 4°C.

Ils ont recueilli le surnageant par centrifugation à 6000 rpm pendant 20 minutes et utilisé pour établir l'activité hémagglutinante de la lectine.

### 2.4. Purification des lectines

La lectine a été purifiée selon le protocole publié précédemment avec une légère modification (**Hou *et al.*, 2010**).

#### 2.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Une précipitation supplémentaire des protéines a été réalisés ; ils ont utilisé du sulfate d'ammonium à 50% de saturation et incubée pendant 4 heures, puis centrifugé à 12000g pendant 10 minutes.

#### 2.4.2. Dialyse

Les extraits bruts des protéines obtenus, ont été dialysés en utilisant la colonne DEAE-Sephrose (2,5x10 cm) qui a été équilibrée et lavée avant son utilisation avec du PBS 0,01 M (pH 8,0).

Les composer des protéines on été éluer avec le même tampon en utilisant un gradient de NaCl (0.1-0.5 M) au débit de 1 ml/min. Différentes fractions ont été collectées et vérifiées pour leur activité hémagglutinante.

### 2.4.3. Chromatographie

#### 2.4.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions CM-Sepharose

Toutes les fractions actives des lectines ont été chargées sur une colonne échangeuse de cations CM-Sepharose (2,5x10 cm). Les éluants ont été à nouveau vérifiées pour leur activité hémagglutinante et les fractions actives ont été regroupées.

#### 2.4.3.2. Chromatographie sur gel filtration Sephadex75

L'échantillon groupé a été dialysé à nouveau avec du PBS 0,01 M et soumis à une colonne Sephadex 75 10/300 GL (pré équilibrée avec du PBS 0,01 M ; pH 7,2). Les éluants ont été obtenus en utilisant 0,1-0,5 M de NaCl dans le PBS 0,01 M, à un débit de 1 ml/min.

#### 2.4.3.3. Estimation de la teneur en protéines et du poids moléculaire

La concentration en protéines de la fraction purifiée a été déterminée selon la méthode standard de Bradford 1976, en utilisant le BSA (bovine *sérum albumine*), à une dilution de concentration connue, en tant qu'étalon. La taille moléculaire de la lectine purifiée éluée de la colonne Sephadex G-150 a été déterminée par SDS-PAGE dans des conditions réductrices sur un gel à 10%. Les masses moléculaires des protéines ont été déterminées à l'aide de marqueurs de poids moléculaire élevé et faible appelé marqueurs (*Sigma-aldrich*, Allemagne).

## 3. Les activités biologiques

### 3.1. Mise en évidence de l'activité antibiofilm

Différents isolats bactériens d'origine clinique comprenant *Enterococcus faecalis* Et Gram négatif *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ont été cultivés sur Brain Heart Infusion Agar (BHAI) (Difco) contenant 0,08% (p/v) de Congo-Red Agar (SigmaAldrich, Allemagne) ; 5% (p/v) de saccharose (Dinamica, SP, Brésil).

L'inoculation a été faite en stries et incubée à 37 °C en conditions aérobies jusqu'à 36 heures. Les souches non productrices de biofilm ont formé des colonies rouges, tandis que les producteurs de biofilm ont formé des colonies noires. Les isolats bactériens ont été cultivés en double sur BHAI complété par de la lectine purifiée.



## Matériel et méthodes

La lectine purifiée a été testée pour sa capacité à inhiber la formation de biofilms par toutes les bactéries productrices de biofilms mentionnées ci-dessous.

La méthode de la plaque de microtitration a été suivie pour semi-quantifier la capacité de formation de biofilm des Isolats bactériens tels que mentionnés dans l'essai précédent selon le protocole décrit Ailleurs (**Kalaiarasan *et al.*, 2017**)

La culture pure d'une nuit de chaque souche individuelle a été inoculée dans 200ul de BHA1 dans une plaque de microtitration et ensuite incubée à 37°C pendant 24-36 heures.

Après la période prescrite, la plaque a été secouée pour détacher les colonies individuelles dans le liquide et la plaque a été lavée trois fois avec du PBS suivi d'un pipetage du liquide. Pour enlever le liquide sans perturber le biofilm. Les plaques ont été séchées à l'air dans un incubateur à 37° C pendant 15 min puis séchage à l'air libre pendant 15 minutes. Tous les puits ont été colorés avec 1% de Crystal violet pendant 5 min, suivi d'un lavage dans du PBS pour se débarrasser de la coloration indésirable. La biomasse colorée dans le puits a été solubilisée avec 250ul d'acide acétique glacial à 30% pendant 10 minutes et l'absorbance de la coloration a été mesurée à 595 nm.

Un test en double a été effectué, La lectine purifiée a été ajoutée au milieu de croissance au moment de l'inoculation et le test a été poursuivi comme mentionné ci-dessus. Tous les tests ont été effectués en triplicata et la moyenne de chaque test a été utilisée pour le calcul des résultats et l'évaluation statistique.

### **3.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

Les isolats bactériens mentionnés ci-dessus sont utilisés pour déterminer l'activité antibactérienne de lectines purifiées. L'isolat a été cultivé et incubé pendant une nuit dans un bouillon Luria-Bertani avec agitation à 37°C sur un agitateur rotatif. L'activité antimicrobienne des lectines a été mesurée à l'aide du test de microdilution décrit par Park et al. (**Park *et al.*, 2007**).

### 3.3. Mise en évidence de l'activité antiproliférative

Le test MTT a été utilisé pour détecter la prolifération et la survie des cellules en utilisant des cellules cancéreuses HeLa en phase de croissance logarithmique (5 x 5 cm), phase de croissance logarithmique (5x 10<sup>4</sup> cellules/ml). Les cellules en phase de croissance active ont étéensemencées (5x10<sup>3</sup> cellules/puits) indépendamment les unes des autres dans une plaque à 96 puits avec un volume final de 200 µl/puits.

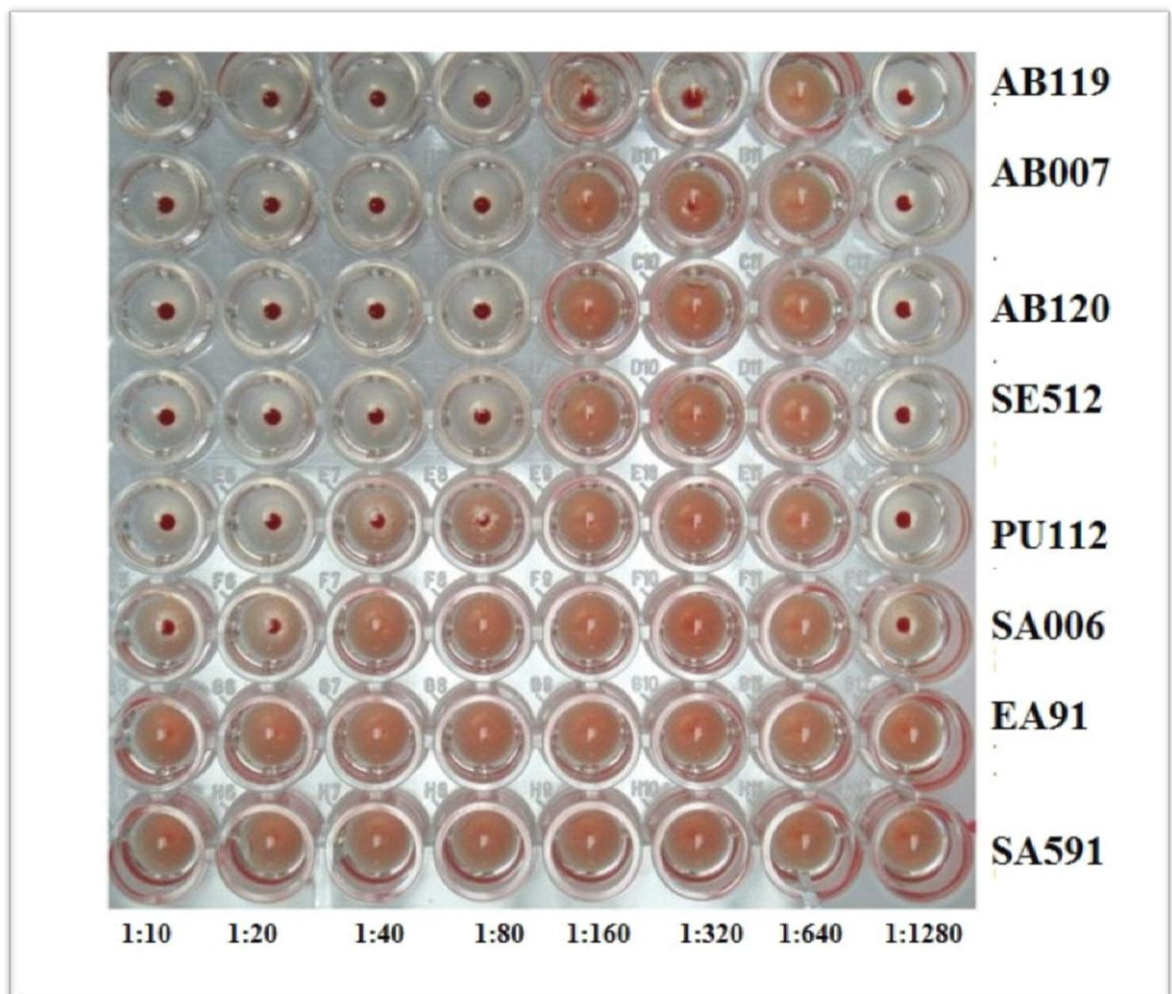
Groupe témoin a été cultivé dans du DMEM. Un test en double a été réalisé avec la lectine purifiée. Ces plaques ont été incubées à 37°C pendant 24-36 h. A la période prescrite les milieux des cultures cellulaires ont été jetés. A cela, 50 µL de milieu sans sérum et 50 µL de solution de MTT ont été ajoutés à chaque puits et incubés à 37°C pendant 3 heures. Après incubation, 150 µl de solvant MTT (acide acétique glacial) ont été ajoutés à chaque puits. La plaque a été enveloppée dans une feuille d'aluminium et secouée à l'aide d'un agitateur orbital pendant 10 à 15 minutes. L'absorbance a été lue à OD590 nm dans l'heure qui suit.

# **Résultats et Discussion**

## 1. Identification bactérienne

### 1.1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinine

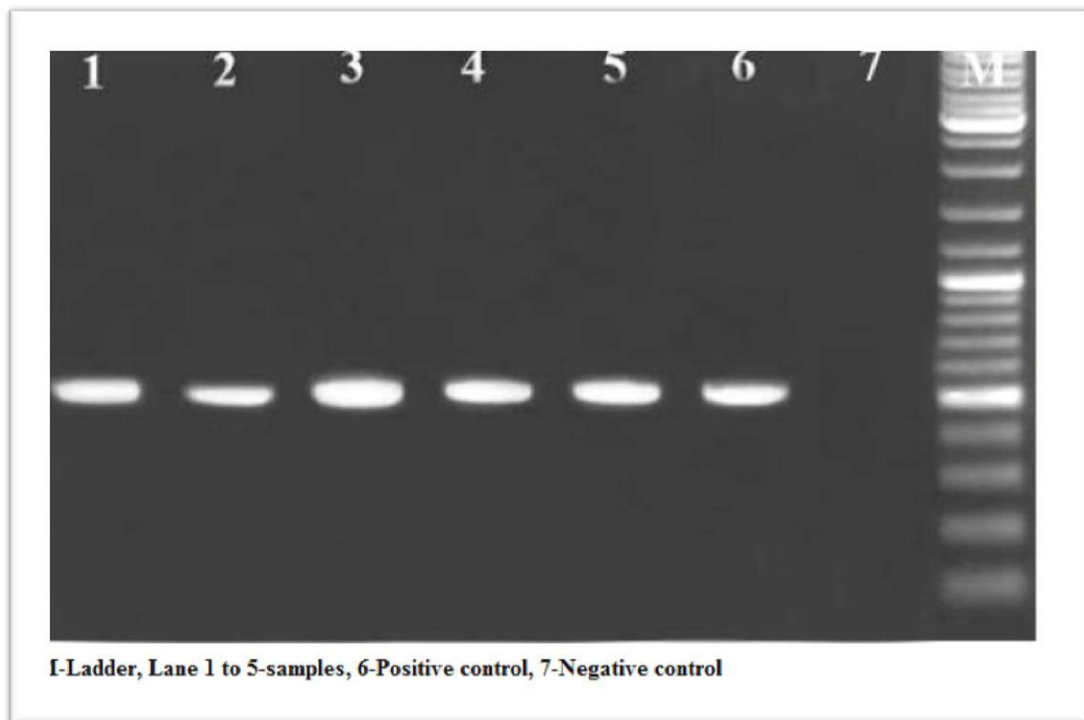
Parmi les échantillons des plantes prélevés de l'environnement, seuls sept isolats ont montré des activités d'hémagglutination (**figure 5**).



**Figure 5** : test d'hémagglutination des isolats

### 1.2. Détection phénotypique et moléculaire de la lectine

Dans les résultats de la PCR, les sept isolats montraient la présence du gène lec avec une taille de 625 pb (**figure 6**), cependant, ces isolats dans l'analyse quantitative ont montré une activité différente du gène lec. Parmi cela un AB119, l'isolat Ayant une activité lectine puissante et abondante.



**Figure 6 :** électrophorèse sur gel pour le gène lec (résultats positifs avec un amplicon de 625bp).

## 2. Purification de la lectine

### 2.1. Fermentation

La lectine a été purifiée à partir de la culture AB119 cultivée dans le milieu CFA. La culture AB119 a été utilisée pour récolter la lectine.

### 2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Une précipitation au sulfate d'ammonium a été faite à des concentrations progressivement croissantes. Le sulfate d'ammonium, avec 30-80 %, a été utilisé pour précipitation des lectines.

A une concentration de 75-80 % de Sulfate d'ammonium, les activités d'hémagglutination sont avérées maximales pour AB119 (**figure 7**).

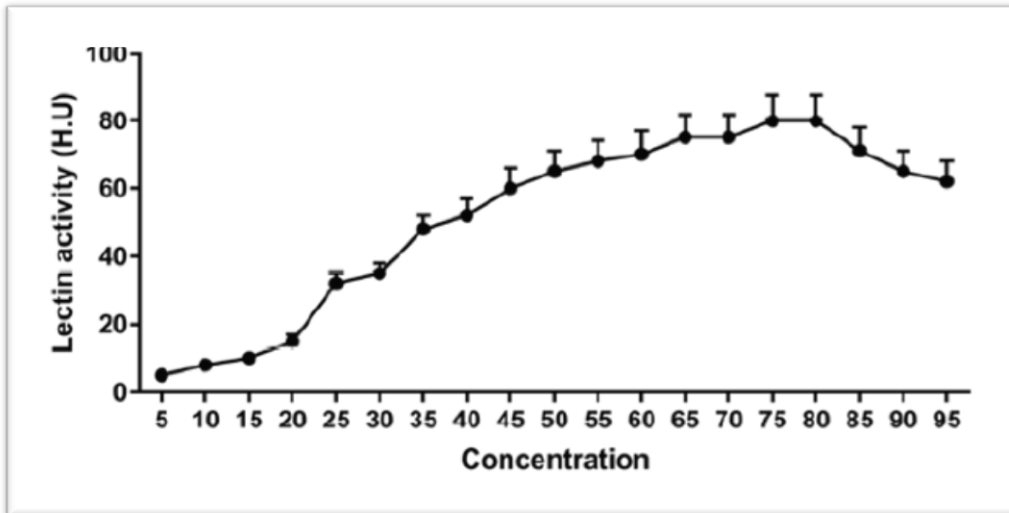


Figure 7 : test d'hémagglutination en plaque de microtitration par les isolats étudiés

### 2.3. Chromatographie

Le poids moléculaire de la lectine purifiée était de 30 kD en SDS-PAGE (figure 8).

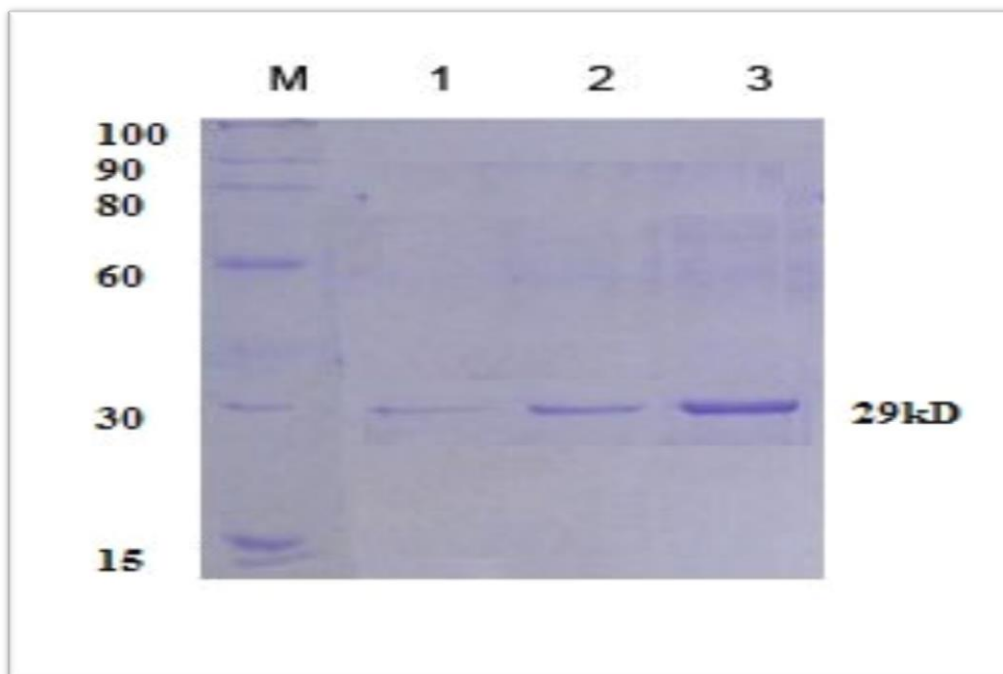
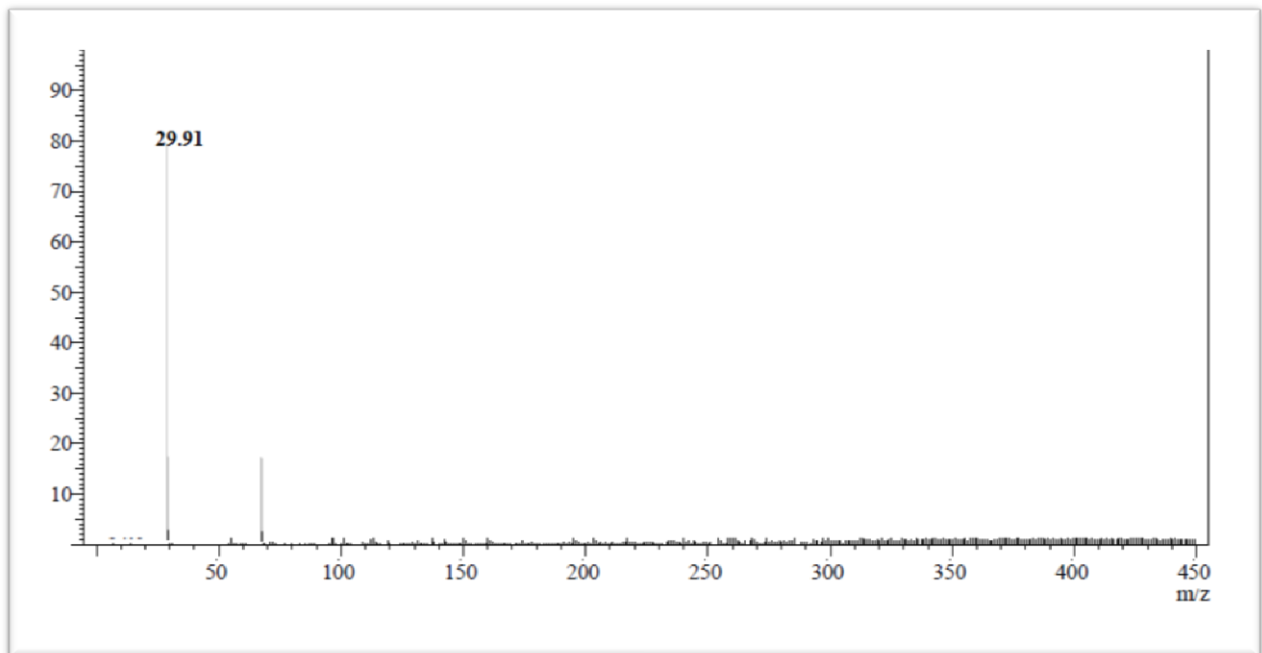


Figure 8 : SDS-PAGE de la lectine purifiée à partir de AB119

Plus loin les résultats de l'HPLC ont confirmé que la valeur m/z de la lectine purifiée était de 29,91 (**figure 9**).



**Figure 9** : valeur m/z de la lectine AB119 par HPLC

### 3. mise en évidence des activités bactériennes

#### 3.1. Activité anti-biofilm de la lectine

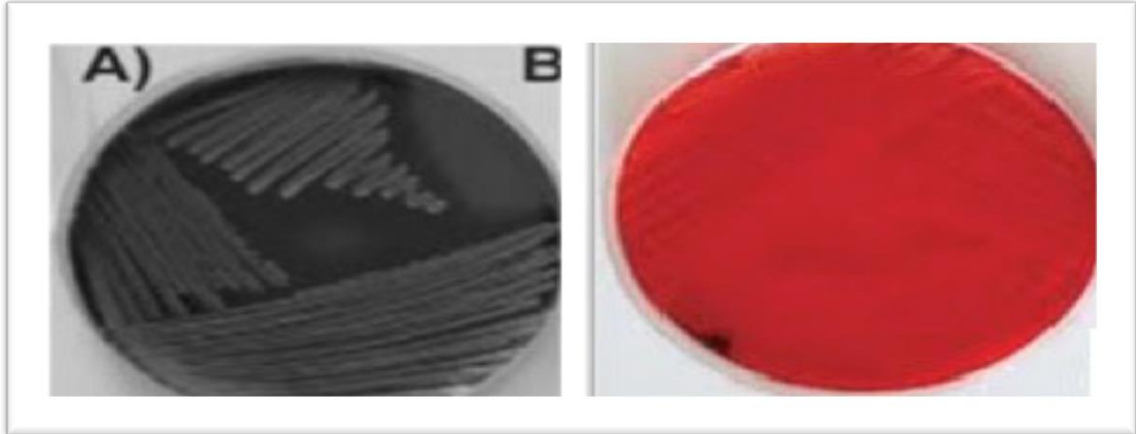
L'activité antibiofilm de la lectine AB119 a été évaluée sur différents genres bactériens.

On a constaté que la lectine affecte efficacement l'activité du biofilm de ces isolats bactériens testés. Dans le milieu Congo-Red Agar, tous les isolats bactériens ont montré la capacité de produire un biofilm qui a été inhibé en présence de la lectine et la couleur est restée la même : colonies roses ou gris pâle.

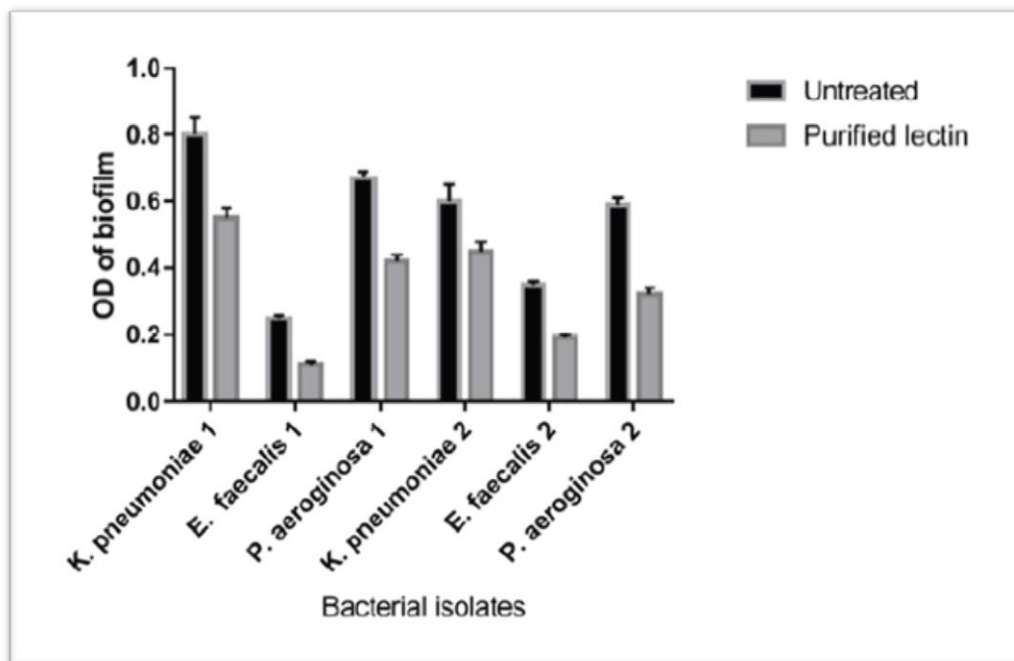
Indiquent l'absence de production de biofilm lorsque la lectine est supprimée dans le milieu (**Figure 10**). Le site Couleur des colonies en croissance était rose ou gris pâle et ces résultats font référence à une perte de la capacité à former des biofilms et des colonies et une couche non gluante à la surface du milieu (**figure 10**).

## Résultats et discussions

Dans l'essai en plaques de microtitration, l'échelle d'inhibition des biofilms par la lectine purifiée était significative et la capacité de formation de biofilms a été significativement réduite pour tous les isolats bactériens comme le montre la **Figure 11**.



**Figure 10** : Mise en évidence la production des biofilm par des isolats bactériennes

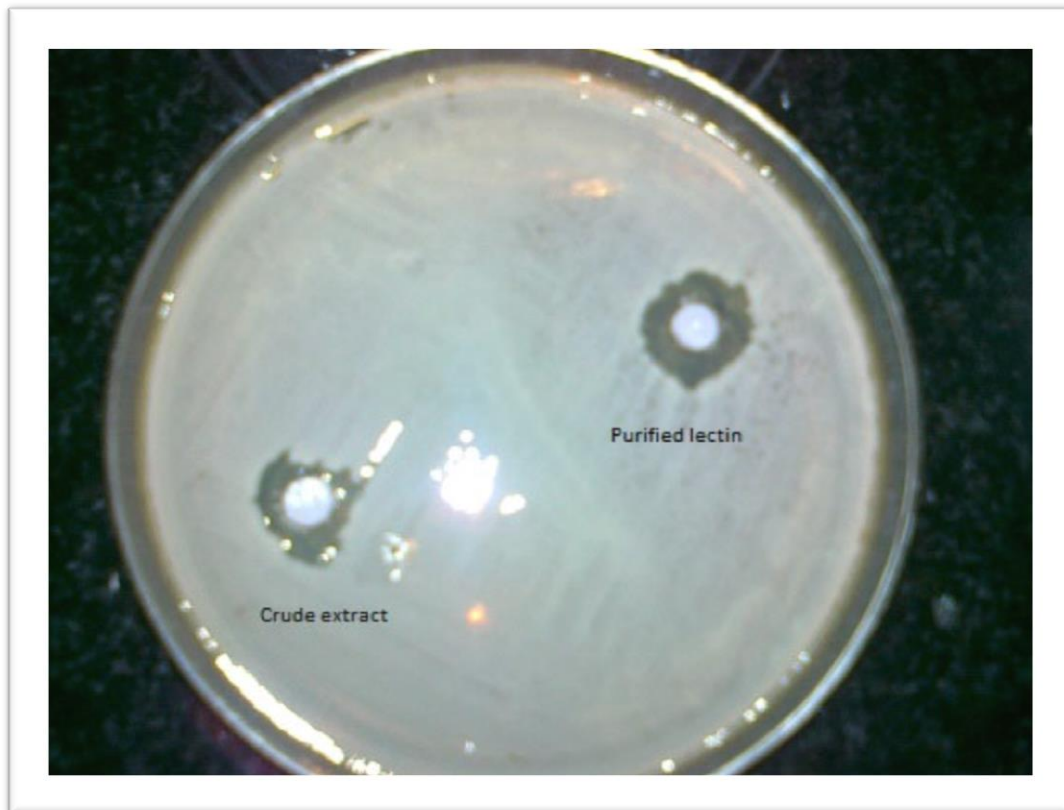


**Figure 11** : l'échelle d'inhibition des biofilms par la lectine purifiée pour les isolats bactériens



### 3.2. Activité antimicrobienne

La lectine a inhibé la croissance des trois espèces bactériennes testées après traitement pendant 24 h (**figure 12 ; tableau 5**), et cet effet antimicrobien était uniforme pour toutes les espèces, qu'elles soient à Gram positif ou à Gram négatif.



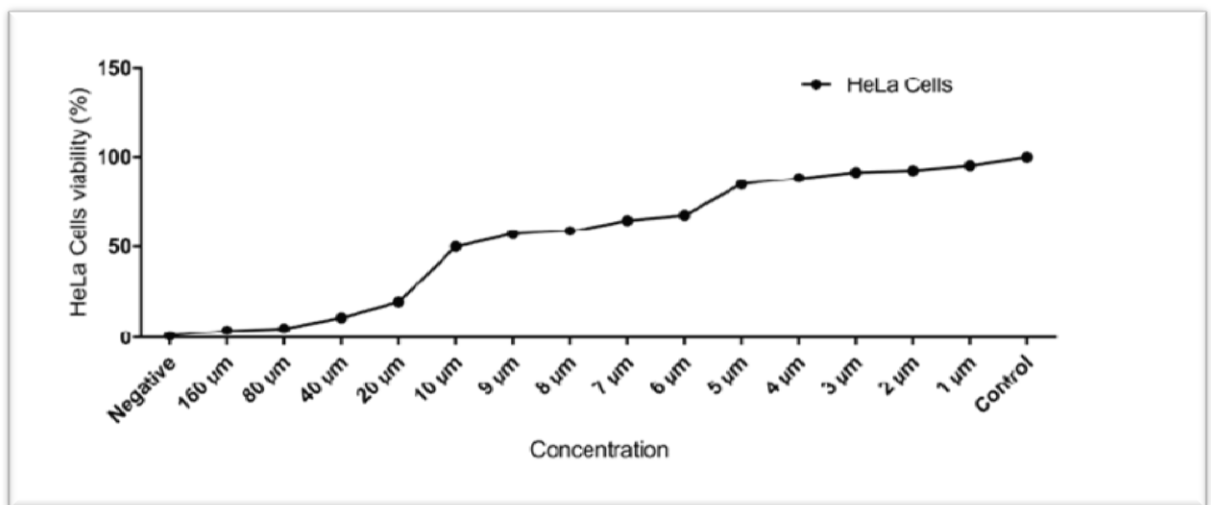
**Figure 12 :** Mettre en évidence l'activité antimicrobienne de la lectine

**Tableau 5 :** antibiogrammes avec lectine comme complément

Fraction/Antibiotique	Activité antibactérienne en mm		
	<i>E. fecalis</i>	<i>P.aeuroginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
Extrait brut	15.0 ±1.0 <sub>b</sub>	17.0 ±4.0 <sub>b</sub>	15.0 ±3.0 <sub>b</sub>
lectine purifiée	22.0 ±2.0 <sub>b</sub>	25.0 ±4.0 <sub>b</sub>	22.0 ±3.0 <sub>b</sub>
Streptomycine (10µl/mL)	27.02 ± 1.0 <sub>a</sub>	30.0 ±1.0 <sub>a</sub>	27.0 ±1.0 <sub>a</sub>

### 3.3. Activité antiproliférative

Les effets antiprolifératifs de la lectine contre les cellules HeLa ont été déterminés à l'aide du test MTT (**figure 13**). La lectine a montré des effets inhibiteurs significatifs sur la prolifération à un IC<sub>50</sub> de 10  $\mu$ M pendant 24 h (P, 0,05). L'inhibition due à la lectine était dépendante du temps et de la concentration pour les lignées cellulaires testées.



**Figure 13** : résultat de test MTT montre Les effets antiprolifératifs de la lectine contre les cellules HeLa

### Discussions

Cette étude a été effectuée pour trouver une source bactérienne pour la lectine et les sources environnementales ont été examinées pour l'isolement d'organismes ayant une activité lectine.

Sept isolats bactériens ont montré une activité lectine, dont quatre étaient des espèces d'*Acinetobacter baumannii*.

## Résultats et discussions

La souche AB119 de *A. baumannii* s'est avérée produire une hémagglutination abondante et bien qu'elle ait été sélectionnée pour la récolte de la lectine.

La lectine a été identifiée à partir d'une nouvelle espèce bactérienne non signalée auparavant et purifiée à partir d'une souche *Acinetobacter baumannii* AB119, isolée d'une origine végétale.

La lectine est considérée comme le composant le plus virulent de *A. Baumannii* lié à des saccharides particuliers et contribue fondamentalement aux Micro-organismes à se fixer à différentes surfaces (**Brubaker, 1985**).

La Précipitation maximale a été obtenue par la méthode du sulfate d'ammonium à une concentration de 80 % et La purification a été réalisée par des chromatographies d'échange d'ions et d'affinité.

Le Sulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-PAGE) a montré que la masse moléculaire de la lectine était de 30 000 daltons

La lectine montre une activité anti-biofilm et inhibitrice de croissance contre les bactéries Gram-positives (*E. Fecalis*) et Gram-négatives (*K. pneumoniae* & *P. aeruginosa*). Bien que l'étude n'ait pas vérifié diverses espèces bactériennes, l'efficacité des lectines est significative et peut encore être évaluée avec d'autres micro-organismes.

Dans le processus de formation du biofilm, la surface est collée et colonisée, et le biofilm forme des amas cellulaires multicouches sous la forme d'une matrice polysaccharidique. La matrice polysaccharidique joue un rôle important dans le développement des organismes et la pathogénicité des bactéries (**O 'Toole et al., 2000**). Ces polysaccharides du biofilm protègent les micro-organismes du système immunitaire inné humain (**Leid, 2009**). Le biofilm produit par la bactérie a été réduit de 20-30% en 24-36 heures après l'administration de la lectine, ce qui pourrait être attribué à la propriété de liaison au glycan de la lectine ayant une affinité pour les polymères GlcNAc.

Il s'agit également de la première observation qu'une lectine d'origine bactérienne empêche la formation de biofilms d'autres espèces bactériennes étroitement apparentées et par

conséquent, pourrait avoir des applications possibles en microbiologie clinique et en sciences biomédicales.

Nos résultats montrent que les lectines peuvent être un substitut naturel aux agents antimicrobiens, et pour les mettre en pratique, il est nécessaire de mieux élucider l'utilisation fonctionnelle de ces protéines.

Il est bien connu que les bactéries associées aux plantes interagissent par le biais d'adhésines qui sont protégées par des lectines (**Danhorn et Fuqua, 2007**). Des études antérieures ont rapporté l'inhibition de la motilité et de la multiplication des bactéries pathogènes par les lectines (**Gaidamashvili et van Staden, 2002 ; Karpunina et al., 2003**). Les différents homologues de lectines dans les souches cliniques et écologiques ont un rôle vital dans l'attachement et la pathogénèse. Cela pourrait permettre de mieux comprendre l'interaction possible des lectines végétales avec les pathogènes humains.

La lectine qui fonctionne comme un antibiofilm peut également être utilisée comme molécule tensioactive pour modifier les caractéristiques physiques des cellules bactériennes et de l'environnement.

Bien que le mécanisme d'inhibition du biofilm n'a pas été étudié dans cette étude, on peut cependant spéculer qu'il fonctionne en alternant l'expression des gènes ou en perturbant les molécules de signalisation qui modifie la capacité de formation du biofilm.

Quelques publications antérieures ont indiqué l'activité antiproliférative de la lectine vers des lignées cellulaires cancéreuses (**Lam et Ng, 2010**) ; celles-ci incluent les lectines provenant de diverses sources végétales.

Ici, dans cette étude, nous avons vérifié les propriétés antitumorales de lectine dérivée d'origine bactérienne et c'est peut-être la première fois qu'une lectine provenant d'un microbe a été testée pour son activité antiproliférative sur des cellules HeLa avec un taux d'alcoolémie de 1,5 % avec une IC50 de 10.0  $\mu$ M trouvée in vitro.

Cette lectine AB119 a montré une bonne efficacité dans l'inhibition de la prolifération et peut induire l'apoptose des cellules HeLa d'une manière dépendante de la concentration.

## Résultats et discussions

Bien que la voie menant à l'apoptose n'ait pas été découverte. Et des études supplémentaires sont nécessaires pour découvrir les mécanismes détaillés.

**Conclusion**

**et**

**Perspectives**

### Conclusion et prescriptives

Ces dernières années, plusieurs études ont été faites sur les lectines vu leur production qui est très coûteuse, leur grande importance, leur rôle et leur abondance dans le monde microbien généralement et dans les microorganismes pathogènes particulièrement.

A la fin de ce travail nous sommes intéressés à la mise en évidence, extraction, et purification des lectines chez *Acinetobacter baumannii* et ces dernières nous ont conduit à des activités biologiques évidentes (activité hémagglutinante, antibactérienne, antibiofilm et antiprolifératifs).

Nous avons choisi comme souche *Acinetobacter baumannii*, nous avons sélectionné l'isolat AB119 pour sa capacité à produire des lectines solubles que nous avons obtenu après le test d'hémagglutination en présence d'érythrocytes humains.

Parmi les échantillons des plantes prélevés de l'environnement, seul sept isolat ont montré une activité hémagglutinante ainsi que la présence du gène lec avec une taille de 625 pb.

Nous avons cultivés l'isolat AB119 dans le milieu CFA afin de réaliser une purification de la lectine présente chez *Acinetobacter baumannii*. La purification de notre extrait, nous a permis d'observer l'activité hémagglutinante qui s'est avérée maximale 80UH à des concentrations 75-80 % de sulfate d'ammonium, suite à une chromatographie dont toutes les fractions actives ont été chargés sur une colonne échangeuse de cation CM-Sephrose puis sur un gel de filtration Sephadex75. Nous avons obtenu sur gel SDS-PAGE le poids moléculaire de la lectine purifiée qui était de 30 KD ainsi la confirmation par HPLC de la valeur m/z de la lectine purifiée qui était de 29.91.

L'étude de l'activité anti-biofilm a montré que la capacité de production de biofilm en présence de la lectine purifiée était significativement réduite et cela indique que la lectine a une activité antibiofilm abondante.

Nous avons réalisé aussi une étude de l'activité antibactériennes où nous avons remarqué une inhibition de la croissance des trois espèces bactériennes testées (Gram+ et Gram-) après un traitement par lectine en 24h.

En dernier lieu nous avons testé l'activité antiprolifératif de la lectine AB119 sur les cellules HeLa, à la fin de ce test nous avons vu que la lectine AB119 a montré une bonne efficacité dans l'inhibition de la prolifération des cellules HeLa.

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

## Conclusion et perspectives

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



**Références**

**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

Alencar, N. M. N. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 919–922 (2005).

Alyousef, A.A., A. Alqasim, et M.S. Aloahd. 2018. « Isolation and Characterization of Lectin with Antibacterial, Antibiofilm and Antiproliferative Activities from *Acinetobacter Baumannii* of Environmental Origin ». *Journal of Applied Microbiology* 124 (5): 1139-46. <https://doi.org/10.1111/jam.13699>.

ARAGAO. K. S. études structure-fonction de lectine (Disc I et Disc II) de *Disctyostelium discoideum*. Biomolécules. Université Joseph-Fourier-Grenoble I. France, 2009. Pp:17-27.

Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M. P., Barbe, J., et al. (2011). *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J. Bacteriol.* 193, 3740–3747. doi: 10.1128/JB.00389-11

Barbosa, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 673–678 (2001).

Barondes, S. H. 1984, *Science*, 223, 1259.

Bouvet JM, Joly-Guillou ML. *Acinetobacter*. Précis de bactériologie Clinique. Editions ESKA, Editions Alexandre Lacassagne 2007 :959-77.

Boyd, W. C. & Shapleigh, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 119, 419 (1954).

Brubaker, R. R. (1985). Mechanisms of bacterial virulence. *Annual Reviews in Microbiology*. 39, 21-50.

Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., and Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNAsequencing. *PLoS Pathog.* 6:e1000834. doi: 10.1371/journal.ppat.1000834

Cavada, Benildo, Vanir Pinto-Junior, Vinicius Osterne, et Kyria Nascimento. 2018. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships). *International Journal of Molecular Sciences* 20 (1): 30.<https://doi.org/10.3390/ijms20010030>.

Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., et al. (2008a). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* 10, 309–319. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x

CROCKER. P. R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2002. 12: 609-615.

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

Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 401-422.

de Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., et al. (2010). Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS ONE* 5:e10732. doi: 10.1371/journal.pone.0010732

Dhabaan, G. N., AbuBakar, S., Cerqueira, G. M., Al-Haroni, M., Pang, S. P., and Hassan, H. (2015). Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1370–1376. doi: 10.1128/AAC.01696-15

Dodson, K. W. *et al.* Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**, 733–743 (2001).

Dole, A. & Lindeberg S. (2005). Agrarian diet and diseases of affluence—do evolutionary novel dietary lectins cause leptin resistance. *Bio, med central lib. doi* .10.1186/1472-6823-5-10 .

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 1999. 9: 585-590.

Dubois, D., Prasadarao, N. V., Mittal, R., Bret, L., Roujou-Gris, M., and Bonnet, R. (2009). CTX-M  $\beta$ -lactamase production and virulence of *Escherichia coli* K1. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1988–1990. doi: 10.3201/eid1512.090928

Ellis, T. N., and Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 81–94. doi: 10.1128/MMBR.00031-09

Fiester, S. E., Arivett, B. A., Schmidt, R. E., Beckett, A. C., Ticak, T., Carrier, M. V., et al. (2016). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 11:e0167068. doi: 10.1371/journal.pone.0167068

Flores-Diaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Giron, A., and Flieger, A. (2016). Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 597–628. doi: 10.1128/MMBR.00082-15

FRIEDMAN, M. 2013. Protein crosslinking : nutritional and medical consequences, Springer Science & Business Media.

Geisinger, E., and Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 11:e1004691. doi: 10.1371/journal.ppat.1004691

Gaidamashvili, M., & Van Staden, J. (2002). Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of ethnopharmacology*. **80**, 131-135.

Harding, C. M., Kinsella, R. L., Palmer, L. D., Skaar, E. P., and Feldman, M. F. (2016). Medically relevant *Acinetobacter* species require a type II secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS Pathog.* 12:e1005391. doi: 10.1371/journal.ppat.1005391

Heron, B. T., Sateriale, A., Teixeira, J. E. and Huston, C. D. 2011, *Int. J. Parasitol.*, 41, 137.

Hidri N. Identification d'*Acinetobacter* spp. Au laboratoire. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2012 Apr 30 ;2012(441) :37–42.

Hirabayashi, J. Lectin-based structural glycomics : glycoproteomics and glycan Profiling. *Glycoconj. J.* 21, 35–40 (2004).

Hou, Y., Hou, Y., Yanyan, L., Qin, G., Li, J. (2010) Extraction and purification of a lectin from red kidney bean and preliminary immune function studies of the lectin and four Chinese herbal polysaccharides. *BioMed Research International.* 2010.

H. Monteil, L. Avril, H. Dabernat, F. Denis. *Bactériologie clinique* 2<sup>ème</sup> Edition. 1992.

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

Jacobs, A. C., Hood, I., Boyd, K. L., Olson, P. D., Morrison, J. M., Carson, S., et al. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect. Immun.* 78, 1952–1962. doi: 10.1128/IAI.00889-09.

JAIN. D., KAUR. K. J., SALUNKE. D. M. Plasticity in protein-peptide recognition : crystal Structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys J.*, 2001. 80 : 2912-2921.

Jeyaprakash A A, Katiyar S, Swaminathan C P, Sekar K, Surolia A. (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin : an X-ray and Modeling study. *J Mol Biol.* 332,217-228.

Johnson, T. L., Waack, U., Smith, S., Mobley, H., and Sandkvist, M. (2015). *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and in vivo fitness. *J. Bacteriol.* 198, 711–719. doi: 10.1128/JB.00622-15.

Jun, S. H., Lee, J. H., Kim, B. R., Kim, S. I., Park, T. I., Lee, J. C., et al. (2013). *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE* 8:e71751. doi: 10.1371/journal.pone.0071751.

Kairies, N. *et al.* The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13519–13524 (2001).

Kalaiarasan, E., Thirumalaswamy, K., Harish, B. N., Gnanasambandam, V., Sali, V. K., & John, J. (2017). Inhibition of quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors. *Microbial Pathogenesis*. *111*, 99- 107.

Kanazawa, N., Tashiro, K. and Miyachi, Y. 2004, *Immunobiology*, 209, 179.

Karpunina, L. V., Mel'nikova, U. Y., & Konnova, S. A. (2003). Biological Role of Lectins from the Nitrogen-Fixing *Paenibacillus polymyxa* Strain 1460 During Bacterial–Plant–Root Interactions. *Current microbiology*. **47**, 376-378.

Kenoth, R., Raghunath Reddy, D., Maiya, B. G. & Swamy, M. J. Thermodynamic and Kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichosanthes cucumerina* seed lectin. *Eur. J. Biochem.* 268, 5541–5549 (2001).

Koeleman, J. G., van der Bijl, M. W., Stoof, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Savelkoul, P. H. (2001). Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Control Hosp Epidemiol.* 22, 284–288. doi: 10.1086/501901

Koenigs, A., Stahl, J., Averhoff, B., Gottig, S., Wichelhaus, T. A., Wallich, R., et al. (2016). CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *J. Infect. Dis.* 213, 1388–1399. doi: 10.1093/infdis/jiv601

Kokourek, J. and Horejsi, V. (1981). Definition of a lectin. *Nature*, 290, 188.

Korotkov, K. V., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 336–351. doi: 10.1038/nrmicro2762

Kulp, A., and Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 163–184. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073413

Kwon, S. O., Gho, Y. S., Lee, J. C., and Kim, S. I. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 150–156. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x

Lam, S. K., & Ng, T. B. (2010). Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*. 17(6), 457-462.

Lee, Y. C. & Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 28, 321–327 (1995).

LEFFLER, H., CARLSSON, S., HEDLUND, M., QIAN, Y., POIRIER, F. Introduction to galectins. *Glycoconj. J.*, 2004. 19: 433-440.

Leid, J. G. (2009). Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*. 4, 66-70.

Lenka S, Imberty A, Jaroslave K. (2006). Modélisation moléculaire des lectines et des glycosyltransferases. *Biologie cellulaire*. Université de Grenoble I. France. Pp 56- 58.

LIENER, I., SHARON, N., GOLDSTEIN, J. The lectins Properties. Functions and Applications in biology and medicine. Academic Press INC. London LID, 1986. Pp 13-24.

LIS. H., SHARON. N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev*, 1998. 98: 637-674.

Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K.-E., & Wyns, L. (2003). Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 331(4), 861–70.

Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D., & Sharon, N. (1975). The purification, composition, And specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Biological Chemistry*. 250, 8518-8523.

Marques, G.F.O.; Osterne, V.J.S.; Almeida, L.M.; Oliveira, M.V.; Brizeno, L.A.C.; Pinto-Junior, V.R.; Santiago, M.Q.; Neco, A.H.B.; Mota, M.R.L.; Souza, L.A.G.; et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity. *Biochimie* **2017**, 140, 58–65.

McConnell, M. J., Actis, L., and Pachon, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 130–155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x

MC. Poly, CL. Martin, E. Bingen, Quentin. *Bactériologie médicale Technique usuelle*. 2007.

Miyoshi, M. *et al.* The lethal protein from Kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*) identified as a lectin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **28**, 255–264 (1982).

Morshedtalab, Zeinab, Ghasem Rahimi, Asieh Emami-Nejad, Alireza Farasat, Azita Mohammadbeygi, Nahid Ghaedamini, et Masoud Negahdary. 2020. « Antibacterial Assessment of Zinc Sulfide Nanoparticles against *Streptococcus Pyogenes* and *Acinetobacter Baumannii* ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20 (11): 1042-55.

Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., et al. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526–1530. doi: 10.1126/science.1128393



Moura, R. M., Queiroz, A. F. S., Fook, J. M. S. L. L., Dias, A. S. F., Monteiro, N. K. V., Ribeiro, J. K. C., Moura, G. E. D. D., Macedo, L. L. P., Santos, E. A. and Sales, M. P. 2006, *Comp. Biochem. Phys. A*, 145, 517

Moya, B., Juan, C., Alberti, S., Perez, J. L., and Oliver, A. (2008). Benefit of having multiple ampD genes for acquiring b-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3694–3700. doi: 10.1128/AAC.00172-08

MURDOCK. L. L., SHADE. R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectectes. *J. Agric. Food. Chem*, 2002. 50 (22): 6605-661.

NACHBAR. M.S., OPPENHEIM. J. D. Lectin in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1980. 33: 2238 -2345.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology.* 54, 49-79.

Park, S. C., Lee, J. R., Shin, S. O., Jung, J. H., Lee, Y. M., Son, H., & Hahm, K. S. (2007). Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. *Journal of agricultural and food chemistry.* 55, 5277-5281.

Park, S., Lee, M.-R. & Shin, I. Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1579–91 (2008).

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL : *Acinetobacter baumannii* : emergence Of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21(3) :538-582.

Perez A., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Alvarez-Fraga, L., Vallejo, J. A., Beceiro, A., et al. (2016). The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence.* doi: 10.1080/21505594.2016.1262313. [Epub ahead of print].

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA : Global Challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(10) :3471-3484.

Perez, Federico, et Robert A. Bonomo. 2017. *Acinetobacter Baumannii* and *Acinetobacter Spp*. In *Antimicrobial Drug Resistance*, édité par Douglas L. Mayers, Jack D. Sobel, Marc Ouellette, Keith S. Kaye, et Dror Marchaim, 923. Cham : Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9_10)

POIROUX. G. Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie. *Biologie cellulaire et Biochimie*. Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2011.Pp: 35-50.

RAMATA. N. Etude de l'activité hemagglutinante des lectines isolées des graines de *Abrus precatorius L.* la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Mali. Université de Bamako, 2010. Pp: 8-24.

Repizo, G. D., Gagne, S., Foucault-Grunenwald, M. L., Borges, V., Charpentier, X., Limansky, A. S., et al. (2015). Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. *PLoS ONE* 10:e0138265. doi: 10.1371/journal.pone.0138265

Ruiz, F. M., Santillana, E., Spinola-Amilibia, M., Torreira, E., Culebras, E., and Romero, A. (2015). Crystal Structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a Component of the Type VI Secretion System. *PLoS ONE* 10:e0129691. doi: 10.1371/journal.pone.0129691

Russo TA, Luke NR, Beanan JM, et al. The K1 capsular polysac- The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence Factor. *Infect Immun* 2010 ;78 :3993-4000.

Russo, T. A., MacDonald, U., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, I. J., Sauberan, S. L., et al. (2009). Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* 199, 513–521. doi: 10.1086/596317

Sahly, H., Navon-Venezia, S., Roesler, L., Hay, A., Carmeli, Y., Podschun, R., et al. (2008). Extended-spectrum b-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesions in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3029–3034. doi: 10.1128/AAC.00010-08

SANTOS, A. F. et DA SILVA, M. et NAPOLEÃO, T. et PAIVA, P. et CORREIA, M. D. S. et COELHO, L. 2014. Lectins : Function, structure, biological properties and potential applications.

Sechi, L. A., Karadenizli, A., Deriu, A., Zanetti, S., Kolayli, F., Balikci, E., et al. (2004). PER-1 type b-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med. Sci. Monit.* 10, BR180–BR184.

Sharon, Nathan, et Halina Lis. 2002. « How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22): 6586- 91. <https://doi.org/10.1021/jf020190s>

SHARON. N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996. 408: 1-8.

Sharon N, Lis H. (2004). History of lectin : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*.14. 53R-62R . 11. (Sharon. N., Lis. H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 2004. 14, 53-62.

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

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

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

Smith, S. G., Mahon, V., Lambert, M. A., and Fagan, R. P. (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 1–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x

Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5, 156–161. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01005-6

SOMERS. W.S., TANG. J., SHAW. G. D., CAMPHAUSEN. R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLex and PSGL-1. *Cell*, 2000. 103: 467-479.

Stahl, J., Bergmann, H., Gottig, S., Ebersberger, I., and Averhoff, B. (2015). *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS ONE* 10:e0138360. doi: 10.1371/journal.pone. 0138360

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

Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., and Actis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149, 3473–3484. doi: 10.1099/mic.0.26541-0

Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., and Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* 154, 3398–3409. doi: 10.1099/mic.0.2008/019471-0

Tipton, K. A., and Rather, P. N. (2016). An ompR/envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J. Bacteriol.* doi: 10.1128/JB.00705-16. [Epub ahead of print].

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

Weber, B. S., Harding, C. M., and Feldman, M. F. (2015a). Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. *J. Bacteriol.* 198, 880–887. doi: 10.1128/JB.00906-15

WEIS. W. I., BRUNGER. A. T., SKEHEL. J. J., WILEY. D. C. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Mol Biol*, 1990. 212: 737-761.

Wright, C. S. Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ Agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* 141, 267–291 (1980).

# Annexes

## Annexe 1 : Milieux de culture

### Milieu Gélose au sang

Mélange spécial de peptones.....	23 g
Amidon .....	1 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Agar .....	10 g
Sang .....	50 mL
pH = 7,3	

### Milieu Mac Conkey

Peptone .....	20,0 g
Sels biliaires n°3 .....	1,0 g
Cristal violet .....	0,001 g
Lactose .....	10,0 g
Rouge neutre .....	0,05 g
Chlorure de sodium .....	5,0 g
Agar .....	15,0 g
Eau distillée .....	qsp 1 L
pH = 7,1	

### Milieu Bouillon d'infusion de cœur de cerveau

Protéose-peptone .....	10,0 g.
Infusion de cervelle de veau .....	12,5 g.
Infusion de cœur de bœuf .....	5,0 g.
Glucose .....	2,0 g.
Chlorure de sodium .....	5,0 g.
Hydrogénophosphate de sodium .....	2,5 g.
pH = 7,4	

### Milieu LB (Luria Bertani)

Tryptone .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Na Cl.....	10g
Eau distillé .....	1000 ml
pH=7.5	

### Facteur de colonisation antigènes (CFA)

Acide aminé gazeux .....	10g/l
Extrait de levure .....	1,5 g/l
Mg SO4.....	0,5%
MnCl2.....	0,005%

**Milieux BHAL**

Cong-Red Agar .....0,08%(p/v)  
Saccharose ..... 5%

**Annexe 2: Tampons**

**Tampon PBS 0.01 M**

NaCl ..... 8 g.  
KClO.....20 g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....15 g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....20 g.  
Eau distillée.....1000mL.  
pH 7.2

**Annexe 3: Préparation de NaCl**

NaCl ..... 0,9  
Eau distillée ..... 0,1 L



## Annexe 04 : Dosage des protéines (Bradford, 1976)

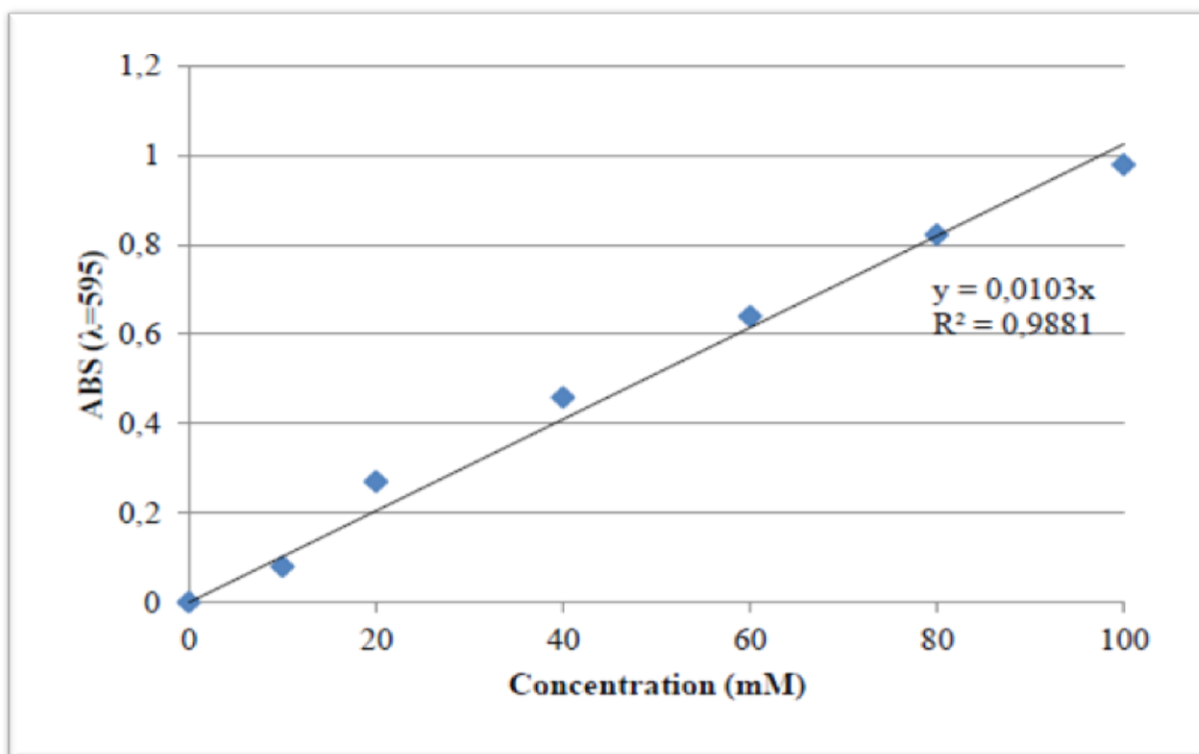
### Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G-250 ..... 100 mg.  
Ethanol absolu .....50 mL  
Acide phosphorique à 85%.....100 mL.

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

### Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/1mL) selon les quantités suivantes : 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 100µl. Après addition de 3ml du réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc. Les concentrations protéiques des extraits seront déduites à partir de cette courbe d'étalonnage.



## Annexe 05 : Tableau très simplifié de saturation du sulfate d'ammonium (4°C, pH 7)

Ils ont utilisé du sulfate d'ammonium à 50% de saturation et incubée pendant 4 heures, puis centrifugé à 12000g pendant 10 minutes.

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.

**Annexe 06 : L'article scientifique (Alyousef *et al.*, 2018)**

Article type : Original Article

**Title**

Isolation and characterization of lectin with antibacterial, antibiofilm and antiproliferative activities from *Acinetobacter baumannii* of environmental origin

**Short Title**

Characterization of lectin from bacteria

**Abdullah A. Alyousef<sup>1</sup>, Abdulaziz Alqasim<sup>1</sup>, Mustafa sawsan aloahd<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Sciences, College of Applied Medical Sciences, King Saud University, P.O. Box 10219, Riyadh. 11433, Saudi Arabia

<sup>2</sup>Visiting Scholar, College of Life Science, Maulana Azad College of Arts and Science, Aurangabad, India.

**Corresponding author**

Mustafa sawsan aloahd

College of Life Science,  
Maulana Azad College of Arts and Science  
Aurangabad, India.  
Mail malmutairik@gmail.com

Accepted Article

**Abstract****Aims**

Lectin is a non-immunogenic glycoprotein, have been extracted majority from the plant source primarily leguminosae. Its ability to precisely recognize and bind to the complex cell bound structure to enable it playing diverse roles. In this study, we obligated to define new sources of lectins since the production of lectins is very expensive. Therefore, we performed a study with the goal to isolate and characterize lectin from bacteria of plant origin and screen its ability as an antibacterial, antibiofilm and antiproliferative agent.

**Methods and results**

We investigated isolates of environmental origin for their ability to produce lectin using phenotypic and molecular detection. The lectine was purified from an isolates AB119 which has abundant lectin activity and its molecular weight was determined by SDS-PAGE and HPLC. This lectin has a molecular weight of 30kD and used to evaluate its antimicrobial, antibiofilm and antiproliferative activities using earlier published protocols. All bacterial isolates tested in this study showed the ability to produce biofilm which was inhibited in presence of lectin significantly. In microtiter plate assay the scale of biofilm inhibition by the purified lectin was significantly reduced for all bacterial species. Lectin inhibited the growth of all three tested bacteria species after treatment for 24 h and this antimicrobial effect was uniform to all species irrespective of gram positive or gram negative. The antiproliferative effects of lectin against HeLa cells were determined using MTT assay showed significant inhibitory effects on the proliferation at an IC<sub>50</sub> of 10  $\mu$ M for 24 hours.

**Conclusion**

This study concludes that lectin has a promising application as an antimicrobial and, antibiofilm agent to control multidrug resistant pathogen-associated infections. Same time it

has also promising ability to control the proliferation of tumour cell as evident by our study results.

#### **Significance and Impact of study**

AB119 lectin from *A.baumannii* species was verified for its capability to control microbial growth and its biofilm formation. Results showed lectin was able to reduce grow as well biofilm formation of both grams positive and gram negative bacterial species. Lectin has a promising application as an antibiofilm agent to combat the growing number of multidrug drug resistant pathogen-associated infections.

**Key words:** *lec* gene, *Acinetobacter baumannii*, antibacterial, antibiofilm agent, Antiproliferative, Bioactive compound

#### **Introduction**

Lectin is a non-immunogenic glycoprotein, a class of non-covalent carbohydrate-binding proteins possessed at least one non-catalytic domain. It exhibits reversible binding to specific monosaccharides or oligosaccharides. Lectins have been extracted from the various source and broadly distributed in various plants, animals, microorganisms, and edible fungi (Lis and Sharon, 2003); however, the vast majority of lectin types have been derived from leguminosae. Of various sources, lectins have been found to have highly homologous to the seed lectins. Its ability to agglutinate erythrocytes, it was initially called hemagglutinin or agglutinin (Lis and Sharon, 1973). A particular type of lectins has been used for blood group typing as they bind specificity to blood group particular positive groups. Lectin has the ability to precisely recognize and reversibly bind to complex carbohydrate structures may be soluble or cell bound, therefore, it plays diverse roles in numerous biological processes including cell to cell interaction, ligand-receptor signaling or cellular activation (Benito *et al.* 2004).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Literature has shown its ability to own anticancer properties *in vitro* as well as *in vivo* studies; It causes cytotoxicity, apoptosis, and inhibition of tumor growth via specially binding to cancer cell membranes or their receptors (Yan *et al.* 2009; Chen *et al.* 2009; Fang *et al.* 2010), though their uses as therapeutic agents is under research. It also interfere in the immune system by altering interleukins production, activating certain protein kinases, modify the cell cycle, inducing cell cycle arrest and apoptosis via disruption of caspase cascade (Weis *et al.* 1998). Research done till date is very evident to prove that it has unique chemical properties which can be utilized in several fields such as pharmacology, cancer research, immunology and molecular biology.

Such wide range of potential uses obligate to define new sources of lectins since the production of lectins is very expensive. Despite all research describing its biochemical, structural and functional aspect, many questions regarding their role in the prokaryote bacterial kingdom still endure open. Here we performed a study with the goal to isolate and characterize lectin from bacteria of plant origin and screen its ability as an antibacterial, antibiofilm and antiproliferative agent.

#### Materials and Methods

##### Sample material and Bacteriological analysis

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2h-tetrazoliumbromide (MTT) were obtained from Sigma Chemical (St Louis, USA). Different bacterial species for antibacterial and antibiofilm assay were used from our stock collection. The human cancer cell line (cervical cancer cell line (HeLa) were used for the antiproliferative assay.

Various plants parts mainly the leaf from environmental sources of the nearby region were collected during the study period and sent to the microbiology laboratory for routine

Accepted Article

microbial culture based identification of microorganism. Samples were emulsified in Phosphate buffer saline (PBS) and shaken well to deattach the microbes from sand. From suspension, 10 $\mu$ L of PBS was plated on different culture plate includes blood agar, MacConkey agar and brain heart infusion broth which were incubated at 37°C for 24-36 hours. The colonies grown on plates were observed for morphological characters and individual distinct colonies were presumptively identified using API 20E biochemical kit as per standard laboratory protocol. Identification of each isolate was confirmed by Vitek 2 system using Vitek GNI card (bio Mérieux, France) according to the manufacturer's instructions.

#### **Phenotypic and molecular detection of lectin**

Conventional polymerase chain reaction was performed to detect the presence of lectin gene in individual isolates. A single colony was selected as template for PCR directly in reaction mixture ( MilliQ water 38  $\mu$ l, 10X Reaction buffer -5.0 $\mu$ l(1x), dNTP's mix(10mM)-1  $\mu$ l(200 $\mu$ M), Taq DNA polymerase 1  $\mu$ l(1U/Reaction) and lectin primer as provided in table 1. The contents were mixed and placed in to the thermal cycler (M.J. Research – 150 minicyler). The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis in 1% agarose gel and 100 bp DNA ladder (Kapa, south Africa) and visualized under UV light.

The phenotypic quantitative screening of lectin was performed using microtiter plate as described before. In brief; diluted suspension (100  $\mu$ l) of each individual pure culture bacterial isolate with 0.02M PBS (pH 7.2) was mixed with 3% suspension of human erythrocytes (O<sup>+</sup>; 100  $\mu$ l) in a microtiter plate and was incubated at 37°C for 2-4 hours. The activity was expressed in Hemagglutination Units (H.U.); which is defined as the inverse of the highest dilution which shows agglutination (Lotan *et al.* 1975).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

#### Extraction and purification of Lectin

From the study isolate we selected AB119 which was found to have abundant of lectin activity and identified as *Acinetobacter baumannii*. The selected AB119 isolate was grown on colonization factors antigens (CFA) medium (gasamino acid, 10g/l; Yeast extract, 1.5 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0.05 %; MnCl<sub>2</sub>, 0.005 %, at 37°C for 24-36 hours. Bacterial cells were harvested by centrifugation at 6000 rpm for 30 mins, washed thrice and re-suspended in 0.05 M PBS (pH 7.2). The cells were disrupted using sonication (40 hz, 30%) for 20 mins at 4°C. The supernatant was collected by centrifugation at 6000 rpm for 20 mins and used to establish the hemagglutination activity of lectin.

The lectin was purified according to earlier published protocol with slight modification (Hua *et al.* 2010) Further protein precipitation was performed using ammonium sulfate with 50% saturation and incubated for 4 h and then centrifuged at 12,000 g for 10 min. Obtained crude protein extracts were dialyzed which was loaded to a DEAE-Sepharose column (2.5x10 cm) previously equilibrated and washed with 0.01 M PBS (pH 8.0). The elutes were obtained with the same buffer using a gradient of NaCl (0.1–0.5 M) at the flow rate of 1 ml/min. Different fractions were collected and checked for their hemagglutinating activity. All fraction of lectin activity was and loaded to a CM-Sepharose cation-exchange column (2.5x10 cm). The elutes were again checked for hemagglutinating activity and active fractions were together. Pooled sample was dialyzed again with 0.01 M PBS and subjected to a Sephadex 75 10/300 GL column (pre-equilibrated with 0.01 M PBS; pH 7.2). The elutes were obtained using 0.1–0.5 M NaCl in the 0.01 M PBS, at a flow rate of 1 ml/min.



#### Estimation of protein content and molecular weight

The protein concentration of purified fraction was determined using the standard Bradford assay (Bradford 1976), with bovine serum albumin, at a dilution of known concentration, as the standard. The molecular size of the purified lectin eluted from the Sephadex G-150 column was determined by SDS-PAGE under reducing conditions in a 10% gel. The molecular masses of the proteins were determined using high- and low-molecular-weight markers (Sigma-aldrich, Germany).

#### Screening of antibiofilm activity of lectin

Different bacterial isolates of clinical origin including Gram positive *Enterococcus faecalis* and Gram negative *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* were cultivated on Brain Heart Infusion Agar (BHAI) (Difco) containing 0.08% (w/v) Congo red (Sigma-Aldrich, Germany); 5% (w/v) sucrose (Dinamica, SP, Brazil). The inoculated was done in streaks and incubated at 37 °C under aerobic conditions upto 36 hours. The biofilm producer formed black colonies, while the non-biofilm producer strains formed red colonies. Bacterial isolates were cultivated in duplicate on BHAI supplemented additionally with purified lectin. The purified lectin was tested for its ability to inhibit biofilm formation by all biofilm-producing bacteria mentioned below.

The microtiter plate method was followed semi-quantify the biofilm forming ability of bacterial isolates as mentioned in the previous assay according to the protocol described elsewhere (Kaliarasan *et al.* 2017). In brief, the overnight pure culture of each individual strain was inoculated in 200ul of BHAI in Microtiter plate and then incubation at 37°C for 24-36 hours. After prescribed time period plate was shaken to detached the individual colonies out in the liquid and plate was washed thrice with PBS followed by pipetting the slowly to remove the liquid without disrupting the biofilm. Plates were air-dried in an

incubator at 37°C for 15 min and then air-dry for 15 min. all the wells were stained with 1% of Crystal violet for 5 min followed by washing in PBS to get rid of the unwanted stain. The stained biomass in the well was solubilized with 250ul of 30% Glacial Acetic Acid for 10 min and the absorbance of stain was measured at 595 nm. A duplicate assay was performed and the purified lectin was added to the growth medium at the time of inoculation and assay was continued as mentioned above. All the assay were performed in triplicate and the average of each was used for results calculation and statistical evaluation.

#### **Antibacterial activity assay**

Bacterial isolates as mentioned above used to determine the antibacterial activity of purified lectin. Isolates were cultured and incubated in a rotary shaker with agitation in Luria – Bertani broth at 37°C for overnight. The antimicrobial activities of the lectin were determined using the microdilution assays as described by Park et al (Park *et al.* 2007).

#### **Antiproliferative activity assay**

MTT assay was used to detect cell proliferation and survival using HeLa cancer cells in the logarithmic growth phase ( $5 \times 10^4$  cells/ml). Actively growing cells were seeded ( $5 \times 10^3$  cells/well) independently in a 96-well plate with a final volume of 200  $\mu$ l/well and a blank control group was cultured in DMEM. A duplicate assay was performed supplemented with purified lectin. These plates were incubated at 37°C for 24-36 h. At prescribed time period media of cell cultures were discarded. To that 50  $\mu$ L. of serum-free media and 50  $\mu$ L. of MTT solution was added to each well and further incubated at 37°C for 3 hours. After incubation, 150  $\mu$ L. of MTT solvent (glacial acetic acid) was added to each well. The plate was wrapped in foil and shaken well using an orbital shaker for 10-15 minutes. Absorbance was read at OD590 nm within 1 hour.

## Results

### Bacterial species identification

From the collected plant's samples from environmental sources, only seven isolates showed the hemagglutination activities (**figure 1**). In PCR results, all seven isolates were showing the presence of *lec* gene with atomic size 625 bp (**figure 2**), however, these isolates in the quantitative analysis showed different *lec* gene activity. Among that one AB119, isolate was having potent and abundant lectin activity. The phenotypic identification of *A. baumannii* AB 119 was done by Vitek 2 system and was confirmed by molecular recognition relying upon sequencing of 16rRNA. The presence of lectin gene was found to be in all three isolates, therefore, these results were in agreement with the phenotypic results in the quantitative investigation.

### Isolation, purification, and characterization of lectin

The lectin was purified from the culture AB119 grown in Colonization Factors Antigens (CFA) medium. AB119 was used to harvest the lectin and precipitation was done using ammonium sulphate in gradually increasing concentration. The ammonium sulfate, with 30-80%, has been used for the purpose of lectin precipitation. At a concentration of 75-80 % of ammonium sulphate, the hemagglutination activities were found to be maximum for AB119 (**figure 3**). The molecular weight of purified lectin was found to be 30 kD in SDS-PAGE (**figure 4**). Further the HPLC results confirmed the *m/z* value of purified lectin to be 29.91 (**figure 5**).

#### **Antibiofilm activity of lectin**

The antibiofilm activity of lectin AB 119 was evaluated on different bacterial genera and was found that lectin efficiently affected the biofilm activity of these tested bacterial isolates. In Congo-Red Agar medium, all bacterial isolates showed the ability to produce biofilm which was inhibited in presence of lectin and colour was remain same as pink or pale grey colonies indicated no biofilm production when lectin was supplimeted in medium (**Figure 6**). The color of growing colonies was pink or pale grey colonies and these results refer to a loss in the ability to form biofilms and non-slime layer on the surface of the medium (**figure 6**). In microtiter plate assay, the scale of biofilm inhibition by the purified lectin was significant and the biofilm formation ability was significantly reduced for all bacterial isolates as shown in **figure 7**.

#### **Antimicrobial activity**

Lectin inhibited the growth of all three tested bacteria species after treatment for 24 h (**Figure 8**; **Table 2**), and this antimicrobial effect was uniform to all species irrespective of gram positive or gram negative.

#### **Antiproliferative activity**

The antiproliferative effects of lectin against HeLa cells were determined using MTT assay (**Figure. 9**). Lectin showed significant inhibitory effects on the proliferation at an IC<sub>50</sub> of 10  $\mu$ M for 24 h (*P*, 0.05). The inhibition due to lectin was time and concentration dependent pattern for the tested cell lines.

### Discussion

This study was insisted to find a bacterial source for the lectin and the environmental plant sources were screened for the isolation of organism which has lectin activity. Seven bacterial isolates were shown lectin activity in that four were *Acinetobacter baumannii* species. AB119 strain of *A. baumannii* found to produce abundant hemagglutination and though selected for the harvesting of lectin. The lectin was identified from a new bacterial species not reported earlier and purified from an *Acinetobacter baumannii* AB119, which was isolated from plant origin. Lectin is considered as the most virulent component in *A. baumannii* connected with particular saccharides and contribute fundamentally to the microorganisms in getting attached to different surfaces (Brubaker 1985). The maximum precipitation was achieved by ammonium sulphate method at 80% concentration and purification was done by anion-exchange and affinity chromatographies. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed the molecular mass of the lectin as 30,000 Daltons.

The lectin showed both antibiofilm and growth-inhibiting activities against Gram-positive (*E. fecalis*) and Gram-negative (*K.pneumoniae* & *P. aeruginosa*) pathogenic bacteria. Though the study did not check various diverse bacterial species still the efficacy of lectin was significant and further can be evaluated with another microorganism. During biofilm formation, surfaces are colonized by adhesion and biofilm forms multi-layered cell clusters as polysaccharide matrix that plays an important role in bacterial pathogenicity (O'Toole *et al.* 2000). These biofilm polysaccharides protect the microorganism from attack by the human innate immune system (Leid 2009). Biofilm produced by the bacterium was reduced by 20-30% in 24-36 hours after administration of the lectin, which might be attributed to the glycan-binding property of the lectin having an affinity to GlcNAc polymers. This is also the first observation that any bacterial originated lectin prevented biofilm formation of other closely

This article is protected by copyright. All rights reserved.

related bacterial species and, therefore, could have possible applications in clinical microbiology and biomedical science. Our findings show that the lectins may be a natural substitute for antimicrobial agents, and to bring in practice it is required to better elucidate the functional use of these proteins.

It is very known fact that plant-associated bacteria interact via adhesins which are guarded by lectins (Danhorn and Fuqua 2007). Earlier studies have reported the inhibition of motility and multiplication of bacterial pathogens by lectins (Gaidamashvili and van Staden 2002; Karpunina et al. 2003). The various homologs of lectins in clinical and ecological strains has a vital role in attachment and pathogenesis. This may lead to new insights into the possible interaction of plant lectins with human pathogenic micro-organisms. Lectin which functions as an antibiofilm can also be used as surfactant molecule used to modifies the physical characteristics of bacterial cells and abiotic surfaces. Though mechanism to inhibit biofilm was not investigated in this study however one can speculate it functioning through altering gene expression or disrupting signaling molecule that alters the biofilm-forming ability.

A couple of earlier literature has indicated antiproliferative activity of lectin toward cancerous cell lines (Lam & Ng 2010); these include the lectins from various plant sources. Here in this study, we checked the antitumour properties of lectin derived from bacterial origin and possibly it is the first time lectin from microbe was tested for its antiproliferative activity on HeLa cells with an IC<sub>50</sub> of 10.0  $\mu$ M found in vitro. This AB119 lectin showed good efficacy in inhibiting the proliferation can induce the apoptosis of HeLa cells in a concentration dependent manner. Though the pathway to lead apoptosis was not discovered and further studies are required to uncover the detailed mechanisms.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

In conclusion, we have efficiently isolated and characterized AB 119 lectin from a microbial source for the first time. This lectin possesses antibacterial, antibiofilm and antiproliferative activity against HeLa human cancer cells. These findings may contribute to the expansion of an approach for the control of drug resistant pathogens, and could be oppressed pharmaceutically in the treatment.

#### Acknowledgment

The authors also extend their appreciation to Department of Clinical Laboratory Sciences, College of Applied Medical Sciences, King Saud University for us providing the laboratory Facilities to complete the task in the right direction.

#### Conflict of interest

Authors have nothing to disclose.

#### References

- Benito, J. M., Gómez-García, M., Ortiz Mellet, C., Baussanne, I., Defaye, J., & García Fernández, J. M.** (2004). Optimizing saccharide-directed molecular delivery to biological receptors: Design, synthesis, and biological evaluation of glycodendrimer- cyclodextrin conjugates. *Journal of the American Chemical Society*. *126*, 10355-10363.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. *72*, 248-254.
- Brubaker, R. R.** (1985). Mechanisms of bacterial virulence. *Annual Reviews in Microbiology*. *39*, 21-50.

This article is protected by copyright. All rights reserved.



- Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian, H. J., Li, C. Y., & Bao, J. K.** (2009). A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine*. *16*, 352-360.
- Danhorn, T., & Fuqua, C.** (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 401-422.
- Fang, E. F., Lin, P., Wong, J. H., Tsao, S. W., & Ng, T. B.** (2010). A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *58*, 2221-2229.
- Gaidamashvili, M., & Van Staden, J.** (2002). Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of ethnopharmacology*. *80*, 131-135.
- Hou, Y., Hou, Y., Yanyan, L., Qin, G., Li, J.** (2010) Extraction and purification of a lectin from red kidney bean and preliminary immune function studies of the lectin and four Chinese herbal polysaccharides. *BioMed Research International*. 2010.
- Kalaiarasan, E., Thirumalaswamy, K., Harish, B. N., Gnanasambandam, V., Sali, V. K., & John, J.** (2017). Inhibition of quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors. *Microbial Pathogenesis*. *111*, 99-107.
- Karpunina, L. V., Mel'nikova, U. Y., & Konnova, S. A.** (2003). Biological Role of Lectins from the Nitrogen-Fixing *Paenibacillus polymyxa* Strain 1460 During Bacterial-Plant-Root Interactions. *Current microbiology*. *47*, 376-378.



Lam, S. K., & Ng, T. B. (2010). Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*. *17*(6), 457-462.

Leid, J. G. (2009). Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*. *4*, 66-70.

Lis, H., & Sharon, N. A. T. H. A. N. (1973). The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annual review of biochemistry*. *42*, 541-574.

Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D., & Sharon, N. (1975). The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Biological Chemistry*. *250*, 8518-8523.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*. *54*, 49-79.

Park, S. C., Lee, J. R., Shin, S. O., Jung, J. H., Lee, Y. M., Son, H., & Hahn, K. S. (2007). Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. *Journal of agricultural and food chemistry*. *55*, 5277-5281.

Sharon, N., & Lis, H. (1990). Legume lectins—a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*. *4*, 3198-3208.

Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z., Sun, Y., Zhu, L., & Ding, Z. (2009). Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. *Phytomedicine*. *16*, 586-593.

Weis, W. I., Taylor, M. E., & Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological reviews*. *163*, 19-34.

**Legends**

Table 1. The primer used for lectin

Table 2. Antibiotics susceptibility testing with lectin as supplement

Figure 1. Hemagglutination testing of isolates

Figure 2. Gel electrophoresis for *lec* gene (positive results with 625bp amplicon)

Figure 3. Hemagglutination assay in microtiter plate by study isolates

Figure 4. SDS-PAGE of lectin purified from AB119

Figure 5. HPLC *m/z* value of lectin AB119

Figure 6. Biofilm assay using congered plates with or without lectin

Figure 7. Microtiter plate assay for antibiofilm activity testing of biofilm

Figure 8. antimicrobial testing of lectin on pathogen.

Figure 9. Antiproliferative activity of lectin on HeLa cell line

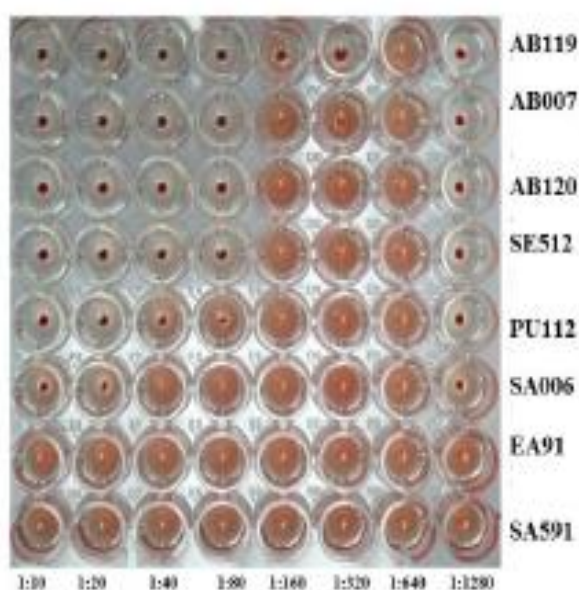
Table 1. Primer details for lectin

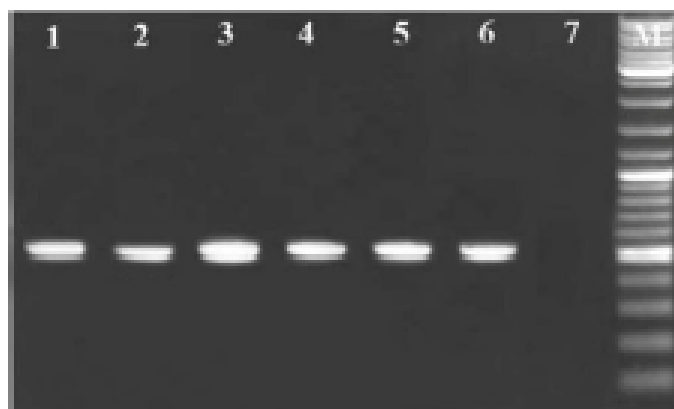
Lectin	Primer
Forward	5'-GGTCTTGTTATGTAAGTCCTT-3'
Reverse	5'-GGCGCATAGTCCTCTATAG-3'

Table 2. Antibiotics susceptibility testing with lectin as supplement

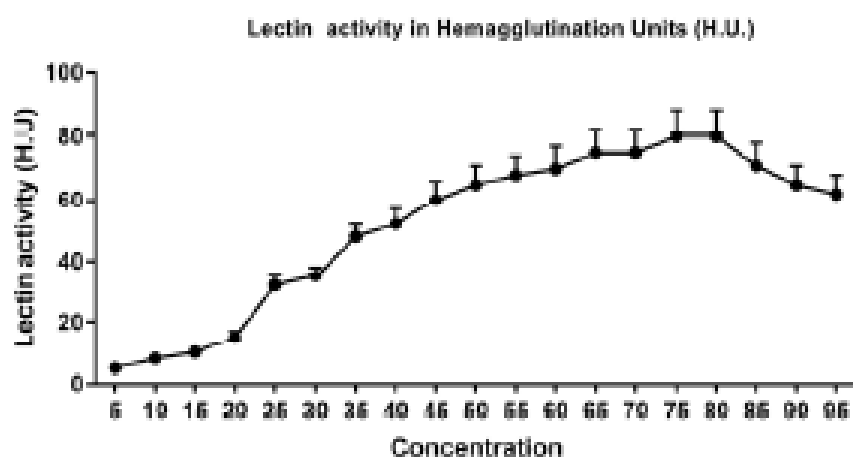
Fraction/Antibiotic	Antibacterial activity in mm		
	<i>E. fecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Crude extract	15.0 ±1.0 <sup>b</sup>	17.0 ±4.0 <sup>b</sup>	15.0 ±3.0 <sup>b</sup>
Purified lectin	22.0 ±2.0 <sup>b</sup>	25.0 ±4.0 <sup>b</sup>	22.0 ±3.0 <sup>b</sup>
Streptomycin (10µl/ml.)	27.02 ± 1.0 <sup>a</sup>	30.0 ±1.0 <sup>a</sup>	27.0 ±1.0 <sup>a</sup>

a-significant; b-slightly significant

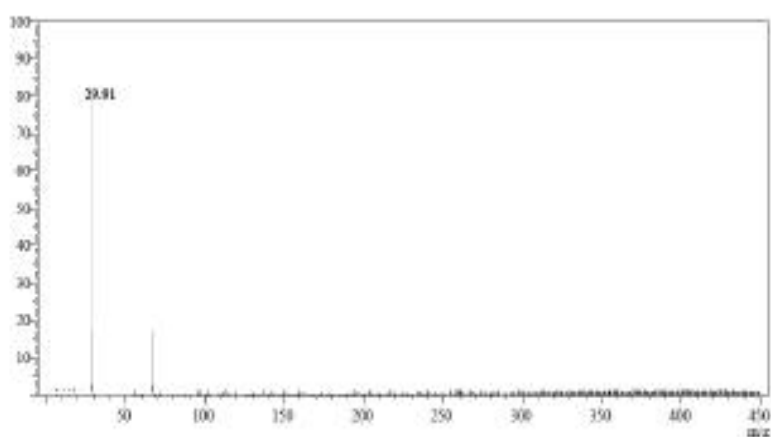
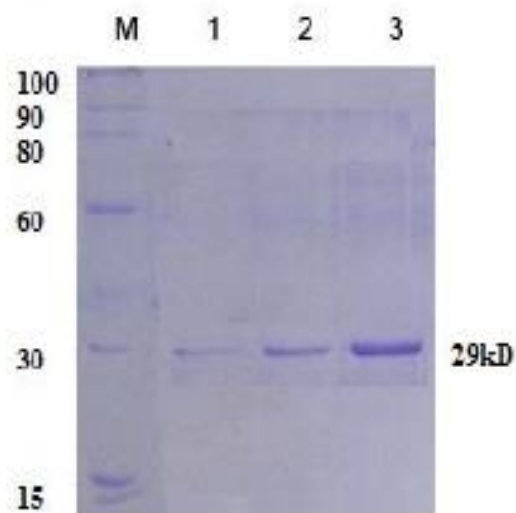


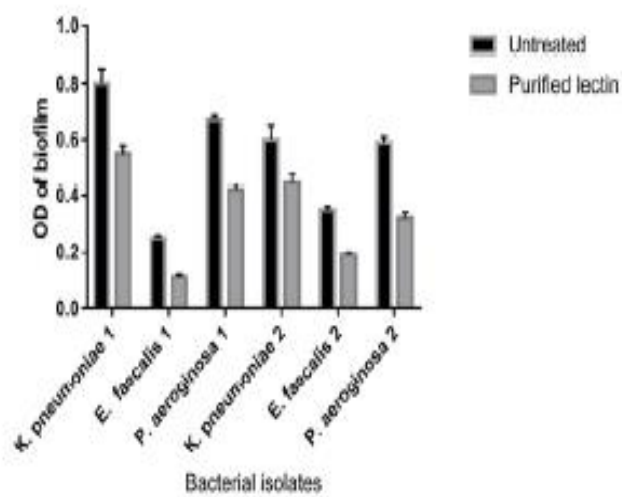
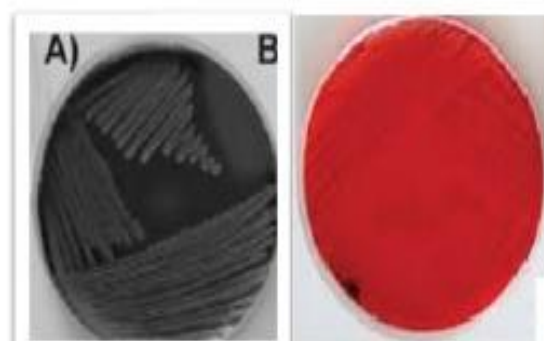


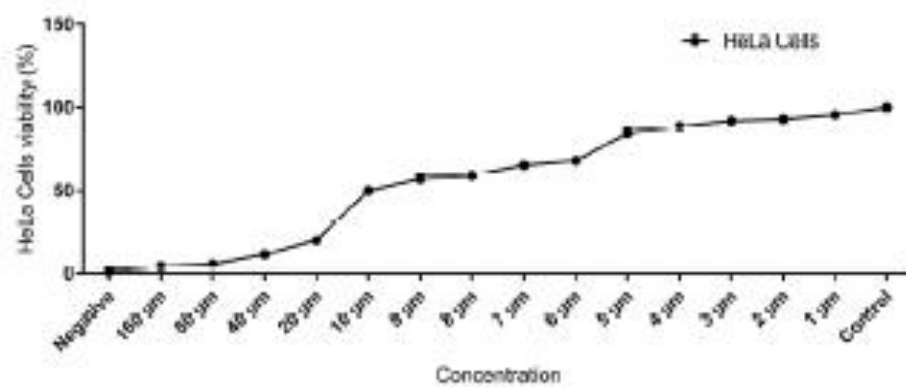
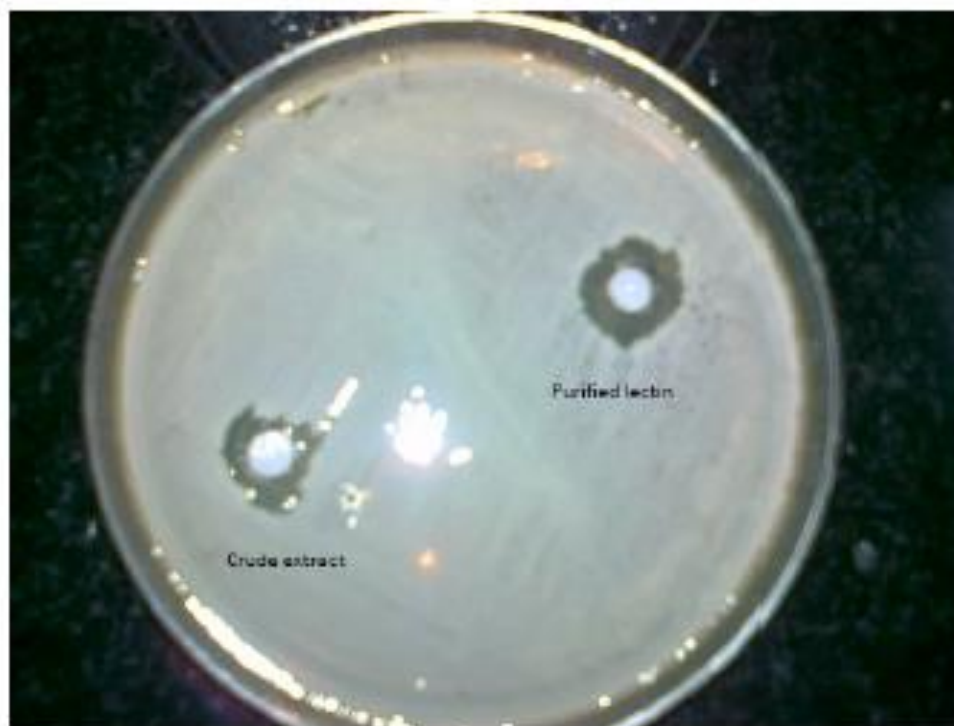
M-Ladder, Lane 1 to 5-samples, 6-Positive control, 7-Negative control



Accepted Article







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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Ecologie microbienne**

### Mise en évidence des lectines produites par *Acinetobacter baumannii*

#### Résumé

Les lectines sont une classe particulière de protéines largement distribuées dans la nature, qui reconnaissent sélectivement et se lient de manière réversible aux glucides et aux glycoconjugués par l'intermédiaire de 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. Le but de ce travail est d'isoler et de caractériser la lectine de bactéries d'origine végétale et de cribler sa capacité en tant qu'agent antibactérien, antibiofilm et antiprolifératif. Les sources d'origines végétales ont été examinées pour l'isolement d'organismes ayant une activité lectine. Pour trouver une source bactérienne pour la lectine. Sept isolats bactériens ont montré une activité lectine. La souche AB119 de *A. baumannii* s'est avérée produire une hémagglutination abondante et bien qu'elle ait été sélectionnée pour la récolte de la lectine et a été retenue. Pour mettre en évidence la production des lectines, de les purifier, de les caractériser et d'étudier leurs activités biologiques. La précipitation maximale a été obtenue par la méthode du sulfate d'ammonium à une concentration de 80 % et la purification a été réalisée par des chromatographies d'échange d'ions et d'affinité. La lectine a été identifiée à partir d'une nouvelle espèce bactérienne non signalée auparavant et purifiée à partir d'une souche *Acinetobacter baumannii* AB119, isolée d'une origine végétale. La lectine est considérée comme le composant le plus virulent de *A. baumannii* lié à des saccharides particuliers et contribue fondamentalement aux Micro-organismes à se fixer à différentes surfaces. Le Sulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-PAGE) a montré que la masse moléculaire de la lectine était de 30 000 daltons. La lectine montre une activité anti-biofilm et inhibitrice de croissance contre les bactéries Gram-positives (*E. Fecalis*) et Gram-négatives (*K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*). Cette lectine a montré aussi une bonne efficacité dans l'inhibition de la prolifération quand elle a été testée pour son activité antiproliférative sur des cellules HeLa avec un taux d'alcoolémie de 1,5 % avec une IC50 de 10.0 µM trouvée in vitro.

**Mot clés :** *Acinetobacter baumannii*, lectines, glycoconjugués, hémagglutination, purification, Activité antimicrobienne, activité antiproliférative, activité anti-biofilm

**Membre du jury :** Présidente du jury : ABDLAZIZ Wided (MC.B - UFM Constantine 1).

**Rapporteur :** BOULAHROUF Khaled (MC.B- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** MAZIANI Meriem (MC.B.- UFM Constantine 1).

**Présentée par :** Abderzak Sara  
Betchim Nouha

**Année universitaire :** 2020-2021



