

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° D'ordre :

N° De série :

Université des Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences
Option : Biochimie

Intitulée :

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

Présentée et soutenue par : **ZITOUNI Abdelbaki**

Membres du Jury :

Président du jury : Mr. KHELIFI D. Prof. Université des Frères Mentouri

Encadreur : Mr. NECIB Y. Prof. Université des Frères Mentouri

Examineurs : Mr. ABDENNOUR C. Prof. Université Badji Mokhtar-Annaba

Mr. SAKA S. Prof. Université Badji Mokhtar-Annaba

Mr. KHENNOUF S. Prof. Université Ferhat Abbès -Sétif

Mr. BENSEGUENI A. Prof. Université des Frères Mentouri

Année universitaire
2014/2015

REMERCIEMENTS

Une période de ma vie s'achève, et une autre page se tourne, et celles qui me restent ne sont pas les plus faciles à vivre et à écrire. Pendant ces quatre années, on pense à ce que l'on va dire afin de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de cette étape essentielle qu'est le doctorat.

Je m'excuse d'avance pour tout oubli, mais l'âge ainsi que les premières rides sont des ennemis difficiles à combattre.

Soutenir un travail scientifique devant ses pairs est l'aboutissement essentiel et indispensable de toute recherche ; et la critique de ce manuscrit lui donne un sens plus particulier. Je tiens à remercier très sincèrement les Professeurs ABDENNOUR Cherif et SAKA Saad de l'Université Badji Mokhtar de la ville d'ANNABA, le Professeur KHENNOUF Seddik de l'Université Ferhat Abbès de la ville de SETIF , ainsi que le Professeur BENSEGUENI Abderrahmane, de l'Université des Frères Mentouri , pour avoir accepté de juger ce manuscrit ; le Professeur KHELIFI Douadi pour la Présidence de ce jury, et essentiellement le Professeur NECIB Youcef pour son rôle important d'encadreur, et qui m'a permis de découvrir ces LECTINES, protéines qui aiment paraître les sucres.

Ce travail n'aurait probablement pu ne jamais aboutir sans la chance que j'ai eu le jour où j'ai été invité à travailler aux côtés du Docteur Anne Imberty, directrice de l'équipe de Glycobiologie Moléculaire, du Docteur Soorej M Basheer avec qui j'ai fait en partie ce travail, et du Docteur Annabelle Varrot qui m'a beaucoup aidé en fin de parcours, et ceci dans des conditions de travail exceptionnelles au sein des laboratoires de l'unité de Glycobiologie du CERMAV de Grenoble.

Je souhaite remercier toute cette Communauté de scientifiques du CERMAV qui m'ont facilité la vie.

Pour finir, merci à toute ma famille et à mes parents que j'aime beaucoup.

RESUME

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, polyvalentes et d'origine non immunitaire, qui se lient de manière réversible et spécifiquement aux hydrates de carbone. Elles sont souvent multivalentes et possèdent la capacité bien connue d'agglutiner les érythrocytes.

Les champignons, y compris les champignons microscopiques et levures, ont fait l'objet d'un vif intérêt ces dernières années en raison de leur potentiel biomédical et leurs applications biotechnologiques. Les informations sur les lectines fongiques, particulièrement du point de vue structurel, sont minimales par rapport à celles de leurs homologues végétales et animales. C'est dans ce contexte que se situe notre objectif qui s'est concrétisé par la caractérisation biochimique et structurale de la lectine fongique *Terfezia boudiéri* (Truffe du Sahara Algérien) sur laquelle nous n'avions auparavant aucune donnée de ce type .

Deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 ont été extraites, purifiées, caractérisées et séquencées.

Les structures en 3D de la protéine native de TrFBL1 et de son complexe avec un ligand, le sélénométhyl fucoside ont été obtenues et sont en cours d'affinement .Les structures des complexes de TrFBL2 avec le N-Acétyleglucosamine et deux autres glycanes ont été obtenues à haute résolution.

Le Génome de *Terfezia boudiéri* a été obtenu et est disponible depuis le mois de Décembre 2013, et fera désormais partie de la Base de données recueillies dans Lectin 3D(<http://lectin3d.cermav.cnrs.fr>).

Mots Clés : Lectines, Extraction, Purification, Agglutination, Activité phagocytaire.

ملخص :

اللكتينات عبارة عن بروتينات أو جليكوبوتينات متعددة المصادر و الأدوار و من مصدر غير مناعي. ترتبط مع السكريات حيث تتميز بخاصية التراص مع كريات الدم الحمراء.

أصبحت الفطريات ' بما فيها الفطريات المجهرية و الخمائر كثيرة الاستعمال في المجالات الطبية و البيوتكنولوجيا في السنوات الأخيرة.

لحظ بأن المعلومات الخاصة بصيغ لكتينات الفطريات قليلة مقارنة مع لكتينات النباتات و الحيوانات ' لهذا السبب كان الهدف للبحث الذي قمنا به يتمثل في توضيح الخصائص الكيميائية و صيغة لكتين *Terfezia bouderei* (ترفاس أبيض بالصحراء الجزائرية) بحيث لم تكون لدينا معلومات سابقة أي معلومات سابقة عن هذا النوع من الفطر.

تم استخلاص ' تنقية ' دراسة الخصائص و تتابع الأحماض الأمينية لنوعين من اللكتينات :

TrFBL1 و TrFBL2 . كما تم دراسة الصيغ ثلاثية الأبعاد للبروتين الأصلي أي الموجود في صورته الطبيعية بالنسبة للكتين

TrFBL1 و صورته المعقدة مع المركب Seleomethyl fucoside تم الحصول عليهم و لا زالت الدراسات مستمرة.

أما بالنسبة لصيغة ال TrFBL2 مع ال N-Acetylglucosamine تبين وجود مركبين من الجليكان ذات درجة عالية من النقاوة.

الجين الخاص بال *Terfezia bouderei* تم الحصول عليه ابتداء من شهر ديسمبر 2013

تم وضعها في الموقع :

3D(<http://lectin3d.cermav.cnrs.fr>).

الكلمات المفتاحية : استخلاص ' تنقية ' اللكتينات ' تراس ' نشاط الخلايا البالعة.

Abstract:

Lectins are ubiquitous, polyvalent and non immune origin which bind specifically and reversibly to carbohydrates. They are often multivalent and have the well-known ability to agglutinate erythrocytes.

Fungi, including microscopic fungi and yeasts, have been the subject of considerable interest in recent years because of their potential biomedical and biotechnological applications. The information on fungal lectins, especially the structural point of view, are minimal compared to those of their plant and animal counterparts. It is in this context that lies our purpose was realized by the biochemical and structural characterization of fungal lectin *Terfezia boudieri* (Algerian Sahara Truffle) on which we previously had no such data.

Two lectins: TrFBL1 and TrFBL2 were extracted, purified, characterized and sequenced. The structures of 3D TrFBL1 native protein and its complex with a ligand, fucose sélénométhyl were obtained and are being refined .The structures of TrFBL2 complexes with N-acetylglucosamine and two other glycans were obtained at high resolution.

The Genome of *Terfezia boudieri* was obtained and is available from the month of December 2013 and will become part of the database collected Lectin 3D (<http://lectin3d.cermav.cnrs.fr>).

Key Words : Lectins, Extraction, Purification, Agglutination, Activity Phagocytic Cells.

Liste des figures

N°	Légende	Page
01	Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.	10
02	Représentation graphique d'un monomère de concanaviline A de <i>canavaliensiformis</i> en complexe avec le trimannoside	11
03	Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique	12
04	Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4	14
05	Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb)	15
06	La truffe, Champignon souterrain en forme de tubercules	27
07	Principe du Glycan array	39
08	Principe du printed array	40
09	Diagramme de phase décrivant le processus de cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur.	54
10	Technique de la goutte suspendue par diffusion de vapeur	54
11	A. Modèle de cristal en trois dimensions. B. Représentation mathématique du cristal. C. Maille élémentaire avec les six paramètres la caractérisant.	56
12	Hémagglutination des érythrocytes de lapin par la lectine de <i>Terfezia boudieri</i> (-) contrôle sans lectine, (+) contrôle avec lectine	62
13	Chromatographie d'affinité sur colonne de Mannose-Agarose (1.5cmx5cm).	63
14	Profil d'élution de l'homogénat après la chromatographie d'affinité sur gel d'agarose à N-acétylglucosamine(1.5cmx5cm).	64

15	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec 15% de gel, , des sept (07) fractions retenues de TbFBL1 .	65
16	SDS-PAGE (15%) de gel montrant le profil de migration de TrFBL1 en conditions dénaturantes et non dénaturantes.	66
17	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec 15% de gel, des six (06) fractions retenues de TbFBL2	67
18	SDS-PAGE (15%) de gel montrant le profil de migration de TrFBL2 en conditions dénaturantes et non dénaturantes.	68
19	Test d'hémagglutination de TrFBL1 en présence de cinq sucres simples (Fucose,N-acétylglucosamine, Mannose, Lactose, et Galactose)	69
20	Test d'hémagglutination de TrFBL2 en présence de sept sucres simples (Fucose,N-acétylglucosamine, Mannose, Lactose, Galactose , acide Sialique et N-Acétylgalactoamine)	70
21	Spectre de masse Maldi TrFBL1 (32kDa)	70
22	Spectre de masse Maldi de TrFBL2 (15.5kDa)	71

N°	Légende	Page
23	Electrofocalisation de TrFBL1 sur gel de polyacrylamide de Biorad (pH 3-10).	72
24	Electrofocalisation de TrFBL2 sur gel de polyacrylamide de Biorad (pH 3-10).	73
25	Profil de fluorescence d'une protéine .	75
26	Profil des cinétiques de dénaturation de TrFBL1 et TrFBL2.	75
27	Ligand qui à permis de maximiser la stabilité de TrFBL1.	76
28	Ligand qui à permis de maximiser la stabilité de TrFBL2.	76
29	Profil de dispersion explicatif pour deux solutions protéiques différentes.	77
30	Spectre de Fluorescence de TrFBL1	79
31	Spectre de Fluorescence de TrFBL2	80
32	Digestion de TrFBL2 utilisant de la trypsine (A) et de la proteinase K (B).	83

33	La cristallisation des protéines par la méthode de la goutte suspendue (Protocole)	86 à88
34	Cliché de Diffraction de TrFBL2 obtenu par Diffraction aux Rayons X	93
35	Effet de <i>terfezia.boudiéri</i> sur l'index phagocytaire	106
36	Effet de <i>terfezia.boudiéri</i> sur la demie-vie	107

Liste des tableaux

N°	Légende	Page
01	historique et propriétés des lectines les plus connues	08à09
02	Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines	12
03	Lectines bactériennes solubles	16
04	Lectines de champignons connues	17
05	Récapitulatif du rôle des différentes lectines dans le monde vivant	19
06	Spécificité osidique de certaines plantes à lectines	20-21
07	lectines importantes	22-23
08	Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical	24-25
09	Résultats des puces à sucres de la lectine TrFBL1	81
10	Résultats des puces à sucres de la lectine TrFBL2	82
11	Conditions optimisées à partir d'un criblage sur la plateforme de cristallisation de l'EMBL grenoble, pour TrFBL1 et TrFBL2.	89
12	Résultats obtenus avec L' ANOVA de l'index phagocytaire par rapport aux lots	106
13	Résultats obtenus avec L' ANOVA de la demi-vie par rapport aux lots	107

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analysis of variance

AP : anchor(adapter) primer

ARNm : Acide ribonucléique messenger

cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Céramide= (Sphingosine lié à un acide gras)

CFG: Consortium for Functional Glycomics

Code PDB :Protein Data Bank

ConA : Concanavaline A lectin

DLS: Dynamic light Scattering

dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate (mélange des 04 bases A ,T, C ,G)

DTT: Dithio-Threitol

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA :Acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent assay

ELLA : Enzyme-linked lectin assay

ESRF: European Synchrotron Radiation Facility

ETEC : E.Coli entérotoxicogénique

Fuc : L-fucose

Gal, GalNAc : D-galactose, N-acethylgalactosamine

Gal: galactose

Gb3 : Globotriaosylcéramide=ganglioside dont la structure est α Gal- β Gal- β Glc-céramide.

Glc, GLCNAC : D-glucose, N-acétylglucosamine

GM1 ,2 :Mono-sialoganglioside1,et2

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.

HIV : human immunodeficiency virus

IEF : Isoelectric focussing

KDa : kilo Dalton

MALDI : Matrix-assisted laser desorption/ionization

Man : D-mannose

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

PA, PA-IL et PA-IIL: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* lectin I et II

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

Pb : paire de bases

PBS : phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

pI : Point isoélectrique

RACE :amplification rapide d'extrémités d'ADNc

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends

Responsable de l'interaction avec le récepteur du sucre)

RIP :Ribosom Inactivating Proteine

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

SDS-PAGE :sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

T_m :Température de fusion

TOF :Time-Of-Flight

TrFBL1 et 2 :Terfezia Boudieri Fruiting Body Lectin1 et 2

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

TSA: Thermal Shift Assay

UH : unité d'hémagglutination

αGalNAc1-3GalNAc : Antigène Forssman

3-D : Trois dimensions

Sommaire

1. INTRODUCTION :	14
Objectif de notre travail :	16
2. Généralités sur les lectines	17
2.1. Définition des lectines	17
2.2. Historique	18
2.3 Structure des lectines :.....	21
2.3.1 Les lectines simples.....	21
2.3.2 Les lectines en mosaïque :	23
2.4 Classification des lectines :	23
2.5 Les lectines présentes chez les plantes :.....	24

2.5 .1 Les Mérolectines :	24
2.5.2 Hololectines :	24
2.5.3 Les Chimérolectines :	24
2.6 Les lectines des microorganismes :	24
2.6.1 Les lectines bactériennes :	25
2.6.2 Les lectines fimbriales.....	25
2.6.3 Les toxines.....	26
2.6.4 Les lectines solubles.....	26
2.7. Les lectines de champignons.....	28
2.7.1 Caractéristiques	29
2.7.2 Rôles.....	29
2.8 Role des lectines dans les organismes vivants	29
2.9. Spécificité des lectines :	31
2.10. Propriétés Biologiques des lectines :	32
2.10.1 Liaison avec les sucres	32
2.10.2 Activité mitogène	32
2.10.3 Actions antivirales.....	32
2.10.4. Autres propriétés	33
2.11. Agglutination cellulaire.....	33
2.12. lectines les mieux connues:.....	33
2.13. Utilisation des lectines	34
2.13.1 Dans le domaine biomédical	34
2.13.1.1 En Hématologie :.....	34
2.13.1.2 En Immunologie :.....	34
2.13.1.3 En Biologie Cellulaire/.....	35
2.13.1.4 En Cancérologie :.....	35
2.13.2 Dans le domaine agronomique.....	36
2.14. Le Système Immunitaire et l'Immunostimulation :	36
2.15. Intérêt des lectines pour l'homme	37
3. généralités sur le champignon utilisé :	38
4. Matriels et méthodes:.....	31
4.1 Fractionnement des proteines.....	43
4.2Sonication :.....	44
4.3Dosage des protéines	44
4.4Tests d'hémagglutination :.....	45
4.5 Purification par le système FPLC (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>).....	46
4.6 Chromatographie d'Affinité sur colonne de Mannose :.....	46

4.7	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS).(15% d'acrylamide)	46
4.8	Chromatographie d’Affinité sur colonne de N-Acétyl glucosamine	47
4.9	Concentration et Dialyse des fractions renfermant nos lectines :	47
4.10	Filtration sur colonne renfermant un gel de type Toyopearl55F :.....	47
4.11	Tests d’inhibition de l’hémagglutination de la lectine TrFB en présence de sucres :.....	48
4.12	Thermal Shift Assay (TSA) :Plateforme de criblage de thermostabilité des protéines par fluorescence.....	48
4.13	Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)	49
4.14	La spectrométrie de masse MALDI-TOF	50
4.15	Les puce à sucres	50
4.15.1	Glycan array	51
4.15.2	Printed array :	51
4.16	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	52
4.17	Séquençage N-terminal et détermination des séquences nucléotidiques Nterminales (amorces ou primer):.....	53
4.18	Purification de l’ARN	54
4.19	ELECTROPHORESE SUR GEL D’AGAROSE à 1% :	55
4.20	Transcription inverse (RT) :Synthèse de l’ADNc :.....	45
4.21	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :	58
4.22	Production de Protéines Recombinantes :.....	61
4.23	La Cristallographie : Cristallisation de complexes lectine –sucres en plaques multi-puits.	63
4.24	La cristallogénèse :.....	63
4.25	La cristallographie aux rayons X	63
4.26	Cristallogenèse :La diffusion de vapeur.....	64
4.26.1	Obtention de complexes	66
4.26.2	Conservation des cristaux.....	66
4.28	Diffraction aux Rayons X :	67
4.28.2	Le traitement des données	69
4.29	Effet Immunomodulateur des lectines :	69
4.29.1	Prélèvements sanguins :	70
4.29.2	Activité phagocytaire :	70
4.29.3	Analyse statistique :	71
5.1	Étude des propriétés d’hémagglutination :	71
5.2	Purification par Chromatographie D’Affinité sur colonne FPLC(AktaPrime plus) :	73
5.3	Tests d’inhibition de l’hémagglutination des lectines TrFBL1 et TrFBL2 en présence de sucres :.....	79

5.4 La spectrométrie de masse MALDI-TOF	81
5.5 Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)	82
5.6 Thermal Shift Assay (TSA) :Plateforme de criblage de thermostabilité des protéines par fluorescence.....	85
5.7 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	87
5.8 Glycan Array (puce à sucres)	88
5.9 Séquençage N-terminal et détermination des séquences nucléotidiques Nterminales (amorces ou primer) :.....	82
5.10 Production de protéines recombinantes.....	85
5.11 La cristallisation des protéines par la méthode de la goutte suspendue:.....	86
5.12 Génome de <i>Terfeze boudiéri</i> disponible Dec 2013.....	94
5.13 Activité Immunomodulatrice de la lectine de la truffe blanche du Sahara Algérien(<i>terfezia boudiéri</i>).....	105
5.13.1 Effet de <i>terfezia boudiéri</i> sur l'activité phagocytaire	105
5.13.2 Effet de <i>terfezia boudiéri</i> sur la clearance du carbone (demi-vie).....	106
6- Conclusion générale et perspectives.....	109
7- BIBLIOGRAPHIE.....	112

1. INTRODUCTION :

Les lectines sont des protéines capables de se lier **spécifiquement** de façon **non covalente** et **réversible** à des glucides. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité :

- celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique,
- et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides **(1)**.

Ces protéines ne montrent **aucune activité enzymatique** vis à vis de leur ligand **(2,3)**.

Elles sont présentes dans toutes les branches du règne vivant ; chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, insectes et animal.

Elles possèdent aussi la propriété d'**agglutiner** des cellules (comme les érythrocytes) en se fixant sur les polysaccharides membranaires ou les glycoprotéines présents dans les matrices extra – cellulaires, ou dans les fluides biologiques comme le sérum. **(4)**. Depuis cette époque d'autres hémagglutinines ont été trouvées dans diverses plantes. **(5,6)**.

De part leur capacité de lier les glucides spécifiques, les lectines se sont révélées être, des outils très utilisés au laboratoire dans les techniques préparatives ou analytiques. L'intérêt était, motivé surtout par leur utilisation dans la **détection, l'isolation et la caractérisation** d'oligosaccharides, tels que les déterminants de groupes sanguins et de glycoconjugués surtout des glycoprotéines

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est aussi lié sans doute à leur capacité unique de lire l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont des récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire.

Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie spécifiquement aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures **(7)**

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

Elles peuvent interagir avec des systèmes biologiques, et développer une diversité d'évènements et fonctions dans des organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus pathologiques **(2)**.

Aujourd'hui elles sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical :

-De part leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués **(8)**

-Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains **(9)** et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

-Certaines lectines purifiées à partir de graines de légumineuses tropicales, présentent des activités anti- inflammatoires **(10)**, d'autres encore purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins, sont

employées comme marqueurs histo-chimiques, puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycanes sur les cellules **(11)**.

-Parmi les rôles joués par les lectines des plantes, l'hypothèse la plus probable est leur implication dans la défense du végétal contre les phytopathogènes (ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante), mais d'autres possibilités ont été considérées **(12)**.

-Les lectines des champignons ont suscité ces dernières années un intérêt particulier motivé par la découverte que leur lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes, comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et l'hypercholestérolémie, mais aussi antivirales et anti- cancéreuses **(13,14)**.

L'abondance de lectines dans les champignons est tout à fait remarquable, et un test d'agglutination conduit sur plus de 400 spécimens à permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés.**(15)**.

Les exemples qu'on pourrait citer sont très nombreux, et cette variation de fonction pour chaque classe de lectines est bien évidente.

Objectif de notre travail :

Aucune étude concernant les lectines extraites à partir de truffes blanches (*Terfèzia boudiéri*) du SAHARA ALGERIEN n'a été réalisée.

Le protocole et les méthodes utilisées que nous avons choisi de suivre sont les suivants :

-Fractionnement des protéines à partir de truffes broyées dans l'azote liquide suivi de filtration et centrifugation.

-Purification des lectines sur colonne d'affinité portant des sucres, et par filtration sur gel.

-Contrôle de la pureté par SDS-PAGE.

-Test d'hémagglutination sur érythrocytes de lapin pour déterminer l'activité.

-Inhibition d'hémagglutination en présence de différents monosaccharides pour déterminer la spécificité.

-Thermal shift assay (TSA) dans différentes conditions de tampons et de PH pour déterminer la stabilité thermique.

-Cristallisation de complexes lectine-sucre en plaques multi-puits.

-Purification de l'ARN de truffe et amplification des séquences nucléotidiques.

Les caractérisations nécessitant d'autres méthodes (glycan array, spectro de masse et séquençage N-terminal) ont été effectuées par d'autres laboratoires.

-Réaliser des tests biologiques d'immunostimulation sur un lot de 28 souris males, et déterminer l'effet immunomodulateur des lectines de la truffe.

Toute cette démarche qui a fait appel à autant de méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation de cette lectine sera appuyée par des calculs statistiques analysant les relations existantes entre les différents lots de souris.

Les données bibliographiques sont représentées dans le premier volet de ce mémoire, avec une présentation générale sur les lectines, leurs structures et les différents rôles qu'on leur attribue. Le second volet décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation de nos résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans le troisième volet. Une conclusion générale et des perspectives seront enfin données.

2. Généralités sur les lectines

2.1. Définition des lectines

Les lectines sont définies comme étant des protéines d'origine non-immunes qui se lient aux glucides, agglutinent les cellules, précipitent les polysaccharides les glycoconjugués(16). Ces substances ont été successivement baptisées agglutinines, hémagglutinines ou bien phytohémagglutinines et finalement lectines.

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 les lectines. Leurs masses moléculaires sont généralement comprises entre 50 et 120 KDa.

Elles peuvent provoquer l'hypertrophie de l'intestin grêle et du pancréas. Ces effets néfastes des lectines sont inactivés par leur traitement thermique dont l'efficacité dépend de la température et de la durée du traitement **(3)** .

La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides**(17)**.

Elles peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et de fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques **(2)**.

Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical :

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation**(8)**.
- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains **(9)** et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

2.2. Historique

Tableau 1 :Historique et propriétés des lectines les plus connues.**(18)(36)**

Année	Auteurs	Découvertes
1884	Warden &Waddel / Bruyllant & Venneman	Toxicité de la graine d' <i>Abrus precatorius</i>
1886	Dixson	Toxicité de la graine de <i>Ricinus communis</i> .
1988	Stillmark	Activite hémagglutinante de la graine de <i>Ricinus communis</i> Toxicité de la graine de <i>Croton tiglium</i>

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

1952	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
1954	Boyd & Sharpleigh	Introduction du terme de lectine
1960	Nowell	La stimulation mitogénique des lymphocytes par la lectine de <i>Phaseolus vulgaris</i>
1965	Agrawal & Golstein	Chromatographie d'affinité pour la purification des lectines
1966	Boyd	Lectines dans les algues
1981	Reinsner et al.	Utilisation de lectines dans les greffes de moelle osseuse
1981	Yamauchi & Minamikawa	Expression de Con A dans les cellules d' <i>E. Coli</i>

Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées. Elles sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes **(19)**.

A quelques exceptions près, les lectines ne présentent pas une très grande affinité pour leurs ligands. Cette faible affinité, avec une constante d'affinité de l'ordre du millimolaire (mM), est souvent compensée par la multivalence de ces protéines par la présence de plusieurs sites de fixation aux sucres. Les lectines sont capables de reconnaître des monosaccharides mais aussi des sucres plus complexes de nature oligosaccharidique.

Cette reconnaissance protéines-glucides menée par les lectines, permet de nombreux phénomènes de reconnaissance dans l'adhésion cellulaire.

La figure suivante illustre le rôle des glycoconjugués sur la surface cellulaire.

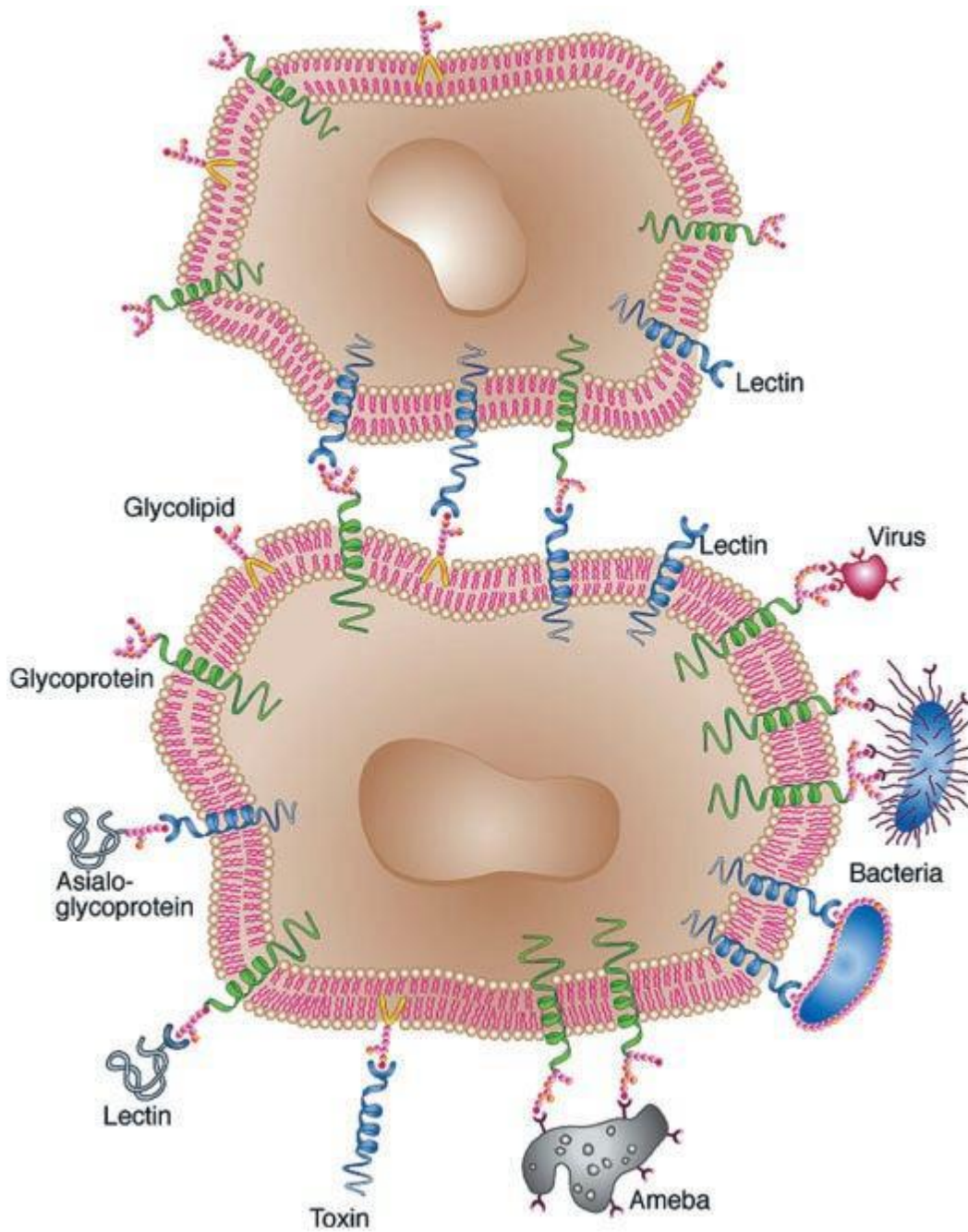


Figure 1 – Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides. (20)

2.3 Structure des lectines :

Du point de vue structural, les lectines sont classées en trois grandes classes selon leur topologie.

2.3.1 Les lectines simples

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

lectines végétales, les lectines bactériennes solubles et les galectines (une famille de lectines animales spécifiques pour le galactose) (**Figure 2**)(**21**).

La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations (**21**)

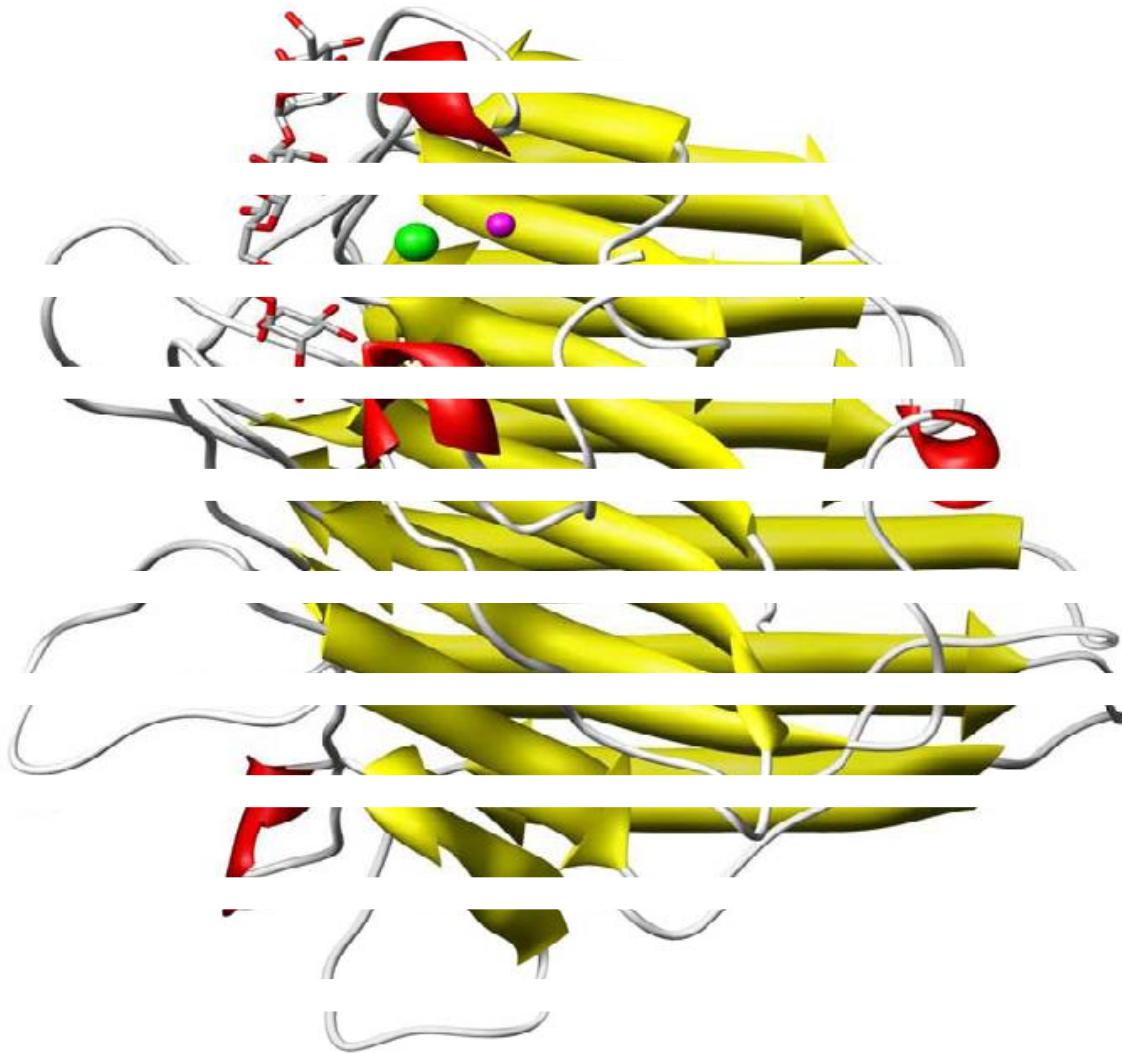


Figure2 : Représentation graphique d'un monomère de concanavaline A de *Canavalia ensiformis* en complexe avec le trimannoside (code PDB 1CVN). La protéine est représentée par un ruban jaune pour les brins β , un ruban rouge pour les hélices α et un fil pour les autres zones. Une représentation en bâtons est utilisée pour le sucre et en boule pour les cations. (**21**)

2.3.2 Les lectines en mosaïque :

Ce groupe comporte diverses protéines de différentes sources (virus, animaux). Il s'agit de molécules complexes qui sont composées de plusieurs types de modules ou domaines, dont un seul possède le site de liaison (21) (Figure 3).

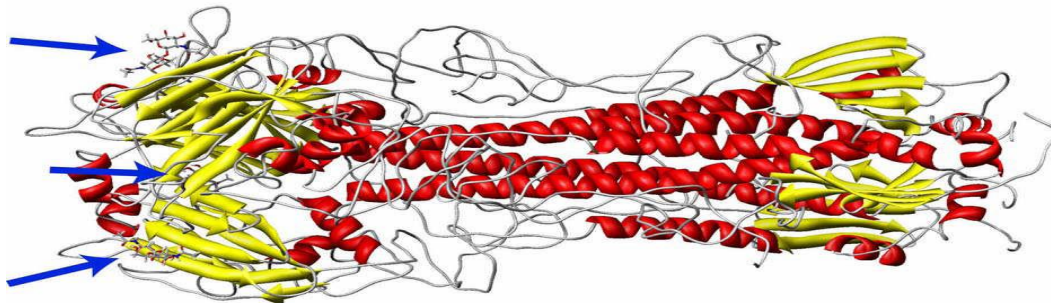


Figure 3 : Représentation graphique d'un trimère d'hémagglutinine du virus Influenza en complexe avec l'acide sialique (code PDB 1HGF). La représentation de la protéine est analogue à la figure 2 .(21)

2.4 Classification des lectines :

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

Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle de plus de 1000 lectines. La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes.

Tableau N°2 : Récapitulatif des structures tridimensionnelles des lectines (22)

Origine	Exemples de lectines	Native	complexé	Total
Plante	ConA , Ricine	106	201	307
bactéries	PA-IL de pseudomonas Toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin <i>Helix pomatia agglutinin</i>	80	152	232
Virus	Hemagglutinine de virus Capside de rotavirus	43	25	68

Champignons	Lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9

2.5 Les lectines présentes chez les plantes :

Selon la classification de **Peumans et Van Damme (1995) (23)**, trois types majeurs de lectines sont présents chez les plantes :

2.5.1 Les Mérolectines :

Les mérolectines sont de petits peptides, formées d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides exemple : (héveine, protéines d'Orchidées). Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.

2.5.2 Hololectines :

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

2.5.3 Les Chimérolectines :

Les chimérolectines possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des

hololectines (exemple : type 2-Rip *Ribosom Inactivating Proteine* : Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine)

2.6 Les lectines des microorganismes :

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital **(24), (25)**.

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines *fimbriaes* (pili et flagelles), les *toxines* et les lectines *solubles* (26).

2.6.1 Les lectines bactériennes :

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol et jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte pendant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré bien évidemment beaucoup d'attention dans ces dernières années (25).

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles: les lectines fimbriales, les toxines et les autres lectines solubles qui n'appartiennent pas aux deux premières classes (26).

2.6.2 Les lectines fimbriales

Les bactéries sont dotées d'organelles de surface appelés fimbriae qui servent à différentes fonctions, comme la reconnaissance et l'adhésion sur des surfaces diverses et en particulier sur les cellules des organismes eucaryotes (27). Des centaines de fimbriae sont attachés à la surface d'une cellule bactérienne. Dans les trois différents types de fimbria qui ont été observés (type 1, type P et type IV) l'organisation structurale est similaire (28). Les structures cristallines des différentes lectines fimbriales résolues jusqu'à aujourd'hui appartiennent aux pili de type 1 ou de type p et montrent que les domaines lectines adoptent des repliements similaires, basés sur une structure allongée de type β -sandwich. Le site de liaison pour le ligand est généralement une dépression peu profonde localisée sur un côté du domaine lectine. (Figure 4).

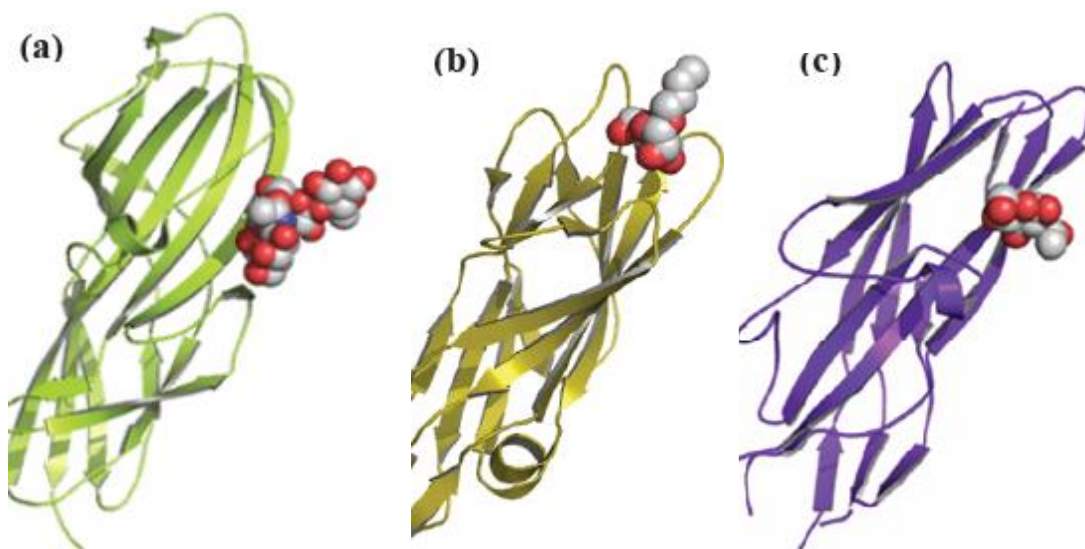


Figure 4 : (a) Récepteur PAPG en complexe avec le tetrasaccharide GBO4 (PDB 1J8R) (b), FimH compléxé avec butyl- α -D-mannopyranoside (PDB 1UWF) et (c) une lectine fimbriale F17-AG en complexe avec le GlcNAc (PDB 109W)

2.6.3 Les toxines

Les toxines sont des protéines secrétées par la bactérie qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. L'endommagement de la cellule peut advenir par la rupture de la paroi cellulaire, par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines du type AB sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*E.coli* (ETEC), *Shigelladysenteriae* et *Borderella pertussis*. Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B (**Figure 5**) qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire, comme le GM1, GM2 et le Gb3 (**29**).

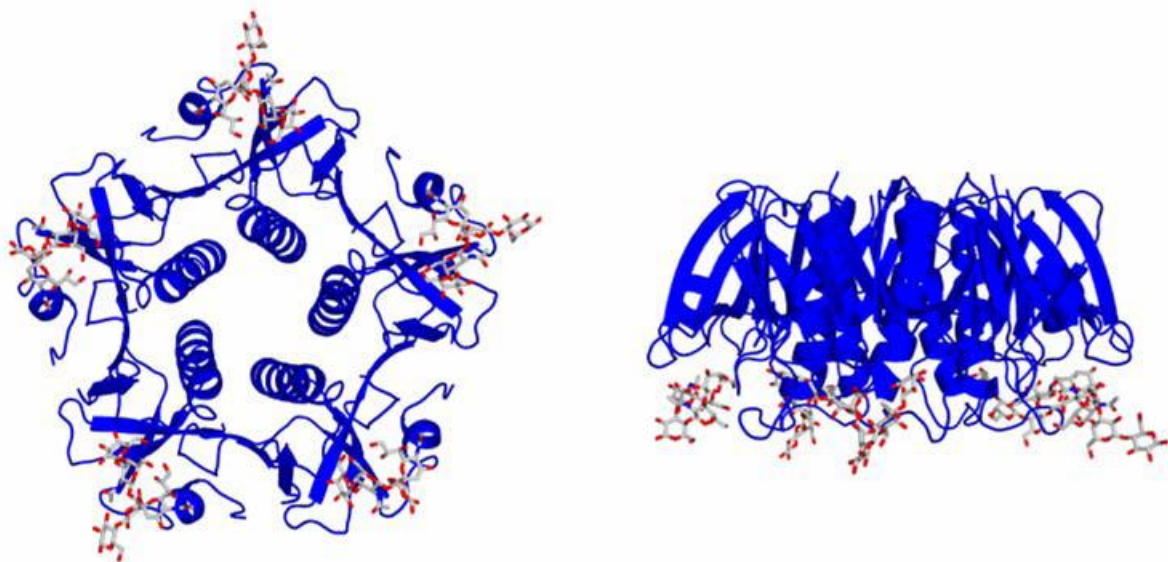


Figure 5 : Deux orientations pour la sous-unité B de la toxine du Choléra en complexe avec le GM1 (pdb 3chb)(**29**)

2.6.4 Les lectines solubles

Tableau 3 : Lectines bactériennes solubles (**30**)

Nom	Type	Spécificité	Caractéristiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-IL	Pathogène humain	galactose	Lectine cytotoxique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-IIL	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute affinité vers le fucose
<i>Cromobacterium violaceum</i> CV-IIL	Pathogène humain	fucose/mannose	Très haute homologie avec PA-IIL
<i>Burkholderia cenocepacia</i> BCLx	Pathogène humain	fucose/mannose	Gènes identifiés homologues à PA-IIL
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS-IIL	Pathogène végétal	mannose/fucose	Très haute homologie avec PA-IIL
<i>Ralsonia solanacearum</i> RSL	Pathogène végétal	fucose	Similaire à <i>Aleria arantia</i> lectin, une lectine de champignon

Seul un petit nombre de lectines solubles ont été caractérisées et le domaine d'étude est en pleine expansion. Dans cette famille de lectines bactériennes on regroupe toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie ayant une affinité pour des sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique. (30).

2.7. Les lectines de champignons

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

Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines antifongiques, des ribonucléases, des protéines de type *ubiquitine*, des lectines, des cellulases, des xylanases, des laccases, des invertases et des tréhaloses phosphorylases (31).

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons a été principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, contre l'hypertension et contre l'hypercholestérolémie mais aussi antivirales et anticancéreuses (13,14). L'abondance de lectines dans les champignons est tout à fait remarquable et un test d'agglutination conduit sur plus de 400 spécimens a permis d'identifier la présence de lectines dans la moitié des champignons analysés (Tableau 4).

Tableau 4 :Lectines de champignons connues .(15)

Champignon	Année	Caractéristiques et spécificités
<i>Aleria arantia</i> (AAL)	2003	Fucose β -propeller à 6 lames
<i>Flammulina velutipes</i> (FVL)	2003	Domaine fibronectin FNIII
<i>Xerocomus chrysenteron</i> (XCL)	2004	Gal/GalNAc Domaine similaire aux actinoporines
<i>Coprineus cinerea</i> (CGL2)	2004	Gal Galectine
<i>Agrocibe cylindracea</i> (ACG)	2005	Gal Galectine
<i>Agaricus bisporus</i> (ABL)	2005	T-antigen Domaine similaire aux actinoporines
<i>Laetiporus sulphureus</i> (LSL)	2005	LacNAc Un domaine ricine et un domaine type pore
<i>Psathyrella velutina</i> (PVL)	2006	GlcNAC/NeuNAc β -propeller à 7 lames

2.7.1 Caractéristiques

Les lectines de champignon qui ont été purifiées et caractérisées jusqu'à aujourd'hui montrent des caractéristiques très variables, soit en terme de taille (12-190 kDa), soit en terme de structure primaire, de glycosylation, de nombre des sous-unités (1-8) et de structure tridimensionnelle. La spécificité pour les sucres est aussi très variable et les ligands reconnus par ces lectines sont soit de simples monosaccharides, soit des structures plus complexes comme des oligosaccharides ou des glycoprotéines.

De plus, les lectines de champignon sont des outils intéressants pour la glycobiologie et ont trouvé des applications dans les études taxonomiques, embryologiques et bactériologiques, dans le fractionnement des glycoconjugués, des cellules, etc. Cependant, malgré l'intérêt montré dans ces dernières années qui a conduit à l'isolation de nombreuses lectines, la connaissance de ces protéines reste encore très limitée.

2.7.2 Rôles

En ce qui concerne les rôles biologiques, différentes hypothèses ont été avancées (32). Elles joueraient probablement un rôle important dans la période de dormance, dans la croissance et la morphogenèse du corps fructifère ou comme protéines de défense immunitaire. Chez les saprophytes, les lectines pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats nutritifs. Par contre, chez les champignons qui adoptent un mode de vie parasitaire ou symbiotique avec d'autres organismes, les lectines sont probablement impliquées dans les processus de reconnaissance de l'hôte ou dans les premières étapes de la mycorrhization .

2.8 Rôle des lectines dans les organismes vivants :

Le tableau suivant récapitule le rôle des différentes lectines chez les bactéries, les virus , les toxines ,les plantes .

Tableau 5 :Roles physiologiques de quelques lectines dans le monde vivant(32)

Lectines	Rôles
<i>Bactéries</i>	
Lectines fimbriales	Adhésion, infection
Lectines solubles	Adhésion, infection, formation de biofilm
Toxines	Adhésion, infection
<i>Virus</i>	
Influenza haemagglutinine	Adhésion, infection
<i>Amoeba</i>	
Lectines de surface	Adhésion
<i>Plantes</i>	
Légumineuses	Défense, symbiose avec les bactéries fixant l'azote
Autres	Défense
Galectines	Reconnaissance des glycanes dans la matrice extracellulaire

2.9. Spécificité des lectines :

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « Tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance **(34)** **(Le tableau 6)** nous montre la spécificité osidique de certaines plantes à lectines.

On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides **(1)**. Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la Spécificité des lectines **(35)**. Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel

Tableau 6 : Spécificité osidique de certaines plantes à lectines **(36)**.

ESPECES	SPECIFICITE
<i>Abrus precatorius</i>	Gal
<i>Adenia digitata</i>	Gal
<i>Aleuria aurantiaca</i>	L-Fuc
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Man > Glc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man > Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc

<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc
<i>Vicia sativa</i>	Man
<i>Ulex europaeus 1</i>	L Fuc
<i>Momordica charantia</i>	GalNAc
<i>Cytissus sessilifolia</i>	GlcNac >Fuc >Gal
<u><i>Datura stramonium</i></u>	<u>GlcNac</u>

2.10. Propriétés Biologiques des lectines :

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées.

2.10.1 Liaison avec les sucres

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine **(37)**.

2.10.2 Activité mitogène

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T **(38, 39,40)**.

2.10.3 Actions antivirales

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par lesRIPs (Ribosomes inactivant les protéines) **(41)**.

Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius* (42).

2.10.4. Autres propriétés

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'aggrégation des immunoglobulines (40), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (43), les effets pro et anti inflammatoires (44), l'induction de l'apoptose (45).

2.11. Agglutination cellulaire

L'agglutination cellulaire est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon) pour qu'elle puisse se produire. Les lectines monovalentes ont un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (46,41).

Les lectines agglutinent plus facilement les cellules malignes par rapport à leurs homologues normales. Des attitudes préférentielles ont été observées également entre cellules embryonnaires et cellules adultes, entre cellules en mitose et cellules en interphase (41)

2.12. lectines les mieux connues:

Tableau 7 : lectines importantes (47).

lectines	Exemple de commentaires
Lectines de légumes	concanavaleineA, lectines de pois
Agglutinine de germe de blé	Fréquemment utilisée dans l'étude des surfaces membranaires des cellules normales ou cancéreuses
Ricine	Glycoprotéines cytotoxiques provenant des graines de ricin

Toxines bactériennes	Entérotoxine thermolabile d'E. Coli et toxine du choléra
Hémagglutinine du virus de la grippe	Responsable de l'attachement à la cellule hôte ainsi que la fusion membranaire
Lectine de type S	Lectine animales se liant avec les B-galactose, elles ont aussi des rôles dans les interactions cellule-cellule et cellule- matrice extracellulaire

2.13. Utilisation des lectines

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'évènements et fonctions dans ces organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques **(2)**.

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

2.13.1 Dans le domaine biomédical

2.13.1.1 En Hématologie :

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

2.13.1.2 En Immunologie :

De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification et la purification des glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation **(48)**. Les lectines mitogènes sont employées pour déceler les allergies médicamenteuses, pour reconnaître les déficiences immunologiques congénitales ou acquises, pour étudier les sensibilisations dues aux

maladies infectieuses et pour juger des effets de diverses manipulations immunosuppressives et immuno-thérapeutiques (49).

2.13.1.3 En Biologie Cellulaire/

Les lectines sont des outils pour étudier la nature, les structures, la dynamique des membranes cellulaires (possédant des résidus saccharidiques) sous des conditions normales et pathologiques (50). Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (10).

2.13.1.4 En Cancérologie :

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histochimiques puisque certaines maladies telles le cancer sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (11).

Kenoth et ses collaborateurs en 2001 (51), rapportent qu'en raison de leur agglutination préférentielle aux cellules cancéreuses, les lectines sont suggérées comme transporteuses pour diriger drogues et produits pharmaceutiques vers les cellules cancéreuses.

(Tableau 8).

Tableau 8 : Propriétés et applications des lectines dans le domaine biomédical (51).

<i>Propriétés</i>	<i>Applications</i>
Agglutination spécifique des globules rouges selon le groupe sanguin	- typage du sang - identification de nouveaux groupes Sanguins
Induction de la mitose	-étude de la constitution chromosomique de la cellule et détection des anomalies
Agglutination cellulaire	-recherche sur l'architecture des membranes externes cellulaires, leurs changements et transformations. - phagocytose et motilité. Diminution de la croissance des cellules Tumorales
Précipitation des polysaccharides et	- isolement, purification et études structurales des

des glycoprotéines	glucides, - purification des glycoconjugués (enzymes, hormones) - modèles pour la réaction antigène anticorps (test ELISA, etc)
Liaison aux sucres	- études des sites de liaison spécifique des protéines et glycoprotéines. - structure et fonctionnement des Membranes

2.13.2 Dans le domaine agronomique

Les lectines peuvent être utilisées dans la lutte contre les agents pathogènes (nuisibles) des plantes telles que les insectes, les nématodes du sol, les vers parasites qui commettent d'importants dégâts dans des cultures (52).

Par exemple, la lectine de blé et celle de graine de *Bauhinia purpurea* ont des effets létaux pour deux insectes (*Ostrinia nubilabis* et *Diabrotica undecimpunctata*) se nourrissant sur le maïs, l'action des lectines peut se faire à des concentrations relativement faibles (47).

2.14. Le Système Immunitaire et l'Immuno-stimulation :

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la défense naturelle, il a la capacité de reconnaître les agents étrangers à l'organisme, mettant en jeu deux types de défenses: les défenses non spécifiques, naturelles ou innées et les défenses spécifiques ou adaptatives

La modulation du système immunitaire (immunomodulation ou immuno-stimulation) est devenue un aspect important de la recherche anti-infectieuse. En effet, l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire peut engendrer des conséquences néfastes pour l'hôte.

Les immuno-stimulants ont une action plus générale sur le système immunitaire et peuvent modifier simultanément plusieurs réponses immunologiques.

C'est Gaston Ramon qui, en 1925, « instaure le principe des *substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité*, technique qui permet d'obtenir des sérums plus riches en antitoxines en joignant au vaccin une substance irritante pour les tissus »

Dès 1927, différentes substances sont testées en tant qu'adjuvant pour leur pouvoir immunostimulant : mie de pain, tapioca aluminium (sous forme d'un sel : hydroxyde ou phosphate). En 1937, remarquant que des animaux infectés par la tuberculose avaient parfois des réactions marquées lors d'une vaccination subséquente, Jules T. Freund a l'idée de se servir de la bactérie tuberculeuse mélangée à une émulsion comme d'un adjuvant **(53)**

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons est principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses **(13,14,54,55)**.

2.15. Intérêt des lectines pour l'homme

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ses organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques **(2)**. Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical.

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation**(49)**.

-Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains **(9)** et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.

- Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires **(10)**.

- Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histo-chimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycannes présents sur les cellules **(11)**

Les lectines de blé intensifient la production de polyamines chez tous les groupes sanguins d'où une diminution de la digestibilité et de l'utilisation des protéines dans l'intestin. **(2)**

3. Généralités sur le champignon utilisé :

Notre travail de recherche portera sur un de champignon du Sahara Algérien, appelé communément truffe blanche et appartenant à l'espèce *terfezia.boudiéri*.

Définition de la truffe

La truffe est un champignon souterrain, elle est plus exactement le fruit du mycélium.

Dans la classification des champignons, la truffe est classée dans la catégorie des ascomycètes hypogés.

Ascomycète car les spores sont enfermées dans des sacs (asques) et hypogée car souterraine.

Par son aspect, la truffe est plutôt arrondie, mais peut être irrégulière en raison du terrain.

Le cycle biologique de la truffe est particulier. Comme tout champignon, la truffe n'a pas de fonction chlorophyllienne.

Elle est donc contrainte pour vivre de se rattacher à une autre vie.

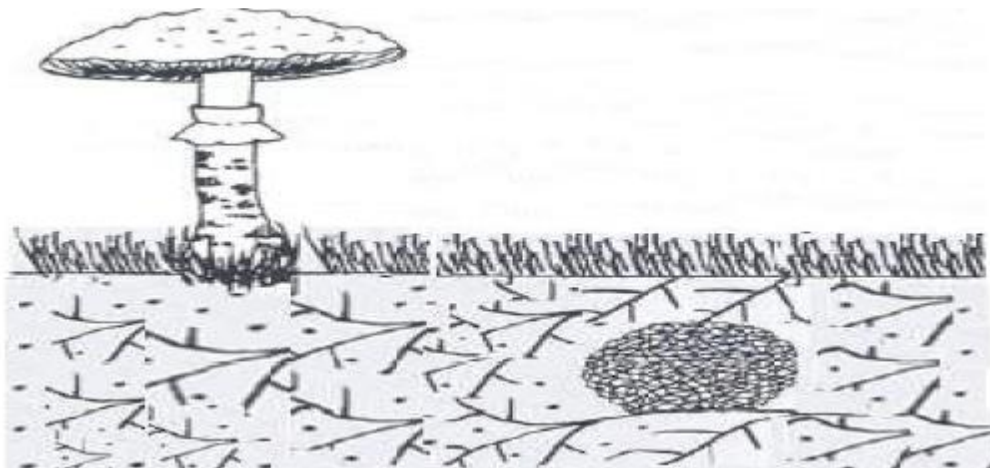


Figure 6: La truffe ,Champignon souterrain en forme de tubercules (78)

Classification scientifique



Classification scientifique

Royaume : *Mycètes*

Division : *Ascomycota*

Classe : *Pezizomycetes*

Ordre : *Pezizales*

Famille : Terfeziaceae ou Pezizaceae

Genre :

Espèce

Terfezia

Terfezia Alsheikhii

Terfezia Arénaire

Terfezia Austroafricana

Terfezia Boudieri

Terfezia Canariensis

Terfezia Claveryi

Terfezia Decaryi

Terfezia Eremita

Terfezia Leptoderma

Mode de vie

*Les "Truffes du désert" vivent en "association symbiotique" avec certaines espèces végétales, surtout de la famille des Cistaceae.

*Elles forment différents types de mycorhizes:

- endomycorhizes

- ectomycorhizes

- ectendomycorhizes **(78)**.

LA REPRODUCTION DE LA TRUFFE

Les truffes, fruits du champignon, contiennent des cellules de reproduction : les ASCOSPORES. Ce sont de très petits organes en forme de ballon de rugby, de quelques centièmes de millimètre de diamètre. Leur morphologie permet de distinguer les espèces ; elles sont contenues dans des sacs appelés ASQUES. Si elle reste en terre, la truffe se décomposera, les ascospores seront libérées dans le sol. Plus tard, elles pourront éventuellement germer, le mycélium émis croîtra en quête d'une racine apte à le recevoir, avec laquelle, si les conditions le permettent- ce qui est rare -, il pourra former des mycorhizes, et le cycle sera bouclé.

☒ Composition pour 100 grammes de Terfezia (78).

Eau.....	73-78 g
Hydrates de carbone.....	11-17 g
Protéine.....	4-5 g
Lipides.....	0.6-1.8 g
Fibres.....	1.4-2.6 g
Cendres (minerais).....	0.8-1 g
Acide ascorbique (vitamine C).....	0.4-1 g

☒ La durée de vie des truffes est comprise entre 200 et 290 jours.

☒ **Poids** : de taille variable, généralement de 5 à 10 centimètres de diamètre, la

truffe, ne pèse généralement que de 20 à 100 grammes. Les plus grosses atteignent jusqu'à 200 et même les 500 grammes.

II.6. Où se trouve la truffe?

Pour se développer correctement, la truffe a trois exigences : un arbre hôte, un terrain calcaire sec et un climat bien marqué avec une bonne exposition au soleil.

Le climat idéal de la truffe se caractérise par un printemps où alternent des périodes d'humidité et de chaleur, un été chaud entrecoupé d'orages, un automne pas trop humide et un hiver pas trop rude, avec des nuits à -5° , et des journées entre 10 et 14° .

Milieu

Effet sol

-La truffe est un champignon des sols calcaires, aérés et drainants, qui se réchauffent facilement et présentent une intense activité biologique. La présence de nombreux turriculés de lombrics en surface est donc un excellent indice (truffe1)

-Sols sablonneux légers, pourcentage en sable élevé (85-95%).

- pH: 7,0 et plus).(78).

Effet climat

Production conditionnée par la pluie et la température:

- Niveaux des précipitations (70 à 120 mm sont nécessaires pour une bonne production).

-Bonne distribution: pendant l'automne, l'hiver et le printemps

- Froids prolongés ou fortes chaleurs sont néfastes.

- Champignons surtout printaniers: Mars (78).

4 Matériel et méthodes

Méthodologie

Les méthodes utilisées ont été les suivantes :

4.1 Fractionnement des protéines

Ce travail a été réalisé sur 168 grammes de truffes *Terfezia boudieri* fraîchement récoltées et broyées dans de l'azote liquide. La poudre obtenue à l'issue de processus (152 g) est reprise dans 380 ml d'un tampon phosphate (PBS) à raison de 2,5 ml/g. La solution obtenue est homogénéisée au Blender Ultra-Turax (IKA Labor Technik, Germany) ; puis soumise à une centrifugation à 4000g pendant 20 minutes à 04°C (Sigma). Le surnageant est récupéré puis repris pour une deuxième centrifugation à 15000g pendant 20 minutes à 4°C. En parallèle les deux culots récupérés pendant les deux opérations de centrifugation sont redissous dans du PBS (30ml) et centrifugés à 12000g pendant 20 minutes à 4°C.

Seuls les surnageants issus des différentes centrifugations serviront pour la suite des opérations car ils présentaient une Densité optique à 280 nm relativement appréciable (**DO=14,30mg/ml**). (**Volume final de l'Homogénat :400 ml**)

4.2 Sonication :

L'homogénat est soumis à l'action des Ultras-sons (Bioblock Scientifik) pendant 15 mn à Température ambiante, dont le but est détruire toutes les membranes cellulaires et ainsi libérer d'éventuelles protéines restantes, puis centrifugé à 12000g pendant 20 minutes à 4°C.

-Le surnageant est ensuite filtré au travers de membranes millipores et filtres seringues conçus pour des seuils de filtration de 0,2µm de diamètre facilitant ainsi la récupération des protéines pour des applications critiques. Le filtrât est conservé à 4°C.

4.3 Dosage des protéines

Il est réalisé sur un spectrophotomètre Nanodrop ND 1000 **(80)**.



La spectrophotométrie classique exige de placer les échantillons dans des cuvettes ou des capillaires et nécessite souvent des volumes importants ou des dilutions. Cela est souvent impraticable en raison des volumes d'échantillons limités souvent utilisés pour l'analyse des protéines.

Le spectrophotomètre (**Thermo Scientific NanoDrop ND-1000**) permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes d'échantillons sans cuvettes ni capillaires.

La technologie NanoDrop est basée sur la mesure de la tension de surface exercée par un volume d'échantillon entre deux socles optiques sans l'utilisation des cuvettes ou des capillaires. Un flash au xénon fournit la source de lumière qui traverse l'échantillon et ainsi mesurée par le spectrophotomètre. Ce dernier permet de mesurer rapidement et facilement de 1 à 2 μL de protéines, ADN, ARN, et d'autres biomolécules.

Il permet des mesures sur une grande gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'U.V (220 à 750 nm) avec une précision photométrique de l'ordre de 0.003 abs, et une détection pour les acides nucléiques par exemple de l'ordre de 2 ng/ μl jusqu'à 3700 ng/ μl sans dilution(80).

4.4 Tests d'hémagglutination :

Ces tests sont réalisés à différents stades du processus de la purification des lectines. La mesure d'activité hémagglutinante est le test d'interaction le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (Goldstein 1980 ; Rüdiger 1993). Cette technique repose sur la capacité des lectines à former un réseau avec des érythrocytes par interaction avec leurs glycoconjugués de surface. Les hématies de mammifères sont parmi les plus utilisés (homme, lapin, mouton, porc...). Les tests sont réalisés sur des microplaques de titration et l'agglutination (ou agrégation) des globules rouges par les lectines forme une phase gélatineuse visible à l'œil nu. En absence d'activité hémagglutinante, les hématies sédimentent par gravité au fond des puits.

Pour cela, des dilutions en cascade sont réalisées. Le volume total dans chaque puits est de 50 μl . La concentration en lectine dans le premier puits est de 1 mg.ml⁻¹. La protéine est ensuite diluée en cascade, de deux en deux, jusqu'au 12ème puits. Puis, 25 μl de la suspension d'érythrocytes de lapin (Biomérieux) à 2% en solution saline de NaCl 150 mM sont ajoutés à chaque puits, mélangés et incubés à 37°C pendant 30 minutes. La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée directement après cette incubation. La plus basse concentration en lectine pour laquelle une hémagglutination est encore visible est appelée point d'équivalence et la concentration en lectine de ce puits correspond à une unité d'hémagglutination (UH).

4.5 Purification par le système FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

Un appareil de chromatographie automatisé (AktaPrime plus) réfrigéré à 4°C est utilisé. Il contient deux pompes permettant l'injection de tampon A (tampon d'équilibration et de lavage) et de tampon B (tampon d'élution).

4.6 Chromatographie d'Affinité sur colonne de Mannose :

La purification des lectines est réalisée sur une colonne de Chromatographie contenant 5ml d'une résine ayant une affinité pour le mannose (Carbohydrate gel kit#2 ,EY laboratories,USA) connectée à un système AktaPrime plus FPLC (fast protein liquid chromatographie). L'échantillon (400 ml) est appliqué sur la colonne qui a été préalablement lavée et équilibrée avec un tampon(A) 20 mM Tris PH= 7.5,100 mM.NaCl, avec un débit de 1ml/mn. Les Protéines non spécifiques du mannose sont éluées grâce à un tampon(B) 20mM Tris PH7.5 ,1.5M NaCl. L'élution aura lieu par compétition dans un tampon à forte concentration en mannose .Le tampon utilisé sera le tampon (A) mais avec une concentration en mannose de 10 fois supérieure, soit 200 mMolaire.

4.7Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS).(15% d'acrylamide)

Cette une méthode que l'on va utiliser tout le long du processus de purification de nos lectines pour contrôler la pureté et estimer la masse moléculaire de nos protéines.

On utilisera deux types de gel :

-un gel à 15% qui sera le gel de séparation en condition dénaturantes en raison de la présence de SDS qui se lie aux protéines selon un ratio approximativement constant (~1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS est un détergent fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Cela signifie que seul le poids moléculaire apparent (et non réel) des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaire.

-Un gel de concentration à 4%.

-La révélation se fait grâce à l'instant blue ,un réactif plus rapide que le bleu de coomassie.

Le poids moléculaire est estimé en comparant les bandes électrophorétiques avec des standards moléculaires de chez Biorad (Precision plus, protein unstained, Biorad) et analysées par Quantity one software (Biorad) ; appareil de lecture de gel.

4.8 Chromatographie d’Affinité sur colonne de N-Acétyle glucosamine

Une deuxième purification des lectines a été réalisée en utilisant une colonne de chromatographie contenant 01ml d’une résine d’agarose ayant une affinité pour le N-acétylglucosamine connectée à un système AktaPrime plus FPLC (fast protein liquid chromatographie). Le protocole expérimental est le même que celui utilisé lors de la chromatographie d’affinité pour le mannose sauf que cette fois-ci nous devons remplacer ce dernier dans le tampon d’élution A par du N-acétyl glucosamine à une concentration 10 fois supérieure, soit 200 mMolaire..

4.9 Concentration et Dialyse des fractions renfermant nos lectines :

Après concentration de fractions purifiées des lectines retenues après les différentes chromatographies, celles-ci sont dialysées de façon à éliminer les sucres qui leur sont liés. Cette opération est réalisée à l’intérieur de sac de dialyse contre une eau bi-distillée à 4°C pendant 4 jours en prenant soin de changer l’eau chaque jour. Les échantillons sont ensuite stockés à 4°C.

4.10 Filtration sur colonne renfermant un gel de type Toyopearl55F :

C’est une résine composée d’un polymère de méthacrylate hydroxylé réservée à la séparation des protéines dont le PM varie entre 1000 et 700.000 Da. Elle est très utile pour les glycoprotéines de type lectine, car elles ne sont pas retenues par le gel Toyopearl 55f, contrairement aux différents gels de type Séphadex qui sont des gels à base de dextrane (polymère de glucose alpha1,6 et alpha 1,4).

La colonne est équilibrée à l’aide d’un tampon hépes 20 mM, NaCl 100 mM, PH=7,6. Le volume de la colonne est de 175 ml ; le débit fixé est de 0,4 ml/mn. L’élution est réalisée grâce à un tampon Tris HCl 20 mM, PH=7,5 Mannose 200 mM, NaCl 100 mM.

4.11 Tests d'inhibition de l'hémagglutination de la lectine TrFB en présence de sucres :

Les sucres utilisés sont le fucose, le N-acétylglucosamine, le lactose, le mannose, le N-acétylgalactosamine et l'acide sialique à des concentrations chacun de 400mM dans 5 ml de tampon Tris Hcl 20 mM, NaCl 100 mM. Ces tests sont évidemment réalisés avec les fractions pures des lectines TrFB retenues en fin de purification (fractions 12,13 et 14 de la FPLC GLcN-Ac)

4.12 Thermal Shift Assay (TSA) :Plateforme de criblage de thermostabilité des protéines par fluorescence.

Principe de la méthode Thermal Shift Assay

L'étude de la déstructuration thermique des protéines (TSA) permet d'obtenir des informations sur la stabilité des protéines grâce à la mesure de la température de fusion (T_m).

La température de fusion d'une protéine correspond à la température autour de laquelle la protéine va se dénaturer. Plus la température de fusion est élevée, plus la protéine est considérée comme stable.

C'est une méthode qui a été récemment adaptée à l'utilisation des appareils de PCR quantitative en temps réel. La mesure de la thermostabilité des lectines par fluorescence est un outil complémentaire qui peut nous apporter rapidement des informations complémentaires utiles pour améliorer leur préparation et leur caractérisation.

L'analyse des variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est suivie grâce à un colorant fluorescent ; le Sypro Orange qui permet de suivre la dénaturation des protéines (des lectines).

En fait lorsque la lectine est dénaturée suite à l'augmentation de la température, elle subit une déstructuration et expose ses régions hydrophobes :le Sypro Orange se lie alors aux régions hydrophobes désormais disponibles et devient fortement fluorescent ;cela ce traduit par une augmentation du signal de fluorescence traduisant une dénaturation protéique.

-Nous avons réalisé cette TSA dans différentes conditions de tampons et de PH afin de mieux apprécier la stabilité thermique de nos deux lectines purifiées TrFB1(32 kDa, spécifique du fucose), et la TrFB2 (16 kDa, spécifique du N-acétylglucosamine).

Les tampons et PH utilisés sont les suivants :

1-Tampon Acétate de Na 100 mM, PH=4,5

2- Tampon Citrate de Na 100 mM , PH =5,6

3- Tampon Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique, sel de sodium. (Mes Na) 100 mM , PH =6,0

4-Tampon Cacodylate de sodium 100 mM , PH=6,5

5- Tampon Hépès 100 mM ,PH =7,0

6- Tampon Hépès 100 mM ,PH =7,5

7-Tampon Tris 100 mM PH=8,0

8-Tampon Tris 100 mM PH=7,5

Les courbes de fluorescence sont représentées sur un graphe donné par le Thermocycler BioRad/admin disponible au laboratoire du CERMAV de Grenoble, puis traitées par un logiciel afin de calculer la dérivée première de chaque point de ces courbes. Chaque courbe de fluorescence typique de dénaturation thermique d'une protéine présente une température de transition thermique, appelé T_m qui correspond au point d'inflexion de la courbe de fluorescence. Les tests sont effectués dans des microplaques de 48 puits (24 par échantillon) sur un volume de 25ul (12,5ul du tampon test + 7,5 ul de H₂O +5ul du Mix) par puits.

Le Mix pour chaque échantillon protéique à analyser est composé de 70 ul de protéine +7 ul de Sypro Orange +63 ul d'H₂O.

Les cinétiques de dénaturation sont réalisées sur PCR en temps réel que l'on a préalablement programmé pour une variation de T° allant de 20°C à 100°C , avec un pas de 1°C par minute. Le Sypro Orange est excité à 470 nm et son émission est mesurée à 570 nm.

4.13 Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)

La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pH_i . On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pH_i dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou \pm étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel.

Nous avons utilisé du gel de polyacrylamide de Biorad (pH 3-10), les gadients de pH de ces gels ont été déterminées à partir des résultats d'essais effectués simultanément avec un kit de calibrage à large spectre des protéines (IEF Mix, Sigma).

4.14 La spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF = *Time-Of-Flight*). La séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides .

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre.

Cette technique comme la Gycan array et le séquençage N-terminal qui suivront ont été effectués dans d'autres laboratoires.

4.15 Les puces à sucres

Les puces à sucres sont dérivées de la technologie robotique standard. Elles offrent la possibilité de réaliser des analyses en parallèle sur un grand nombre d'oligosaccharides. Les puces à sucres permettent de déterminer la spécificité des protéines qui se lient à des oligosaccharides, tels que les lectines (Blixt, *et al.* 2004). Cette technique, où le grand intérêt est la miniaturisation et la rapidité de l'analyse, utilise peu de protéine.

Les puces à sucres ont été développées par le « Consortium for Functional Glycomics »

(CFG ; <http://www.functionalglycomics.org>), fondé par le « National Institute of General Medical Sciences ». Le Consortium a mis au point des outils comme le « Glycan array » et le « Printed array », en français « array » signifie réseau ordonné. Ils se différencient principalement par la méthode de fixation des sucres. Dans les deux cas, les lectines doivent être soit marquées par un composé fluorescent comme l’Alexa Fluor® 488–TFP (carboxylic acid, 2,3,5,6 tetrafluorophenyl), soit fournies avec un anticorps.

4.15.1 Glycan array

Le « Glycan array » est basé sur le principe ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) qui a été miniaturisé. Cette technique comprend une gamme d’oligosaccharides biotinylés fixés par un bras espaceur sur des plaques de 96 à 384 puits, recouvertes de streptavidine, (Fig 07)

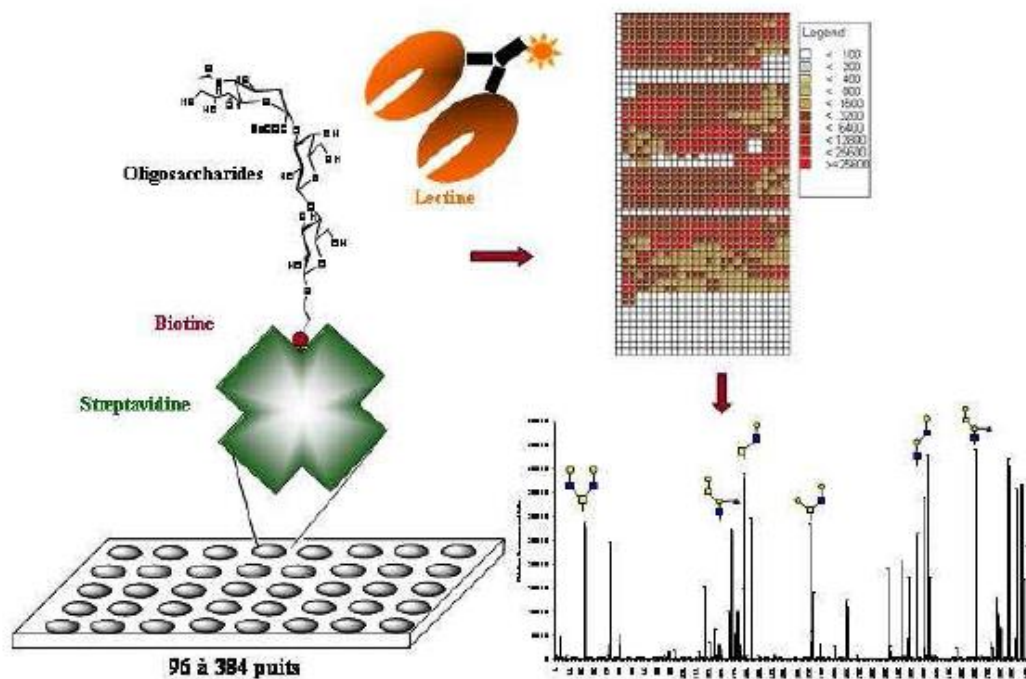


Figure 07 – Principe du Glycan array.

4.15.2 Printed array :

Le « Printed array » utilise une bibliothèque d’oligosaccharides qui comporte

aujourd'hui plusieurs structures diverses présentes sur les parois cellulaires et représente les structures glycaniques importantes des glycoprotéines et des glycolipides. Des plaques de verre sont fonctionnalisées avec du N58 hydroxysuccimidine (NHS) capable de se lier de manière covalente avec des glycoconjugués préalablement couplés à un groupement amine (79) (Fig 08).

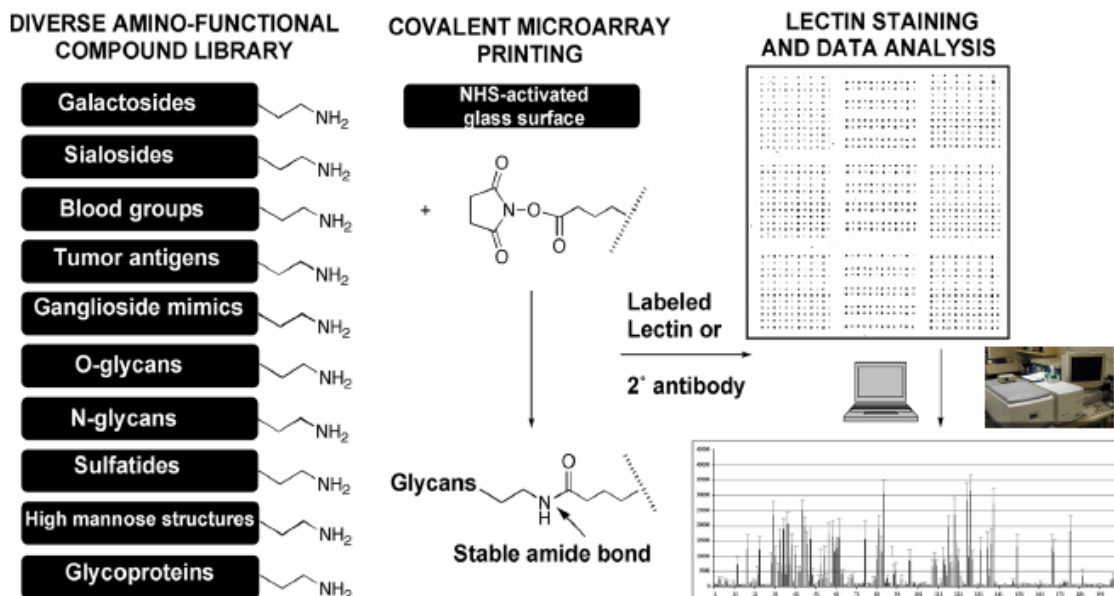


Figure 08 – Principe des Printed Arrays (79). La méthode permet de tester un très grand nombre d'oligosaccharides et exige seulement 0,1-2 µg de lectine pour obtenir un signal optimal.

Nos deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 ont été marquées par le tétrafluoro-phenyl ester grâce au réactif Alexa-fluor 488-TFP (Invitrogen). La protéine a été préparée selon les instructions du manufacturier à une concentration de 1mg/mL dans un tampon bicarbonate de sodium pH 9,0. Le réactif TFP a été préparé extemporanément dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration de 10 mg/mL. Le mélange a été incubé une heure à température ambiante sous agitation. La protéine a été finalement séparée du réactif résiduel par colonne de dessalage sur colonne D-salt polyacrylamide (Pierce) dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, 5 mM MnCl₂. L'échantillon marqué a été ensuite envoyé au *Consortium for Functional Glycomics*, CFG, USA, pour être tester sur les puces à sucres.

4.16 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La technique de DLS mesure des fluctuations d'intensité en fonction du temps qui apparaissent lorsque des particules sont soumises au mouvement Brownien. Plus une molécule est volumineuse, moins son déplacement en solution est rapide. Les particules en mouvement vont interagir et disperser le faisceau dans toutes les directions. L'analyse de la lumière diffusée va être recueillie par un détecteur et permet de déduire un coefficient de diffusion des particules qui est converti en distribution de taille puis en rayon

hydrodynamique. Il est également possible d'en déduire le taux de polydispersité de la molécule, qui représente une déviation standard de la taille de la particule reportée à son rayon. Cette valeur permet d'apprécier le taux d'agrégation et d'oligomérisation de la protéine.

Les mesures ont été effectuées avec 50 µL de protéine pure dans son tampon natif dans des cuves en quartz (Hellma) grâce à un système appelé :Zetasizer nano series (Malvern Instrument).

L'index de polydispersité qui sera calculé déterminera d'une manière rationnelle les conditions de cristallisation.

4.17 Séquençage N-terminal et détermination des séquences nucléotidiques Nterminales (amorces ou primer):

Séquençage d'Edman

Le séquençage par la méthode d'Edman d'un peptide ou d'une protéine consiste à réaliser une dégradation récurrente à partir de l'extrémité N-terminale. A chaque cycle de dégradation, l'acide aminé en position N-terminale est libéré sous forme d'un dérivé

phénylthiohydantoïne (acide aminé PTH) (81), ainsi il est possible de dériver les acides aminés de manière à les analyser par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Dans ce cas, les acides aminés libres obtenus par hydrolyse totale du peptide en milieu acide sont transformés par deux dérivations successives en esters isopropyliques de N-trifluoroacétyl amino acides, composés volatiles analysables par CPG (82).

Les séquences N-terminales de nos deux lectines de truffe obtenues après purification ont été déterminées par la dégradation d'Edman en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (Applied Biosystems gas-phase séquençer), modèle 492 de l'institut de Biologie Structurale de Grenoble.

Les séquences de nucléotides des amorces (primers) dégénérées ont été obtenues par traduction inverse de la séquence d'acides aminés et ont été synthétisées par Eurofins MWG Operon, sous les N° de code 2733738 du 06/06/2012 et N° 2803618 du 20/09/2012.

4.18 Purification de l'ARN

Pour isoler l'ARN, 1 à 2g de truffe ont été congelées dans l'azote liquide puis réduites en poudre dans un mortier. L'ARN cellulaire total a été isolé en utilisant le kit *Concert Plant RNAreagent* (Invitrogen catalogue N° 12322-012), selon le protocole du fabricant. La quantité des ARN totaux extraits a été déterminée par lecture au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm. Leur pureté et leur intégrité ont été évalués par électrophorèse en gel d'agarose 1 %.

Protocole expérimental :

2g de truffe préalablement congelée à -80° C (cfr technique) ont été utilisées et rendues en poudre en présence d'azote liquide. (Tout le petit matériel qui va servir à cette technique doit être plongé dans de l'azote liquide puis retiré).

La poudre obtenue est répartie sur 04 tubes (soit 0,5 g/tube),

additionnée à environ 02 à 05 ml/tube du réactif Plant RNase- free water (une eau stérile dépourvue de toutes traces de ribonucléases),

de façon à pouvoir dissoudre toute la quantité de poudre ; le tout est laissé reposer 05 mn à température ambiante en position horizontale pour mieux favoriser la dissolution.

Procéder ensuite à une centrifugation à 12000tr/mn pendant 02 mn à température ambiante car dans ces conditions l'ARN est stable et ne nécessite pas de froid.

Récupérer le surnageant sans toucher au culot ; ajouter à chacun des culots 0,5 ml de NaCl 5M , mélanger et ensuite les récupérer dans des tubes à centrifuger éppendorf(02ml) RNase free. Additionner ensuite à chacun 0,3 ml de chloroforme ; ce qui laisse apparaître 02 phases non miscibles : une phase aqueuse en haut (légère) et une phase organique en dessous (cette phase renferme du chloroforme qui précipite les lipides et des protéines qui précipitent à froid). Comme l'ARN , se retrouve dans la phase aqueuse , son transfert dans un autre tube, l'ajout de 300 à 400 µl environ d'isopropanol dans chaque tube , suivi d'une incubation pendant 10mn à T° ambiante (Temps qui va initier un début de précipitation de l'ARN) et d'une centrifugation à 12000tr/mn pendant 10 mn , va servir à faire précipiter l'ARN total.

Une fois le surnageant aspiré, le culot d'ARN est lavé dans 1ml de d'éthanol à 75% , centrifuger de nouveau à T° ambiante à 12000 tr/mn pendant 1 mn .L'ARN se trouvant dans le culot , jeter le surnageant qui est constitué d'éthanol qui a servi à laver en fait l'ARN de toutes autres traces de protéines, d'ADN , lipides éventuellement restant ; laisser sécher à l'air libre pendant 5 à 10 mn.

Le culot peut ensuite être solubilisé dans 40 µl d'eau stérile et dépourvue de ribonucléase (RNAase free water).Le volume dans lequel le culot est solubilisé dépend de ce que l'expérience nécessite. Les

volumes d'ARN solubilisés sont rassemblés et centrifugés de nouveau à T° ambiante pendant 1 mn à 12000 tr/mn.

A ce stade, on récupère le surnageant dans 04 tubes frais (en fait l'ARN qui est soluble dans l'eau doit logiquement être dans le surnageant) et le culot est à jeter.

Après cela, on prélève à partir des solutions mères d'ARN des quatre tubes (04) un volume de 12µl qui sera réparti comme suit :

-10µl qui vont servir pour l'électrophorèse sur gel d'Agarose

-1µl pour mesurer les différentes densités optiques aux trois (03) longueurs d'onde au nanodrop.

-1µl pour mesurer les concentrations en ARN au nanodrop .

La concentration d'ARN total est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (nanodrop) à des longueurs d'onde $\lambda=260$ nm pour les acides nucléiques ,280nm pour les protéines et 230nm pour l'ARN total est ensuite conservé à -70° C ou utilisé pour une électrophorèse sur gel d'Agarose dénaturant afin d'analyser qualitativement le ratio des bandes d'ARN. La concentration des ARN totaux et l'éventuelle contamination par d'autres types de macromolécules sont déterminées par la valeur des rapports d'absorbance à trois longueurs d'onde :

- 230 nm : polysaccharides
- 260 nm : acides nucléiques
- 280 nm : protéines

4.19 ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE à 1% :

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% qui permet de séparer des fragments d'ADN ou d'ARN chargés négativement en fonction de leur taille . Le gel d'agarose préparé sera creusé de puits où seront déposées les solutions d'ADN à analyser. Le tampon légèrement basique (pH 8.6) ionise l'ADN sur ses groupements phosphates et le fait migrer vers l'anode. La résistance du gel poreux au déplacement de l'ADN dans le champ électrique est proportionnelle à la taille des fragments d'ADN. Ils seront donc séparés en fonction de leur taille, exprimée en pdb (paires de base), les plus petits fragments migrant les plus rapidement. Afin de disposer d'une référence de taille, on dépose dans un des puits du gel d'électrophorèse, un marqueur, mélange de fragments de tailles connues, en général obtenu par digestion d'un ADN parfaitement identifié par une enzyme de restriction. Leur visualisation est réalisée grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium qui s'intercale entre les paires de bases. Après suspension de l'agarose (1%) dans un tampon TAE (TAE 1x : 40 mM Tris acetate ; 2 mM EDTA), celui-ci est solubilisé

par l'action de la chaleur et le gel est forme lors du retour à la température ordinaire. Les ARN adoptent des structures secondaires qui ont une incidence sur leur migration électrophorétique. Afin de pouvoir comparer la migration de tous les types d'ARN, il faut les linéariser et donc rompre les liaisons hydrogène entre les bases. En conséquence, l'intégrité des ARN totaux est vérifiée par un gel d'électrophorèse (agarose 1%) en conditions dénaturantes .Les ARN totaux sont dénaturés en chauffant la solution pendant 15 min à 65°C.

Préparation des échantillons :

Préparation du gel :

* Prévoir 100ml de tampon de migration TBE1x (Tris Borate EDTA) par gel (10ml dans 90 ml d'eau stérile et dépourvue de toutes traces de ribonucléases).

* Préparer un gel d'agarose 1% dans du TAE1x (Tris Acétate EDTA) (0,4g d'agarose dans 40 ml de TAE1x). Dissoudre au micro-onde en prenant soin de recouvrir le récipient de façon à éviter des pertes par évaporation. Laisser refroidir avant de couler jusqu'à ce qu'on peut toucher le récipient avec les doigts, ajouter ensuite 2µl de gel-red Na (bromure d'éthidium) pour la fluorescence.

Assembler la cuve dans le dispositif, couler le gel et ajouter le peigne.

Après gélification, transférer dans la cuve, et couvrir de tampon de migration (TAE 1x)

* Préparer les échantillons :

10µl d'échantillon + 2µl de tampon de charge (gel red Nucleic acid stain). Le tampon de charge pour un volume total de 20 ml est composé de 7.3ml de glycérol, 6ml de bleu de bromophénol et 6.7 ml de Tris EDTA et est conçu pour densifier l'ADN et permettre aisément son dépôt au niveau des puits immergés. Le bleu de bromophénol est un indicateur de migration .Le tampon de charge est mis dans des proportions de 01 volume pour 04 volumes de solution d'ADN. Faire chauffer à 65°C pendant 15mn pour faire passer l'ARN de son état natif à une forme linéaire, car le gel d'Agarose n'est pas adéquat aux formes en pelotes statistiques.

* Migration à voltage égal à 80V pendant 30 mn.

*On à prévu huit (08) puits dans le gel, le premier servira au marqueur (M) de 01 Kb, et les quatre suivants aux différents échantillons.

* Déposer 12µl d'échantillon par puits et 08 µl pour le marqueur.

*En fin de migration, tremper le gel dans un bain de bromure d'éthidium (10 µl EtBr dans 100 ml d'eau) pendant 5-15 min. Rincer dans un bain d'eau pour enlever l'excès de EtBr.

* L'observation se fait par transillumination sous une lampe UV (280-320 NM).

La qualité de l'ARN est vérifiée en regardant s'il y a les trois bandes distinctes représentant les sous-unités 5S, 18S et 28S de l'ARN ribosomal.

4.20 Transcription inverse (RT) : Synthèse de l'ADNc :

La synthèse d'ADNc est catalysée par des **transcriptases inverses (reverse transcriptaseRT** en anglais). Ces enzymes sont des **ADN polymérase ARN dépendantes**, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'«**inverse**» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN. Cette étape permet d'obtenir de l'ADNc ou ADN complémentaire à partir de l'ARN à l'aide de la méthode et du kit « Invitrogen ».

Protocole Expérimental :

Après avoir vérifié la qualité de l'ARN sur gel d'agarose et déterminer sa concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mettre dans un ou plusieurs tubes à PCR (fonction du nombre d'échantillons D'ARN à utiliser).

En fait dans notre cas, quatre (04) échantillons d'ARN ont servi pour poursuivre cette expérience, et nous avons eu recours à des dilutions de concentrations requises pour la technique suivante qu'est la PCR qui requiert des concentrations allant de 1 à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ARN pour chaque échantillon.

Tube 1 : 2388 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 2,388 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; donc 1 μl suffira

Tube 2 : 917,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 0,9179 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; donc 1,5 μl suffira

Tube 3 : 1463,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 1,463 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; donc 1 μl suffira

Tube 4 : 1360,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 1,360 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; donc 1 μl suffira

Aux tubes 1, 3 et 4 le mélange des réactifs est le suivant :

ARN.....1 μl

Adaptateur primer (oligodT).....1 μl

RNase free H₂O.....10 μl

Volume total :.....12 μl

Le tube 2 aura comme mélange :

ARN.....1,5 μl

Adaptateur primer(oligodT).....1 μl

RNase free H₂O.....9,5µl

Volume total :.....12µl

On centrifuge brièvement l'ensemble des mélanges.

Les conditions de la PCR sont les suivantes :

1. 70°C pendant 10mn suivie d'une pause
2. 42°C pendant 5 mn suivie d'une pause
3. 42°C pendant 50 mn suivie d'une pause
4. 37°C pendant 20 mn .

Le mélange est incubé à 70°C pendant 10min, en utilisant l'appareil PCR . Les échantillons sont ensuite déposés rapidement sur la glace et centrifugés brièvement.

Ajouter à chacun des tubes 7 µl d'un mélange constitué de :

10xTampon PCR (Invitrogen™) :2 µl x 5 tubes (4+1pour le contrôle)

2mM Mgcl₂ (Invitrogen™) : 2 µl x 5 tubes

10 mM dNTP..... (Invitrogen™) : 1 µl x 5 tubes

0,1 M DTT..... (Invitrogen™) : 2 µl x 5 tubes

Volume total..... : 35 µl

Incuber le tout à 42°C pendant 5mn et de suite ajouter à chacun d'eux 1µl de la transcriptase inverse SuperScriptTMII (Invitrogen™).

L'incubation se poursuit à 42°C pour 50min.(A ce stade de la procédure on passe au double brin). Immédiatement après on laisse les mélanges sur de la glace, on ajoute à chacun d'eux 1 µl de RNase et on centrifuge brièvement, (et à ce stade on passe logiquement au simple brin).

On incube de nouveau à 37°C pendant 20mn et on garde l'ensemble à -20°C.L'ARN est maintenant sous forme d'ADNc simple brin, et il faut amplifier ces fragments d'ADNc par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

4.21 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

Pour la réaction PCR, les conditions ont été choisies en prenant en considération le gène à amplifier et la température d'hybridation (T_m) de chacune des amorces suivantes :

Nom de l'oligo	Séquence 5' 3' →	T _m :Température d'hybridation°C
----------------	------------------	---

E116Ksens	GGCTGGCGAGTCGAGAA	
	GCACATTCGTTTCATG(33)	72°C
E116Kanti	CATGAAACGAATGTGCTT	
	CTCGACTCGCCAGCC (33)	72°C
TrfBfor 1	GTNAAYACNYTNACNATH	
	AAYACNGCNACNGC (32)	67.3°C
TrfBfor2	GTNGCNTTYGGNAAAYGT	56.7°C
	NC (19)	
Primer-TrFB2	ACNAAYACNAAYGCNTTY	56.2°C
For1	TTYCA (23)	
Primer-TrFB2	GCNTTYTTYCARYTNGTN	54.2°C
For2	GA (20)	
* R, Y et N indiquent (A ou G), (C ou T), et (A, C, G ou T), respectivement		

Selon ce tableau dont les résultats émanent de chez Eurofins MWG Opéron, trois séquences terminales nucléotidiques primaires parmi les six obtenues ont été sélectionnées sur la base de la température d'hybridation (T_m). L'hybridation, ou ré hybridation, des brins d'ADN a lieu à une température comprise généralement entre 55°C et 65 °C.

Les séquences choisies ont donc concerné :

- TrfB1for2	GTNGCNTTYGGNAAYGTNNC (19 Nucléotides)	56.7°C
- Primer-TrFB2for1	ACNAAYACNAAYGCNTTYTTYCA (23 Nucléotides)	56.2°C
- Primer-TrFB2for2	GCNTTYTTYCARYTNGTNGA (20 Nucléotides)	54.2°C

Selon les protocoles (nombreux et variés), il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADNc.

Dans un premier temps, la Taq polymérase (ou par une autre ADN polymérase thermorésistante) catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice.

Ensuite, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc.

Nous avons utilisé pour cette étape de la réaction l'application standard dictée par Proméga et bien entendu la Taq DNA polymérase, ainsi que son tampon de réaction.

Le mélange d'amplification dont le volume total va faire 50 µl sera préparé pour 4 ADNc de truffe ,en présence chacun de 03 amorces choisies préalablement.On va donc prévoir 14 tubes de mélange d'amplification auxquels il faudra ajouter 02 autres tubes pour les contrôles positif et négatif.

Ce mélange d'amplification comprend :

- 2 µl d'ADNc (Pour 04 échantillons de truffe)
- 1 µl de l'amorce «forward primer»
- 47 µl d'un mélange dont le volume total de 658ml est constitué de :
 - 5xTampon de réaction de GoTaq vert ou incolore : 10 µl x 14 =140 µl
 - Mélange de nucléotides PCR (dNTPs d'Invitron)... : 1 µl x 14 =14 µl
 - Nucléase Free H2O(Invitron).....34.5 µl x 14 =483 µl
 - l'amorce R «reverse»(Reverse Primer)(Invitron)... : 1 µl x 14 =14 µl

-Taq DNA Polymérase (Poméga)..... : 1 μ l x 14 =14 μ l

Le tube de contrôle positif sera composé de :

-Amorce :1 μ l

-modèle d'ADNc :2 μ l

-47 μ l du mélange ci dessus.

-Le contrôle négatif sera composé de :

-TrFb2 For1 : 1 μ l

- 2 μ l H₂O

Le programme de la PCR qui se s'est déroulé à l'aide du thermocycleur (Biorad) est le suivant :

(1)Dénaturation initiale..... : 94°C pendant 2mn

(2)Dénaturation : 94°C pendant 1mn

(3)Hybridation des amorces :55°C pendant 30s (T°d'hybridation).

(4)Elongation..... :72°C pendant 1mn

(5)Revenir à l'étape (2) et prévoir 29 cycles (C'est ce qui se fait le plus souvent, entre 25 et 30 cycles).

(6)Extension finale..... :72°C pendant 5mn

(7)Fin : conserver les produits de la PCR à 4°C qui vont servir à la vérification sur gel d'Agarose à 1%.

Pour cette électrophorèse sur gel d'Agarose DS à 1%, nous avons prévu de créer 15 puits dont 14 vont servir aux produits de la PCR et 01 pour le marqueur d'ADN (M) qui fait 1Kb (Invitrogen™). Pour ce faire, 15 μ l de produit PCR est mélangé à 3 μ l de tampon de charge et déposé sur gel en présence d'un marqueur de poids moléculaire 1Kb (Invitrogen™).NB : Utiliser pour la préparation du gel de l'Agarose spécial (Le type DNA Grade).

Le gel est mis ensuite à 80v pendant 30mn. Après révélation sous UV ,on visualise le gel grâce au Gel Doc de Bio-Rad.

4.22 Production de Protéines Recombinantes :

En l'absence d'information sur la séquence primaire de la lectine de *truffe*, une stratégie a été mise en place pour l'obtention et le clonage de son gène à partir des ARNm extraits à partir de la truffe elle-même. La production d'ADNc a été réalisée par des techniques décrites précédemment. Ensuite,

les gènes spécifiques de lectines obtenus vont être clonés dans le vecteur d'expression Pet29₂ afin de permettre l'expression de la protéine recombinante par *Escherichia coli*.

Une protéine recombinante est qualifiée ainsi dans la mesure où elle est produite de manière exogène dans une cellule dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. Ce processus s'appuie sur :

- l'emploi d'un vecteur transportant le gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée.
- L'utilisation d'une cellule hôte qui sera chargée de synthétiser la protéine via le gène inséré.
- Des phases de production, de séparation et d'extraction de la protéine de la cellule hôte dans laquelle elle a été produite.

La synthèse de protéines recombinantes requiert de nombreuses étapes. Il est tout d'abord nécessaire de choisir un hôte, chargé de produire les protéines désirées. Le choix est relativement vaste, cependant il semble plus facile de montrer la stratégie de production chez un hôte bien connu tel qu'*Escherichia coli*. Le gène d'intérêt va donc être cloné dans un vecteur plasmidique d'expression après avoir été amplifié par PCR.

Il ne faut pas pour autant négliger les autres types de cellules hôtes telles que : les levures, les cellules d'insecte, les cellules de mammifère, ou même les plantes transgéniques.

Ces dernières ne constituent encore qu'un modèle de laboratoire, contrairement aux levures et cellules animales. Les levures présentent l'avantage de permettre certaines modifications post-traductionnelles, mais pas toutes. Les cellules d'insecte sont très utilisées, permettant une maturation correcte et un haut rendement, mais les conditions de culture sont coûteuses.

Enfin, les cellules de mammifères permettent l'expression de protéines complexes d'eucaryotes supérieurs, et on connaît assez bien les vecteurs (viraux, plasmidiques), mais ce type de système nécessite beaucoup de temps pour produire des quantités importantes. La solution la plus simple consiste en fait à utiliser les cellules procaryotes, notamment *E. coli*.

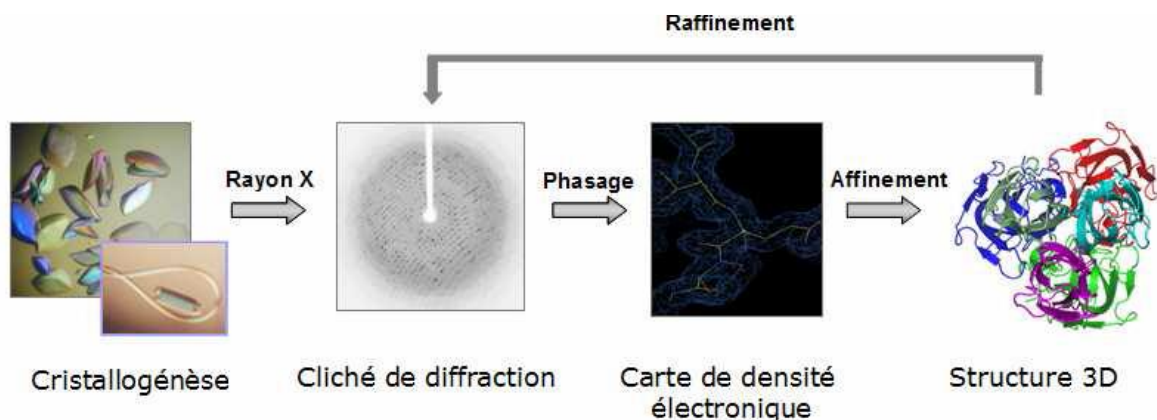
Nous avons donc privilégié le système hôte bactérien, notamment *Escherichia coli*. La facilité d'utilisation, de culture et l'étendue des connaissances de cet organisme, sans négliger l'aspect économique en font le système le plus exploité par les laboratoires.

D'autres systèmes de production prometteurs sont en cours de développement, ceux-ci pourraient permettre d'accéder à des protéines plus élaborées et plus faciles à extraire.

Cette protéine recombinante de la lectine de truffe ainsi que leurs structures cristallographiques et le génome obtenus ont été réalisés par le Docteur Annabelle Varrot et le Docteur Soorej Basheer.

4.23 La Cristallographie : Cristallisation de complexes lectine –sucres en plaques multi-puits.

Cette technique nous a été utile en fin de purification .Elle nous a permis de cristalliser notre lectine , et déterminer la structure 3-D ,en obtenant la première structure cristalline de la lectine de truffe du Sahara Algérien.(Terfezia Boudiéri). La Figure ci dessous montre les principales étapes du processus de détermination de la structure 3-D d'une protéine par cristallographie.



4.24 La cristallogénèse :

C'est un procédé dont le but est la recherche des conditions les meilleures (optimales) dans lesquelles les protéines (nos lectines) vont s'organiser dans l'espace sous forme d'un cristal. En fait elles vont passer d'un état liquide désordonné à un état solide ordonné. Pendant toute la durée de la cristallisation, la solubilité de la solution protéique diminue, par un procédé d'évaporation contrôlée, jusqu'à atteindre l'état de super saturation favorable à la formation de cristaux. La solubilité d'une protéine est fonction de nombreux paramètres tels que sa concentration, le PH, la T°, la force ionique, l'effet d'additifs etc.....

Le Cristal s'il est obtenu, est un motif moléculaire répété par translation le long du réseau cristallin qui s'appellera alors maille cristalline. Elle correspond à une molécule protéique ou à une sous unité.

4.25 La cristallographie aux rayons X

Pour observer un objet de petite taille nous utilisons habituellement un microscope. Cependant, cette technique n'est pas assez puissante pour observer une protéine car la longueur d'onde de la lumière est plus grande que l'objet étudié. Il est donc nécessaire d'utiliser un

rayonnement dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de l'objet étudié pour observer l'arrangement des atomes constituant les macromolécules. Les distances interatomiques dans une molécule étant de l'ordre de l'Angström (10-10 nm), les rayons X, ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de l'Angström, sont donc propices à l'étude des protéines. Malheureusement, l'interaction entre les rayons X et une molécule génère un signal trop faible pour être mesuré. Il est donc nécessaire de l'amplifier en utilisant un cristal de protéines, dans lequel les molécules sont empilées de manière ordonnée. Cela permet aux ondes diffractées d'être cohérentes et de s'additionner afin d'avoir une intensité suffisamment forte pour être observable.

4.26 Cristallogénèse :La diffusion de vapeur

La formation d'un cristal consiste en un arrangement organisé d'une protéine. Afin d'obtenir cet état, il faut amener la solution de protéine à la limite de la précipitation. En théorie, la précipitation apparaît lorsque la concentration en protéine ainsi que celle de la solution de précipitation dépassent un certain seuil, comme le montre le diagramme de phase (Figure 9). La formation d'un cristal se fait en deux étapes : la nucléation puis la croissance. Le point de nucléation correspond à l'organisation de départ où démarre-la croissance du cristal. Une technique largement répandue qui permet d'obtenir des cristaux est la diffusion de vapeur. Une solution purifiée de protéine est mise en contact avec une solution de précipitation afin de former une goutte qui sera déposée sur une lamelle, c'est la technique de la goutte suspendue (Figure 10). La goutte peut aussi être déposée dans un puits sur une plateforme surélevée, on appelle alors cela la technique de la goutte assise. Dans les deux cas, le puits est scellé hermétiquement. Le volume de la goutte est généralement compris entre 0.2 à 10 μ l.

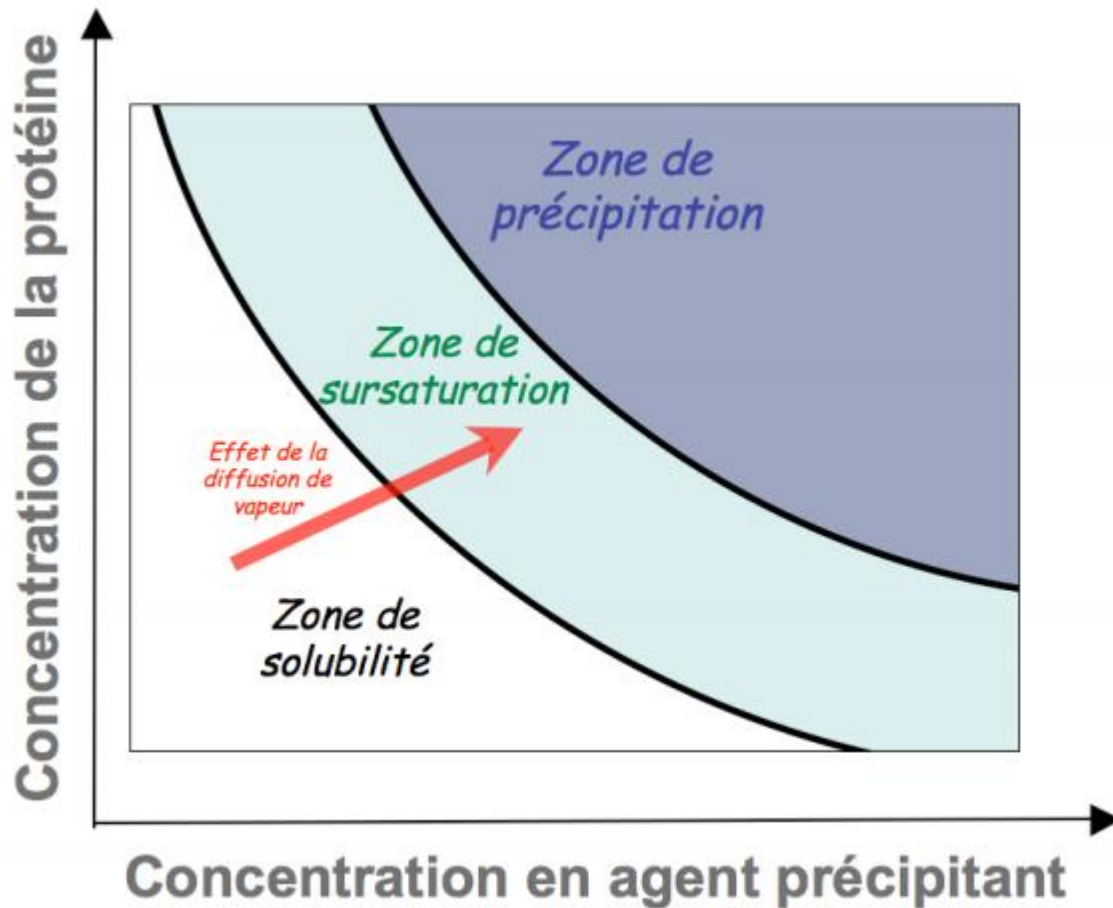


Fig 9: Diagramme de phase décrivant le processus de cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur.

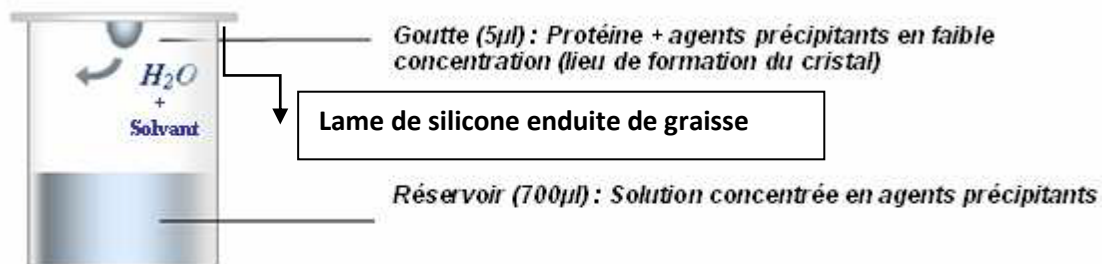


Fig 10 : Technique de la goutte suspendue par diffusion de vapeur

Initialement, le mélange protéine/précipitant contient une plus grande quantité d'eau qui sera échangée par diffusion de vapeur avec le milieu environnant afin d'atteindre l'équilibre. En perdant de l'eau, la concentration de la protéine dans la goutte augmente.

Ainsi, la solution protéique passe de l'état 1 sur le diagramme de phase à l'état 2, ce qui favorise la formation de points de nucléation. Cela entraîne une diminution de la concentration en protéine ; la zone 3, où les cristaux peuvent grossir, est alors atteinte. De nombreuses variables influencent la formation des cristaux telles que la pureté de la protéine, sa concentration, le précipitant ainsi que sa concentration, le pH ou encore la température.

4.26.1 Obtention de complexes

Afin d'obtenir des cristaux contenant le ligand à étudier, deux techniques sont utilisées. La co-cristallisation est une méthode dans laquelle le ligand est mis en présence de la protéine avant de réaliser les gouttes. Autrement, la méthode dite de trempage consiste à

obtenir des cristaux de la protéine et de les tremper ensuite dans une solution contenant le ligand. La molécule diffuse ainsi au travers du cristal et se fixe dans son site. Cela est en effet possible car au sein du cristal la quantité d'eau reste malgré tout importante (entre 30 à 70%) et permet aux protéines cristallisées de conserver leurs propriétés biologiques. Toutefois, cette technique n'est possible que si l'empilement cristallin permet la diffusion du ligand au niveau du site de fixation.

4.26.2 Conservation des cristaux

Une fois qu'un cristal a été obtenu, il faut le mettre sur un support afin de le positionner devant le faisceau de rayons X. De nos jours, on les met dans une boucle placée sous un flux d'azote liquide. La congélation du cristal à très basse température dans l'azote liquide permet de protéger le cristal contre les dommages dus aux radiations. Cependant, quelques précautions sont à prendre. En effet, lors de cette étape et en l'absence d'une solution dite cryoprotectante (glycérol ou polyéthylènes glycols de petit poids moléculaire), des cristaux de glace vont se former et détruire le cristal. Il est donc nécessaire d'utiliser un cryoprotectant, qui peut être présent initialement dans la solution de précipitation ou bien ajouté à la solution de précipitation. Dans ce dernier cas, le cristal est tout d'abord trempé dans le mélange de cryoprotection avant d'être plongé dans le bain d'azote liquide. La proportion varie en fonction de la solution de précipitation (5-35%). Si la congélation est de

bonne qualité, de la glace vitreuse est formée et le liquide contenu dans la boucle reste translucide.

4.28 Diffraction aux Rayons X :

Le principe de la diffraction aux rayons X par un cristal de protéine

Comme nous l'avons vu, il est nécessaire d'amplifier la source pour obtenir un signal. C'est pour cela que nous utilisons un cristal de protéine, car il est formé par la répétition périodique d'un motif géométrique dans les trois directions de l'espace. Le plus petit volume translaté dans les trois directions de l'espace et qui permet de former le cristal est appelé maille élémentaire. Elle est définie par trois vecteurs $a, b, et c$ non colinéaires et trois angles notés α, β, γ (Figure 11). La périodicité de la structure d'un cristal est représentée par un ensemble de points disposés régulièrement. Cet ensemble est appelé réseau cristallin et les points le constituant sont appelés nœuds du réseau.

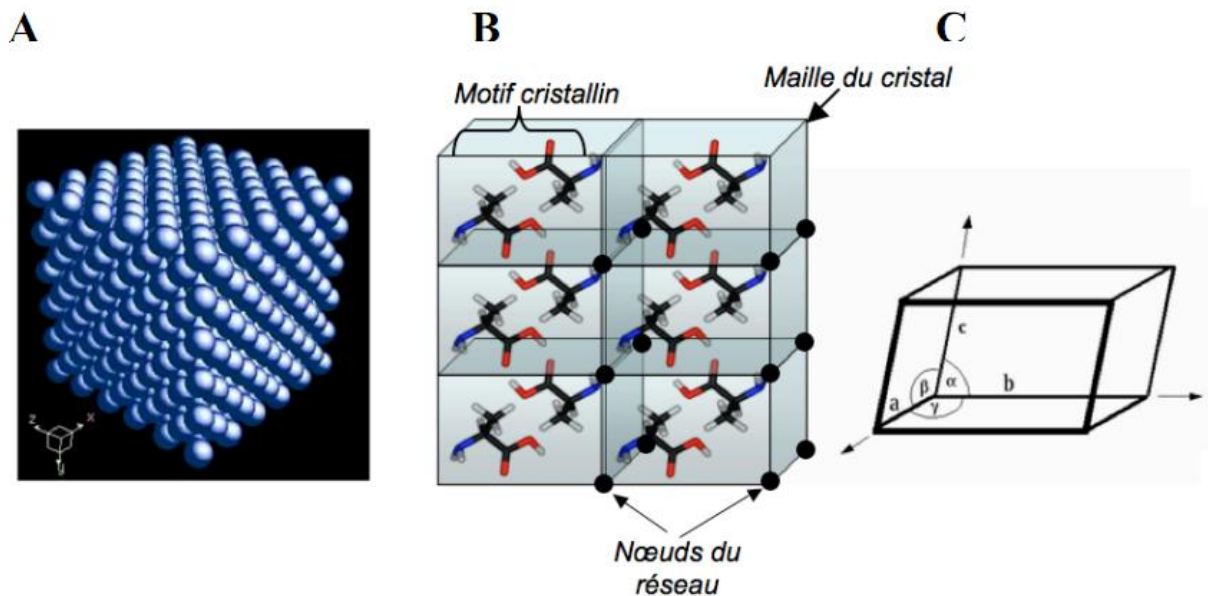


Figure 11 : A. Modèle de cristal en trois dimensions. B. Représentation mathématique du cristal. C. Maille élémentaire avec les six paramètres la caractérisant.

Il existe 14 types de mailles élémentaires différentes pour décrire l'arrangement des points dans un espace à trois dimensions. Ces différents arrangements sont connus sous le nom de réseaux de Bravais. Des opérations de symétries (rotation autour d'un axe, inversion et réflexion) peuvent être

appliquées dans la maille. Les 32 groupes de symétrie combinés aux 14 réseaux de Bravais et à des translations mineures forment les 230 groupes d'espaces qui

représentent toutes les combinaisons d'opérations de symétrie applicables au motif cristallin.

Le motif cristallin regroupe l'ensemble des répétitions de la maille pour former la structure cristalline. Les protéines étant des molécules chirales, les opérations de symétrie de type réflexion et inversion ne peuvent exister dans leurs cristaux, ce qui réduit à 65 le nombre de

groupes d'espaces possibles en cristallographie des protéines. L'unité asymétrique constitue la plus petite unité moléculaire qui permet de reconstituer la maille par symétrie. Elle peut être formée d'une molécule ou d'un groupe de molécules.

Lorsqu'un cristal est placé dans un faisceau de rayons X, le rayonnement interagit avec les électrons de la protéine ce qui va se traduire par une diffusion de ce rayonnement dans toutes les directions de l'espace. La présence du réseau cristallin génère à certains endroits de l'espace des ondes qui vont s'annuler (interférences destructives) et, dans d'autres directions, des ondes s'additionnant (interférences constructives). Ces dernières donnent

naissance au diagramme de diffraction où les faisceaux diffractés sont enregistrés. Celui-ci contient toutes les informations nécessaires sur les paramètres de mailles et la symétrie du cristal.

C'est au début du XX^{ème} siècle que Bragg et Laue ont formulés les bases mathématiques qui caractérisent le processus de diffraction. Bragg a montré que le phénomène de diffraction observé dans un cristal pouvait être considéré comme la réflexion du faisceau incident par une série de plans parallèles et équidistant (les plans réticulaires du cristal), comme le ferait une série de miroirs. Ces plans, également appelés plans de Bragg, coupent le cristal dans toutes les directions et passent par les différents nœuds du réseau.

Chaque ensemble de plans est identifié par les indices de Miller hkl . Bragg a montré qu'un ensemble de plans parallèles, d'indice hkl et de distance inter-planaire d_{hkl} , produisent un rayon diffracté avec un angle θ lorsqu'un rayon X de longueur d'onde λ rencontre les plans

avec le même angle θ et qu'il rencontre les conditions géométriques suivantes :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

- λ est la longueur d'onde du faisceau incident

- θ est l'angle du faisceau incident

- d_{hkl} est la distance inter-planaire.

Ainsi, lorsque les rayons X frappent les plans parallèles suivant cette équation géométrique avec un (n) entier, un ensemble d'interférences constructives, qui s'additionnent, sont produites, formant alors une tache de diffraction (ou réflexion). En revanche, si la condition n'est pas satisfaite, des interférences destructives sont produites. La position de chaque tache présente sur les clichés de diffraction fait référence à une famille de plan réticulaire et est définie par ses indices de Miller hkl . Le cliché de diffraction est appelé espace réciproque par opposition à l'espace réel du cristal.

4.28.2 Le traitement des données

Sur une ligne de lumière d'un synchrotron de troisième génération tel que l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) à Grenoble, les cristaux préalablement congelés sont montés sur un goniomètre où ils sont soumis à un flux permanent d'azote liquide qui les maintiennent à 100°K tout au long de l'expérience. Pendant la collecte, le cristal est en rotation autour d'un axe perpendiculaire au faisceau de rayon X et des images sont prises suivant un pas allant de 0.1 à plusieurs degrés. Les rayons diffractés sont collectés par un détecteur électronique de type CCD de haute sensibilité capable d'enregistrer un grand nombre de réflexions en un temps très court. Chaque image, appelée cliché de diffraction, correspond à une tranche de l'espace réciproque.

Après avoir mis à l'échelle le jeu des données collectées après les clichés de diffraction, viendra ensuite la construction du modèle, son affinement en comparant tous les paramètres structuraux du modèle par rapport aux structures typiques des protéiques avec les logiciels PROCHECK ou WHATIF (56). La structure peut enfin être déposée dans la base de données internationale : RCSB Protein data Bank (57).

4.29 Effet Immunomodulateur des lectines :

Afin d'apprécier l'activité immunomodulatrice éventuelle de nos lectines, nous avons utilisé un lot de 28 Souris albinos Wistar adultes appartenant à la race Albinos, et provenant de l'animalerie de la Faculté de Médecine de Constantine. Les 28 souris sont placées dans un environnement à température ambiante de 25°C durant toute notre période expérimentale et séparées en 4 lots différents A, B, C et un lot témoin (T).

168 g de Terfezia Boudiéri sont rendus en poudre dans un mortier en présence d'Azote liquide. La poudre sèche est incubée dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2)

pour environ 12h à 4 ° C. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000xg pendant 20 min, le surnageant est ensuite appliqué sur une Chromatographie sur gel de dextran G-75. Les fractions contenant des lectines , après vérification de leur pouvoir agglutinant, sont dialysées,et lyophilisées.

Chacun des lots comprenant 7 souris a été choisi d'une manière aléatoire.

Une solution d'échantillon à analyser (lyophilisat de lectines) dissoute dans du NaCl à 0.9% est injectée aux 21 souris des trois lots (A, B et C) par voie intra péritonéale selon les doses suivantes : 10mg/kg ; 30mg/kg ; 50mg/kg. Le quatrième lot ; le témoin(T), ne recevra que 0.5ml d'NaCl à 0.9%.

Les différentes doses injectées aux souris sont calculés selon le poids corporel de chaque souris.

48heures après la première injection, une deuxième leur sera faite à raison de 0.1ml/10g du poids de la souris au travers de la veine caudale, contenant une solution de carbone composée de : (3ml d'encre de chine, 4ml d'NaCl à 0.9% et 4ml de gélatine a 3%).

4.29.1 Prélèvements sanguins :

Deux prélèvements sanguins par voie oculaire après 5 et 15min d'intervalle sont réalisés. Le sang va être collecté grâce à des tubes capillaires dans des tubes secs contenant du Na₂CO₃ 0,1% à raison de 14 gouttes de sang dans 4ml d'Na₂CO₂ 0,1% dans chaque tube.

La lecture de l'absorbance des différents tubes dans un spectrophotomètre visible sera mesurée à une longueur d'onde de 675nm.

4.29.2 Activité phagocytaire :

L'activité phagocytaire exprimée par l'index phagocytaire K, nous renseigne sur la fonction de l'ensemble des cellules du système réticulo-endothélial au contact du sang circulant en présence d'un corps étranger (Encre de chine contenant du carbone).L'activité phagocytaire sera mesurée d'après la cinétique (vitesse) de l'épuration sanguine du carbone colloïdal (vitesse de disparition du carbone du sang).

Le taux de clairance exprimé par la période de demi-vie du carbone dans le sang (t_{1/2}, min) ; ainsi que les activités phagocytaires K, sont calculées d'après les formules de (Biozzi et al, 1953) (9) :

$$K = \frac{\ln OD_1 - \ln OD_2}{t_2 - t_1}, \quad t_{1/2} = \frac{0,963}{k}$$

OD1 et OD2 sont les densités optiques mesurées à partir des fractions sanguines recueillies après 5mn et 15mn.

4.29.3 Analyse statistique :

Les résultats de l'activité phagocytaire et le taux de clearance du carbone sont représentés sous forme de moyennes et écart-types. Le traitement statistique est réalisé par le biais du test One-Way ANOVA (logiciel Minitab version 17.0), pour étudier la différence entre les groupes (04 lots).

Cette différence sera considérée selon un risque d'erreur (p) comme :

*Non significative si $p > 0,05$.

*Significative si $0,05 > p > 0,01$.

*Hautement significative si $0,01 > p > 0,001$.

*Très hautement significative si $p < 0,001$.

5- Résultats et Discussions

5.1 Étude des propriétés d'hémagglutination :

Afin de tester l'activité lectinique de nos truffes, des expériences d'hémagglutination sur des érythrocytes de lapin ont été réalisées (Figure 12). Dans cette approche, pour une concentration de départ définie, l'unité d'hémagglutination (UH) est définie comme le facteur de dilution à partir de

laquelle l'hémagglutination n'est plus observée. La figure 9 nous montre 03 essais réalisés sur micro-plaques à des moments différents :


La première met en évidence une agglutination des érythrocytes de lapin en présence des lectines de l'homogénat de truffe au niveau de la dilution 64, dont l'unité d'hémagglutination (UH) obtenue est de 113,75 µg/µl.

Les résultats obtenus pour le dosage de l'hémagglutination pour la lectine TbFBL1 et la lectine TbFBL2 sont mises en évidence sur les micro-plaques de droite et de gauche.

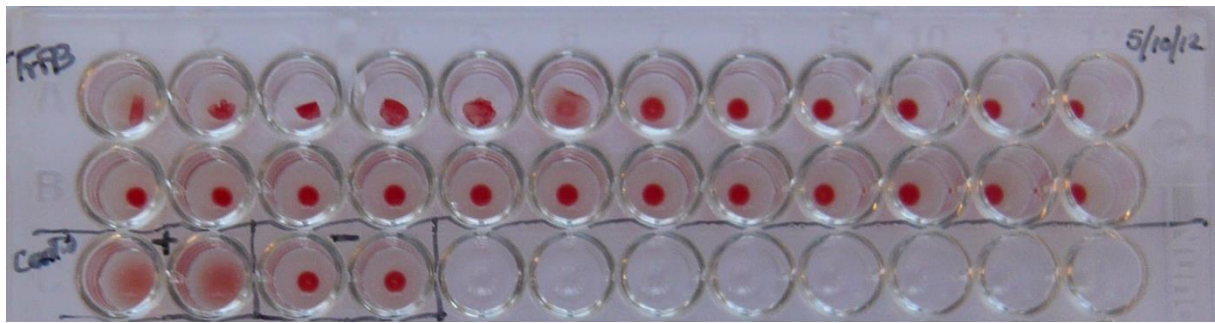
Les résultats montrent que ces glycoprotéines possèdent des propriétés d'hémagglutination assez intéressantes car pouvant causer une hémagglutination des érythrocytes de lapin à partir de 3.5µg/ml (TrFBL1) ,qui est une lectine obtenue après purification par chromatographie d'Affinité sur colonne de Mannose,et (TrFBL2),qui est une lectine obtenue celle ci par chromatographie d'Affinité sur colonne de Nacétyl-glucosamine et pouvant causer une hémagglutination des érythrocytes de lapin à partir d'une concentration beaucoup moins élevée, soit 0.9

Dilution des protéines en (mg/ml) à 280nm

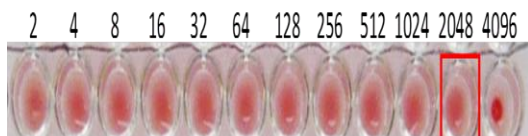
2	3,64	1024	0,00710938
4	1,82	2048	0,00355469
8	0,91	4096	0,00177734
16	0,455		
32	0,2275		
64	0,11375		
128	0,056875		
256	0,0284375		
512	0,01421875		



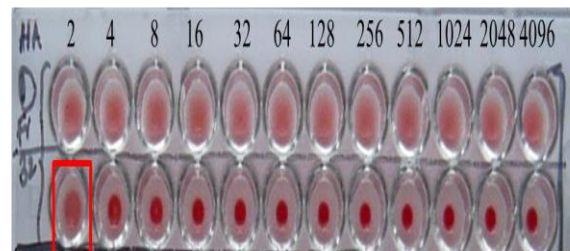
 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048 4096



Hemagglutination Assay



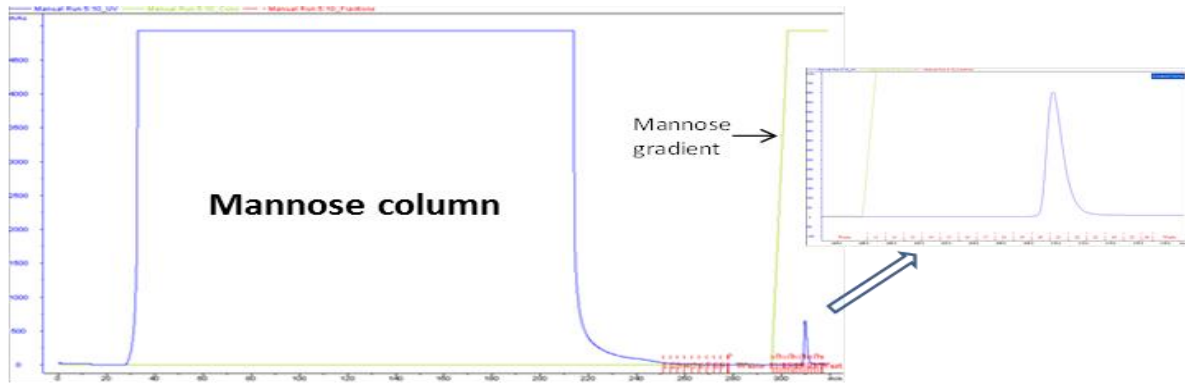
$3.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ TbFBL1 can cause hemagglutination



8192 16384 ... $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ TbFBL2 can cause hemagglutination

Fig 12 : Hémagglutination des érythrocytes de lapin par la lectine de *Terfezia boudiéri* (-) contrôle sans lectine, (+) contrôle avec lectine

5.2 Purification par Chromatographie D’Affinité sur colonne FPLC(AktaPrime plus) :



TbFBL1
 (T-*Terfezia*; b-*boudieri*; FB-fruited body; L-lectin)
Yield = 6 mg/100 g of truffle

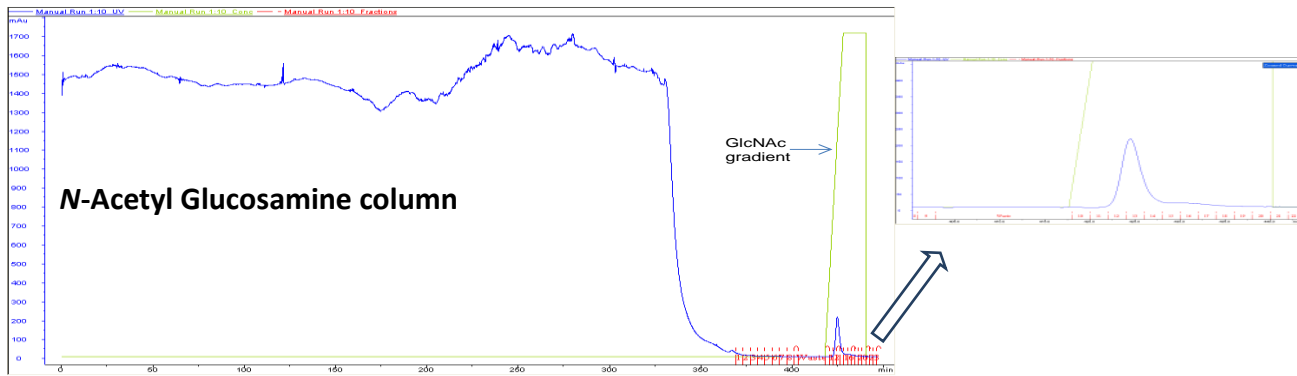
Fig13 :Chromatographie d'affinité sur colonne de Mannose-Agarose (1.5cmx5cm). Colonne lavée et équilibrée avec un tampon(A) 20 mM Tris PH= 7.5,100 mM.NaCl, avec un débit de 1ml/mn. Les Protéines non spécifiques du mannose sont éluées grâce à un tampon(B) 20mM Tris PH7.5 ,1.5M NaCl. L'éluion aura lieu par compétition dans un tampon à forte concentration en mannose 10 fois supérieure, soit 200 mMolaire.

NB :Couleur bleue :Pour l'Absorption dans l'UV , Couleur rouge :Pour la Conductimétrie

Couleur verte :Pour la Concentration

Le pic majeur désigné par la flèche (Fig13) correspond en principe à notre lectine que nous avons désigné par TrFBL1 et qui est repérée entre les volumes d'éluion se situant entre les tubes 13 et 19.

Pour cette deuxième étape de la procédure, après calcul des Densites optiques et des concentrations, le rendement que l'on à enregistré est de 6mg/100g de truffe de départ.



TbFBL2

(T-*Terfezia*; b-*boudieri*; FB-fruited body; L-lectin)

Yield =4 mg/100 g of truffle

Fig14 : Profil d'élué de l'homogénat après la chromatographie d'affinité sur gel d'agarose à N-acétylglucosamine (1.5cmx5cm). Colonne lavée et équilibrée avec un tampon (A) 20 mM Tris PH= 7.5, 100 mM NaCl, avec un débit de 1ml/mn. Les protéines non spécifiques du N-acétylglucosamine sont éluées grâce à un tampon (B) 20mM Tris PH7.5, 1.5M NaCl. L'élué aura lieu par compétition dans un tampon à forte concentration en N-acétylglucosamine 10 fois supérieure, soit 200 mMolaire.

Le seul pic (fig 14) repéré à l'achèvement de la chromatographie d'affinité sur gel d'agarose à N-acétylglucosamine signalé par la flèche ci-dessus, est réparti entre les volumes d'élué des tubes 12 et 18, et correspond à une deuxième lectine que nous avons appelé TbFBL2.

Le rendement affiché pour cette troisième étape est de 4mg/100g de truffe.

Les lectines sont des glycoprotéines d'origine végétale, animale ou bactérienne reconnaissant spécifiquement des structures glycaniques, mais elles ne sont ni des enzymes, ni des anticorps (16).

Elles possèdent généralement deux sites de fixation aux glycanes et sont donc capables de précipiter les glycoconjugués (8), et d'agglutiner les cellules comme le font les immunoglobulines. Lors de la reconnaissance structurale, les chaînes glycaniques interagissent via des liaisons hydrogènes avec les chaînes polypeptidiques des lectines (58). Certaines lectines sont souvent et depuis longtemps utilisées comme ligands pour purifier des glycoconjugués par chromatographie d'affinité (59).

Les lectines TrFBL1 ET TrFBL2 présentent toutes les deux une forte affinité pour les groupes structuraux GlcNAc (Glucose N-acétylglucosamine) et mannose ou fucose (résultats confirmés par la spectrométrie de masse qui ont été réalisés par le Consortium CFG (Consortium for Functional Glycomics), USA) pour TrFBL1 et TrFBL2. Ces deux dernières sont retenues en totalité dans les colonnes d'affinité montrant ainsi qu'elles sont sous forme glycosylées. Dans notre étude, l'utilisation de la chromatographie d'affinité a permis de séparer, après ajout du tampon mannose ou

N-Acetylglucosaminé, nos lectines des autres composés (fractions non affines).

Elles seront ensuite mises en évidence par une réaction d'hémagglutination et une SDS-PAGE pour évaluer leur taux de pureté.

Contrôle de la Pureté par SDS-PAGE :

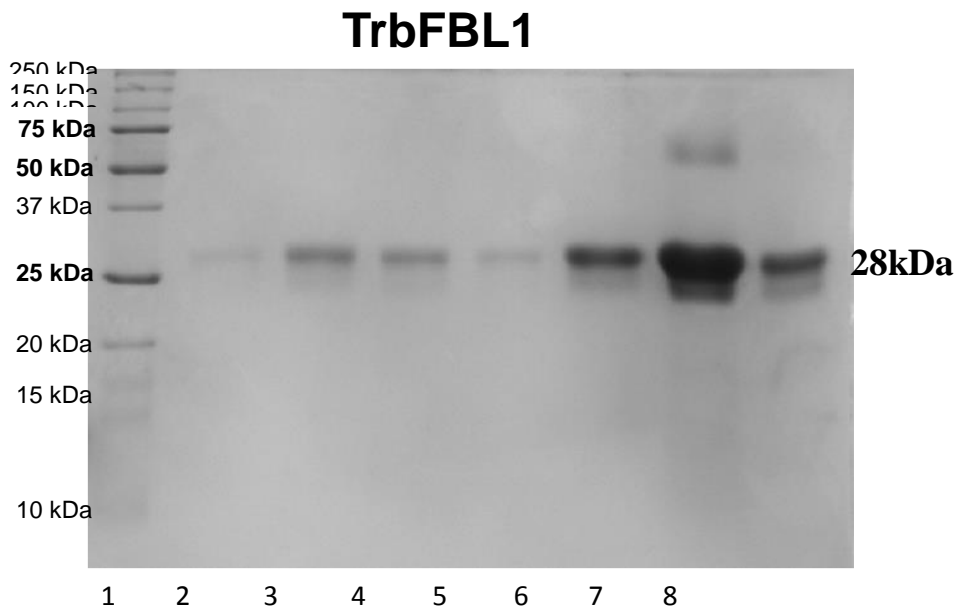


Fig 15 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec 15% de gel, des sept (07) fractions retenues de TbFBL1 , après la chromatographie sur colonne ayant une affinité pour le mannose. Ligne 1 : Marqueurs, Lignes 2 à 8 concernent les 07 fractions retenues après élution au tampon mannosé

La pureté et la masse moléculaire de la protéine ont été estimés par SDS-PAGE (en utilisant 15% acrylamide). L'estimation de la masse moléculaire de l'échantillon est effectuée en comparant avec la migration électrophorétique de la masse moléculaire standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaires connus (Precision Plus, protéine non colorés, Biorad) et analysés par un logiciel de (Biorad). Le poids moléculaire de TbFBL1 a été estimé à environ 28-30 kDa par ce procédé (fig15). Les échantillons, avec ou sans DTT, avec ou sans chauffage ont également été effectués sur SDS PAGE. Les résultats obtenus ont montré que TbFBL1 avait une masse moléculaire de ~ 60 kDa en conditions non dénaturantes / des conditions de non-chauffage, et dans des conditions de chauffage (100 ° C, 10 min) La masse moléculaire s'est révélée être d'environ 30 à 32 kDa (Fig16).

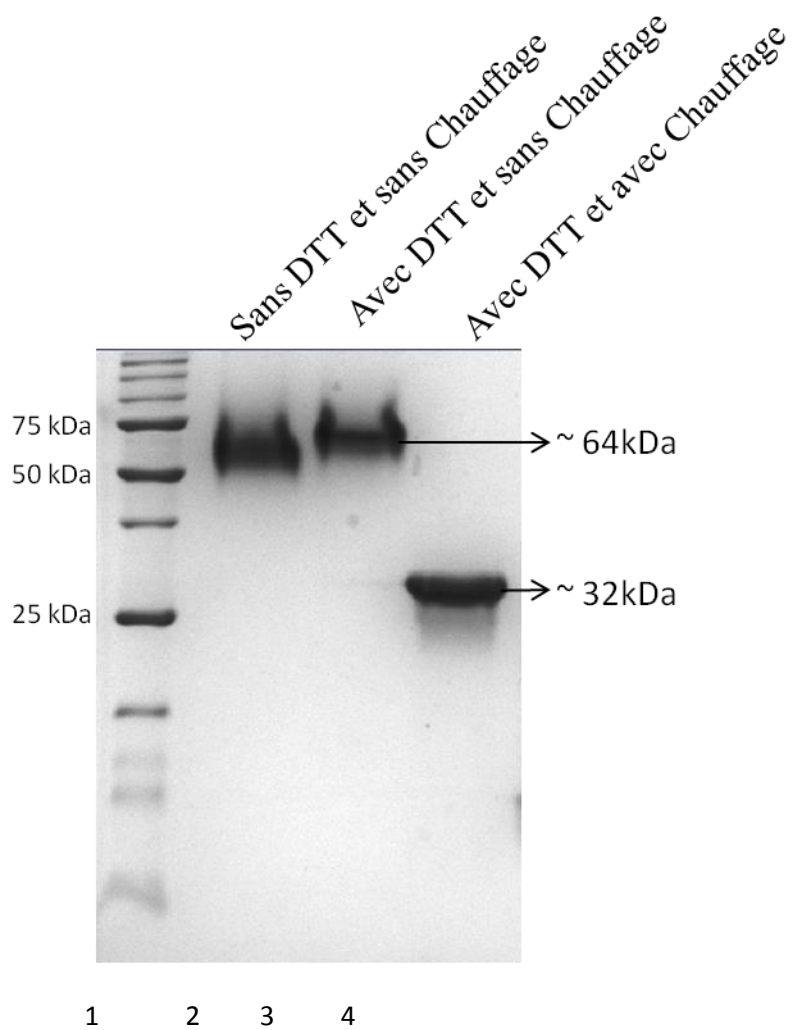


Fig16 : SDS-PAGE (15%) de gel montrant le profil de migration de TrFBL1 en conditions dénaturantes et non dénaturantes. Ligne 1 : Marqueurs, Ligne 2 : sans DTT et sans chauffage, Ligne 3 : avec DTT et sans chauffage, Ligne 4 : avec DTT et avec chauffage à 100°C pendant 10mn.

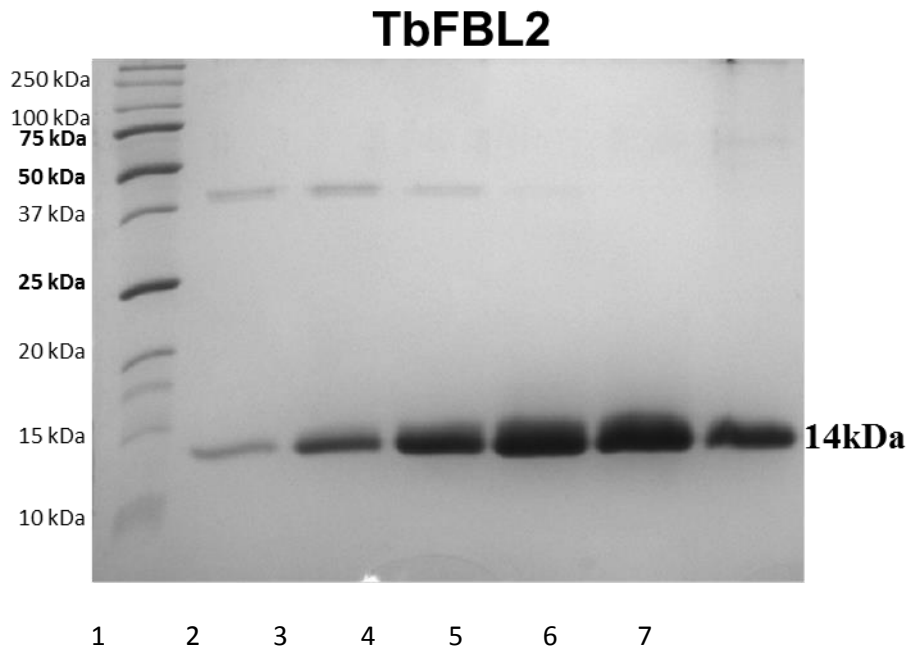


Fig 17 : : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec 15% de gel, des six (06) fractions retenues de TbFBL2 , après la chromatographie sur colonne ayant une affinité pour le N-Acétyleglucosamine.Ligne1 :Marqueurs,Lignes2 à7 concernent les 06 fractions retenues après élution au tampon B.

La pureté et la masse moléculaire de la protéine ont été estimé par SDS-PAGE (en utilisant 15% acrylamide).L'estimation de la masse moléculaire de l'échantillon est effectuée en comparant avec la migration électrophorétique de la masse moléculaire standard à l'aide d'un marqueur de poids moléculaires connus (Precision Plus, protéine non colorés, Biorad) et analysés par un logiciel de (Biorad). Le poids moléculaire de TbFBL2 a été estimé à environ 14 kDa par ce procédé (fig15 et fig 18). Les échantillons, avec ou sans DTT, avec ou sans chauffage ont également été effectués sur SDS PAGE. Les résultats obtenus ont montré que TbFBL1 avait une masse moléculaire de ~ 60 kDa en conditions non dénaturantes / des conditions de non-chauffage, et dans des conditions de chauffage (100 ° C, 10 min) La masse moléculaire s'est révélée être d'environ 30 à 32 kDa (Fig16).

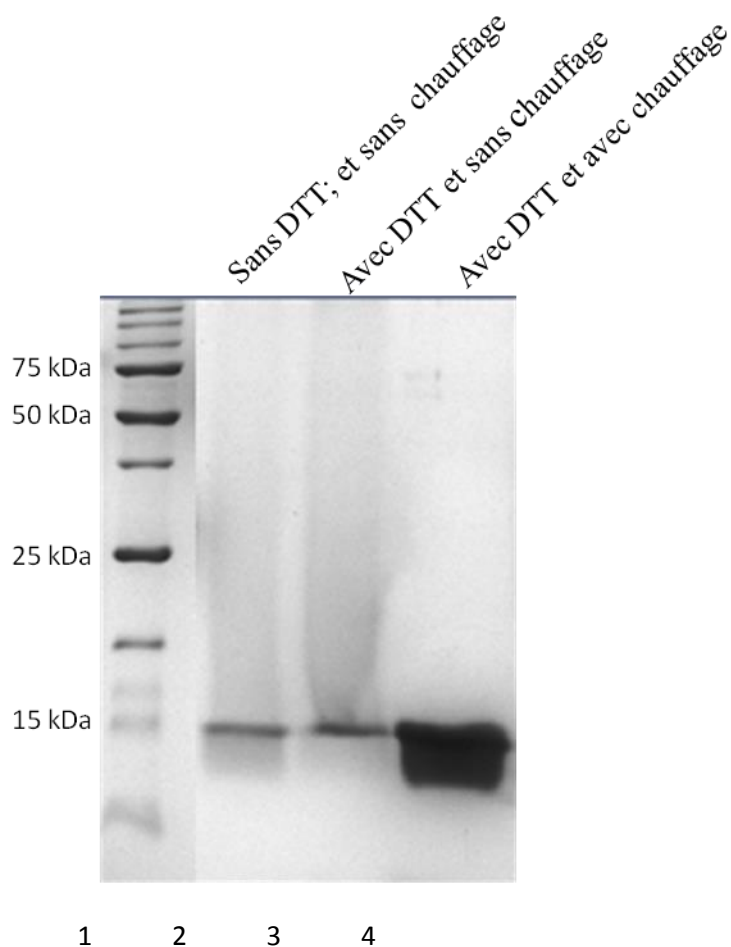


Fig18 : SDS-PAGE (15%) de gel montrant le profil de migration de TrFBL2 en conditions dénaturantes et non dénaturantes. Ligne 1 : Marqueurs, Ligne2 : sans DTT et sans chauffage, Ligne 3 :avec DTT et sans chauffage, Ligne 4 :avec DTT et avec chauffage à 100°C pendant 10mn.

5.3 Tests d'inhibition de l'hémagglutination des lectines TrFBL1 et TrFBL2 en présence de sucres :

Les sucres utilisés sont le fucose, le N-acétylglucosamine , le lactose , le mannose , le Galactose pour TrFBL1 et, le Fucose,le N-acétylglucosamine,l'acide sialique,le lactose,le galactose,le N-acétylgalactosamine et le Mannose à des concentrations chacun de 400mM dans 5 ml de tampon Tris Hcl 20 mM, Nacl 100 mM . Ces tests sont évidemment réalisés avec les fractions pures des lectines TrFBL1 retenues en fin de purification (fractions 12,13 et 14 de la FPLC GLcN-Ac) et TrFBL2

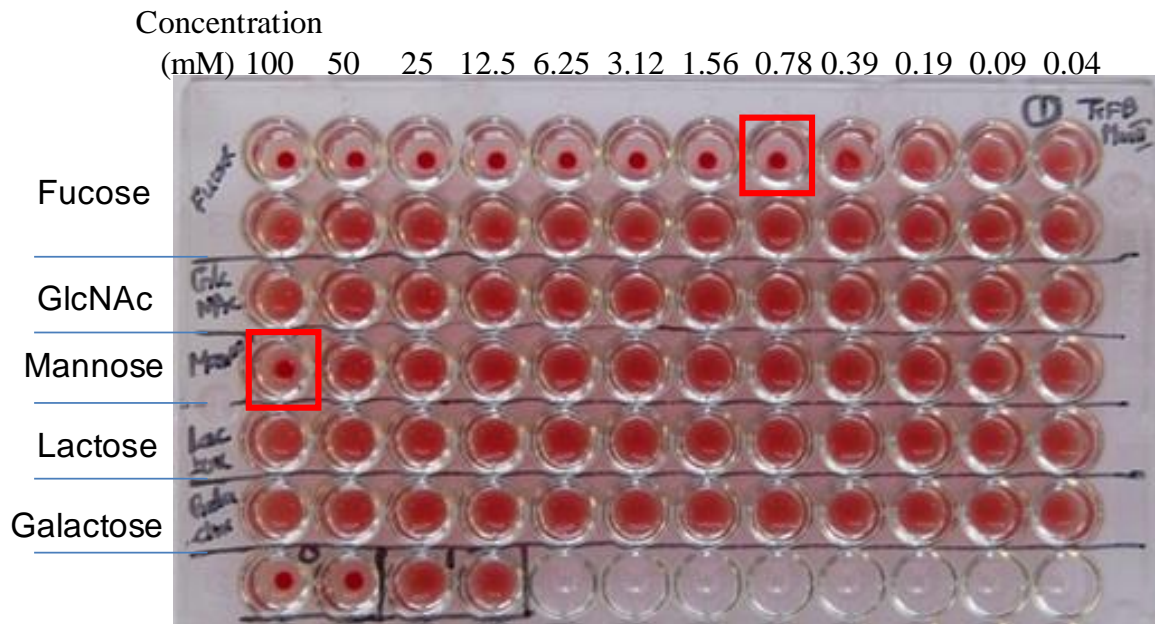


Fig19 :Test d'hémagglutination de **TrFB1** en présence de cinq sucres simples (Fucose,N-acétylglucosamine, Mannose, Lactose, et Galactose) .Le contrôle positif est issu d'une souche de pseudomonas Aérogénus .

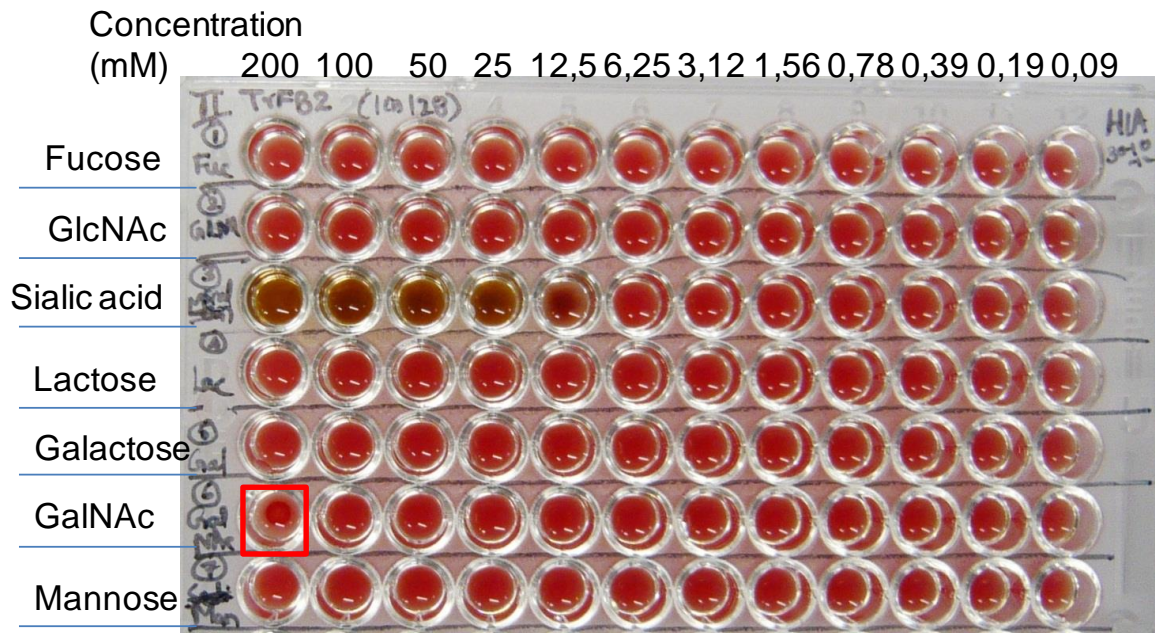


Fig 20 :Test d'hémagglutination de **TrFB2** en présence de sept sucres simples (Fucose,N-acétylglucosamine, Mannose, Lactose, Galactose , acide Sialique et N-Acétalgalactamine)

Les résultats observés à partir de ces tests d'inhibition en présence de sucres simples montrent à l'évidence que :

-Les deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 (Fig 19 et Fig 20) provoquent une hémagglutination des érythrocytes de lapin à toutes les concentrations, en présence de tous les sucres, hormis le cas du Fucose et dans une moindre mesure celui du Mannose concernant la lectine TrFBL1.

-la lectine TrFBL2 est insensible à la présence de tous les sucres simples mis en sa présence, et ne présente donc aucune spécificité envers tous ces oligosaccharides et sucres simples (Fig 20).

Il devient clair que la lectine TrFBL1 semble avoir une **spécificité** envers essentiellement le **Fucose** qui s'est lié sur son site actif ou encore appelé **Domaine de reconnaissance des Glucides**, et qui l'a empêché de provoquer une hémagglutination des érythrocytes jusqu'à une concentration équivalente à 0,39 mMolaire.

Cette capacité que possèdent de nombreuses sucres simples ou complexes conjugués à se lier d'une manière non covalente et réversible aux lectines ,et d'inhiber par voie d conséquence leur propriétés d'hémagglutination des érythrocytes est signalée dans plusieurs articles (59 ,60 et 61)

5.4 La spectrométrie de masse MALDI-TOF

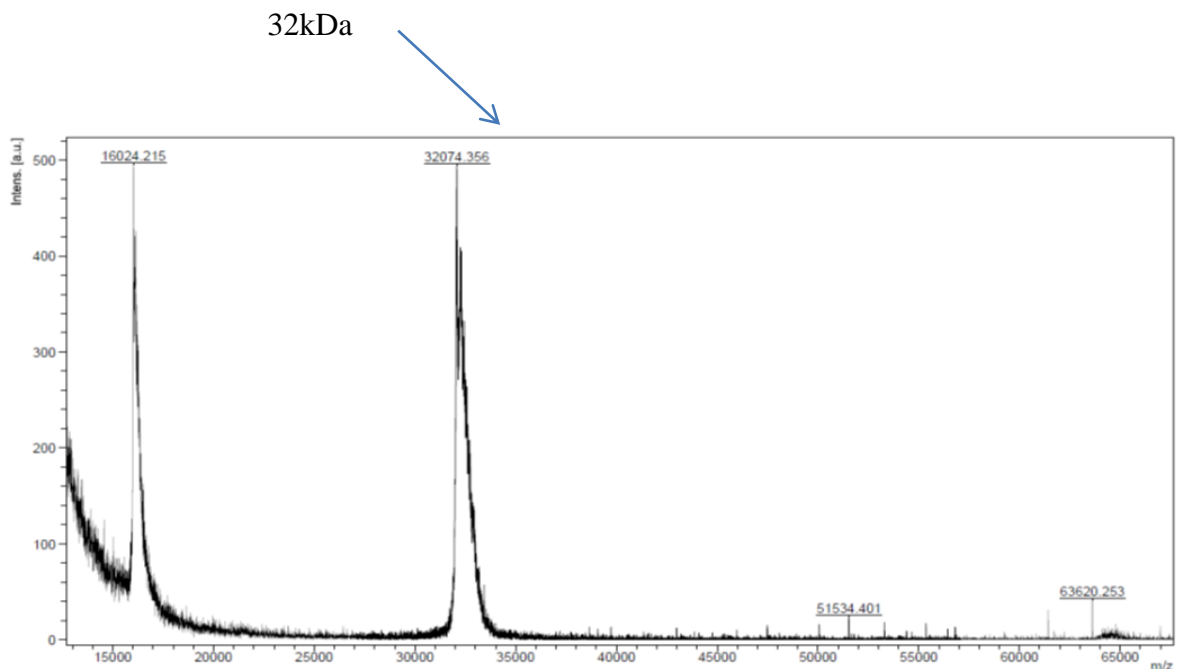


Fig 21 : Spectre de masse Maldi TrFBL1 (32kDa)

15.5kDa



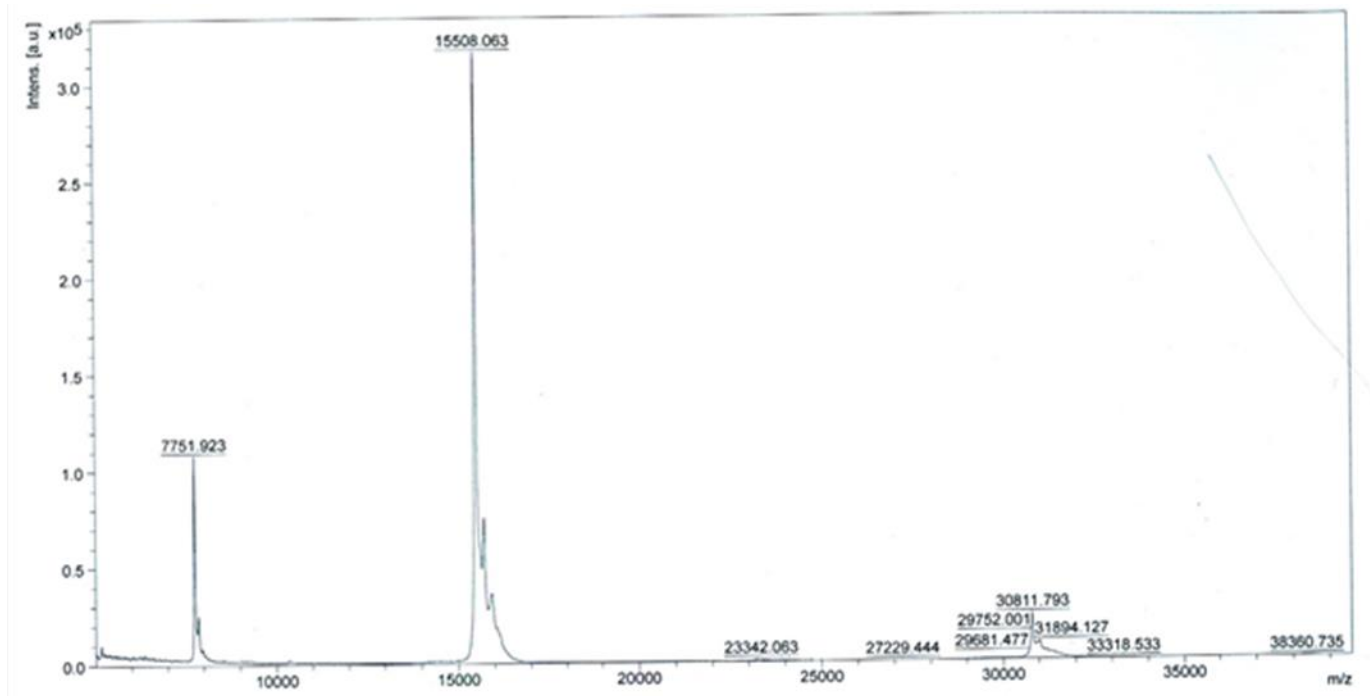


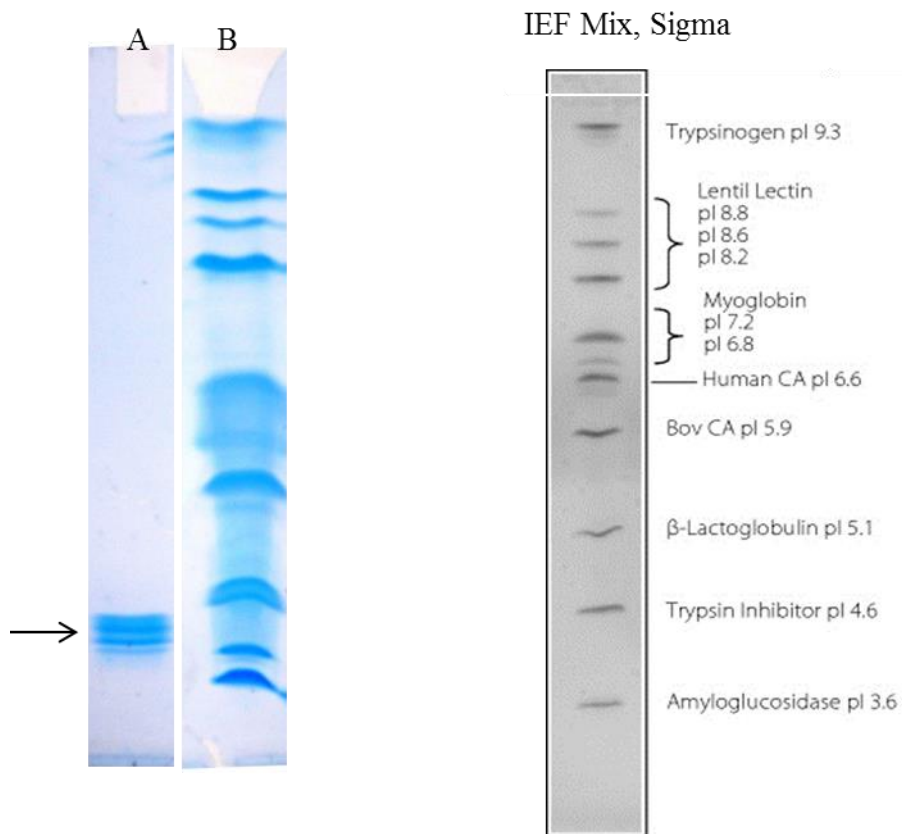
Fig 22 : Spectre de masse Maldi de TrFBL2 (15.5kDa)

Les spectres de masse Maldi obtenus pour respectivement pour les deux lectines montrent des espèces moléculaires dont les pics d'intensité sont les plus élevés, correspondent aux poids moléculaires avoisinant 32 kDa pour TrFBL1 (Fig 21) et 15.5kDa

(Fig 22) pour TrFBL2,et ces résultats viennent confirmer une fois de plus les résultats obtenus précédemment.

5.5 Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)

TbFBL1



pI value between 4 and 5

Fig 23: Electrofocalisation de TrFBL1 sur gel de polyacrylamide de Biorad (pH 3-10), les gadients de pH de ces gels ont été déterminées à partir des résultats d'essais effectués simultanément avec un kit de calibrage à large spectre des protéines (IEF Mix,Sigma).

TbFBL2

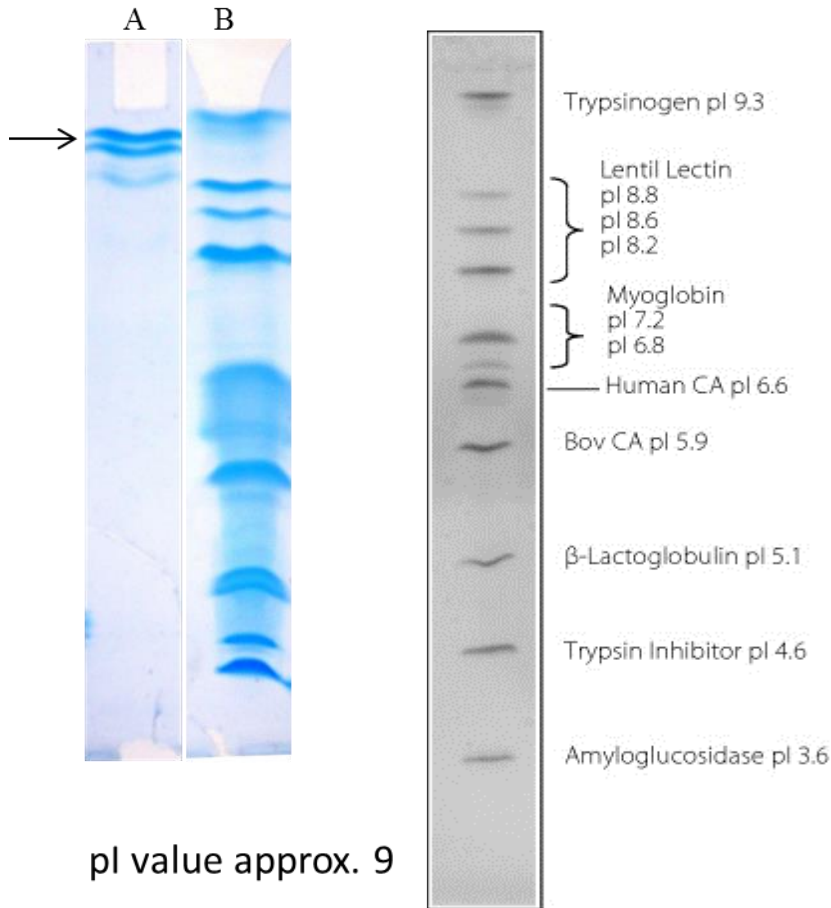


Fig 24 : Electrofocalisation de TrFBL2 sur gel de polyacrylamide de Biorad (pH 3-10), les gadients de pH de ces gels ont été déterminées à partir des résultats d'essais effectués simultanément avec un kit de calibrage à large spectre des protéines (IEF Mix,Sigma).

Les figures 23 et 24 indiquent un PHi pour la lectine TrFBL1 acide situé entre 4 et 5, et un PHi basique voisin de la valeur 9 pour TrFBL2.

5.6 Thermal Shift Assay (TSA) :Plateforme de criblage de thermostabilité des protéines par fluorescence.

Nous avons réalisé cette TSA dans différentes conditions de tampons et de PH afin de mieux apprécier la stabilité thermique de nos deux lectines purifiées TrFB1(32 kDa, spécifique du fucose) ,et la TrFB2 (16 kDa , spécifique du N-acétylglucosamine).

Les tampons et PH utilisés sont les suivants :

1-Tampon Acétate de Na 100 mM ,PH=4,5

2- Tampon Citrate de Na 100 mM , PH =5,6

3- Tampon Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique,sel de sodium. (Mes Na) 100 mM , PH =6,0

4-Tampon Cacodylate de sodium 100 mM , PH=6,5

5- Tampon Hépès 100 mM ,PH =7,0

6- Tampon Hépès 100 mM ,PH =7,5

7-Tampon Tris 100 mM PH=8,0

8-Tampon Tris 100 mM PH=7,5

Les courbes de fluorescence sont représentées sur un graphe donné par le Thermocycler BioRad/admin disponible au laboratoire du CERMAV de Grenoble, puis traitées par un logiciel afin de calculer la dérivée première de chaque point de ces courbes. Chaque courbe de fluorescence typique de dénaturation thermique d'une protéine présente une température de transition thermique, appelé T_m qui correspond au point d'inflexion de la courbe de fluorescence. Les tests sont effectués dans des microplaques de 48 puits (24 par échantillon) sur un volume de 25ul (12,5ul du tampon test + 7,5 ul de H₂O +5ul du Mix) par puits.

Les résultats obtenus sont les suivants :

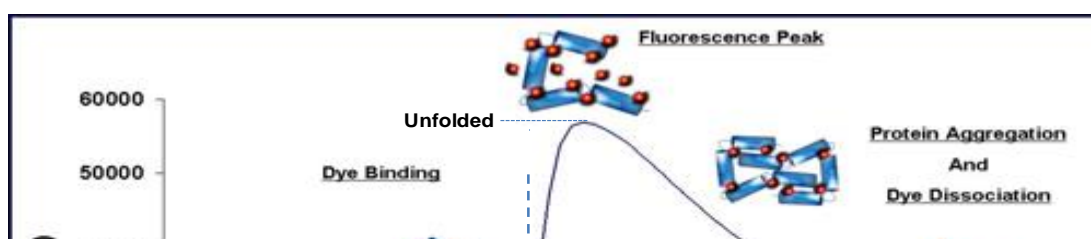


Fig25 :Profil de fluorescence d'une protéine : La température de fusion d'une protéine correspond à la température(T_m) autour de laquelle la protéine va se dénaturer. Plus la température de fusion est élevée, plus la protéine est considérée comme stable.

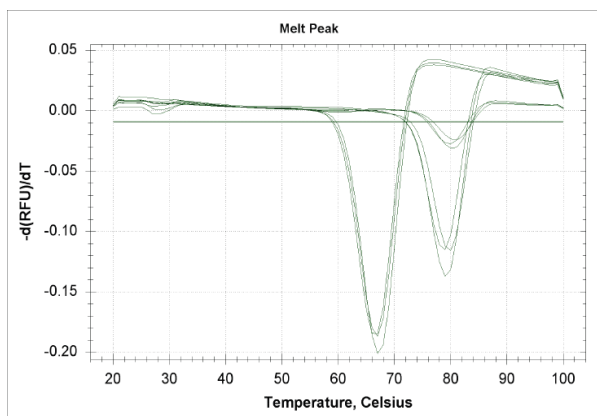


Fig26 :Profil des cinétiques de dénaturation de TrFBL1 et TrFBL2 mettant en évidence deux pics majeurs ,l'un à la $T_m=67^\circ\text{C}$ pour TrFBL1 et l'autre à $T_m=79^\circ\text{C}$ ou 80°C pourTrFBL2 réalisés sur PCR en temps réel programmé pour une variation de T° allant de 20°C à 100°C , avec un pas de 1°C par minute. Le Sypro Orange est excité à 470 nm et son émission est mesurée à 570 nm .

Tampon utilisé	Température de Fusion de TrFBL1
----------------	---------------------------------

Tris 50mM pH7,5, NaCl100mM	67°C
Tris 50mM pH 7,5	67°C
Tris 50mM pH7,5,NaCl 200mM	67°C

Fig27 :Ligand qui à permis de maximiser la stabilité de TrFBL1

<i>Sample</i>	<i>Température de Fusion de TrFBL2</i>
Tris 50mM pH7,5, NaCl100mM	79°C
Tris 50mM pH 7,5	80°C
Tris 50mM pH7,5,NaCl 200mM	79°C

Fig 28: Ligand qui à permis de maximiser la stabilité de TrFBL2

La lectine TrFBL1 est apparemment une protéine stable jusqu'à 67°C et la lectine TrFBL2 jusqu'à 80°C.

5.7 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

TbFBL1

Est. MW =88.9±9.7 (Mean±SD) kDa

Diameter/length=8.101±0.8849 nm

%Polydispersity= 11

Peak highly monodisperse

TbFBL2

Est. MW = $34,6 \pm 3,3$ (Mean \pm SD) kDa

Diameter/length = $5,411 \pm 0,5178$ nm

%Polydispersity = 9,6

Peak highly monodisperse

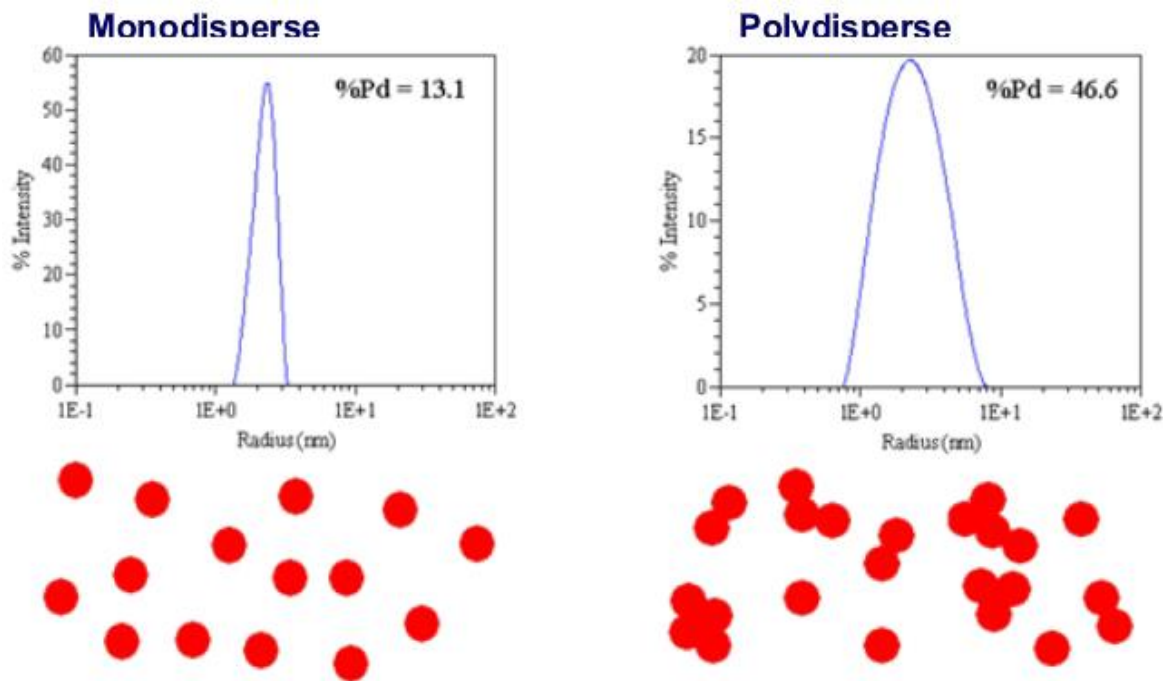


Fig29: Profil de dispersion explicatif pour deux solutions protéiques différentes

Cette technique nous permet d'avoir une estimation du poids moléculaire et nous donne une idée de savoir si la protéine en solution est un monomère ou un dimère ou un agrégat. Quand le pourcentage de Polydispersité est inférieur à 20, l'échantillon sera mono dispersé. Les échantillons mono dispersés (sans formation d'agrégats) sont les mieux adaptés pour les études de cristallisation.

Nos résultats semblent corrects concernant TrFBL1, et TrFBL2 ; en effet nous avons obtenu respectivement des valeurs nettement inférieures, 11% pour l'une et 9.6% pour l'autre ; et ce critère nous a encouragé à poursuivre nos recherches jusqu'à la cristallographie.

5.8 Glycan Array (puces à sucres)

Pour déterminer plus précisément les structures glycaniques reconnues nos deux lectines, elles ont été testées sur des puces à sucre par le « Consortium for Functional Glycomics » (CFG ; <http://www.functionalglycomics.org>), fondé par le « National Institute of General Medical Sciences ». Les lectines TrFBL1 et TrFBL2 sont marquées par un composé fluorescent l'Alexa Fluor® 488-TFP (carboxylic acid, 2,3,5,6 tetrafluorophenyl).

Cette étude a révélé les résultats illustrés sur les figures 30 et 31 sur la base des données des tableaux 09 et 10.

Large spécificité pour le Fucose

- ▲ Fucose (Fuc)
- Galactose (Gal)
- Glucose
- ◆ N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
- Mannose (Man)
- N-Acetylgalactosamine (GalNAc)
- N-Acetylglucosamine (GlcNAc)

TbFBL1 (0.2 µg/ml)

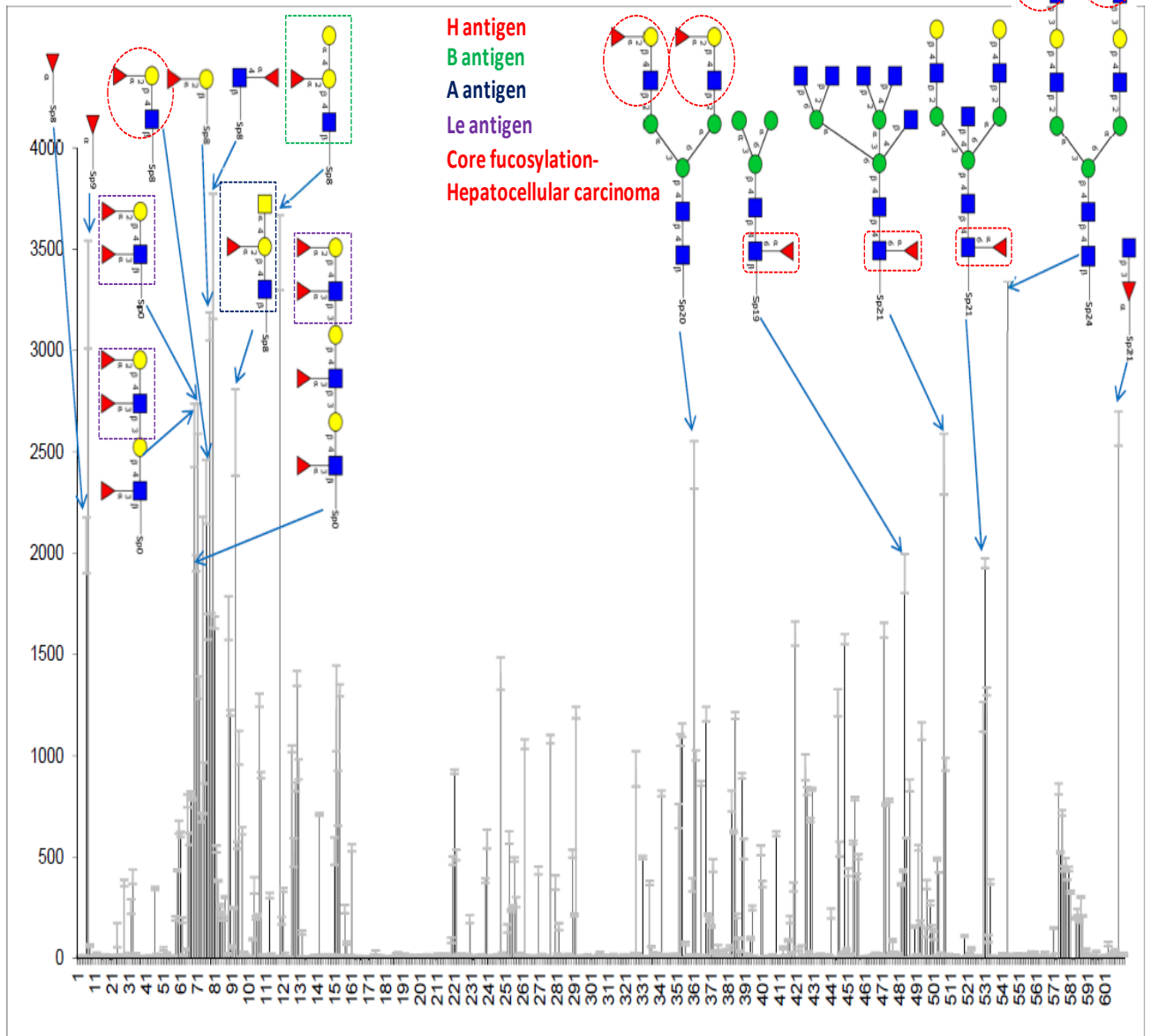


Fig30 : Spectre de Fluorescence de TrFBL1

Large spécificité pour le N-Acétylglucosamine

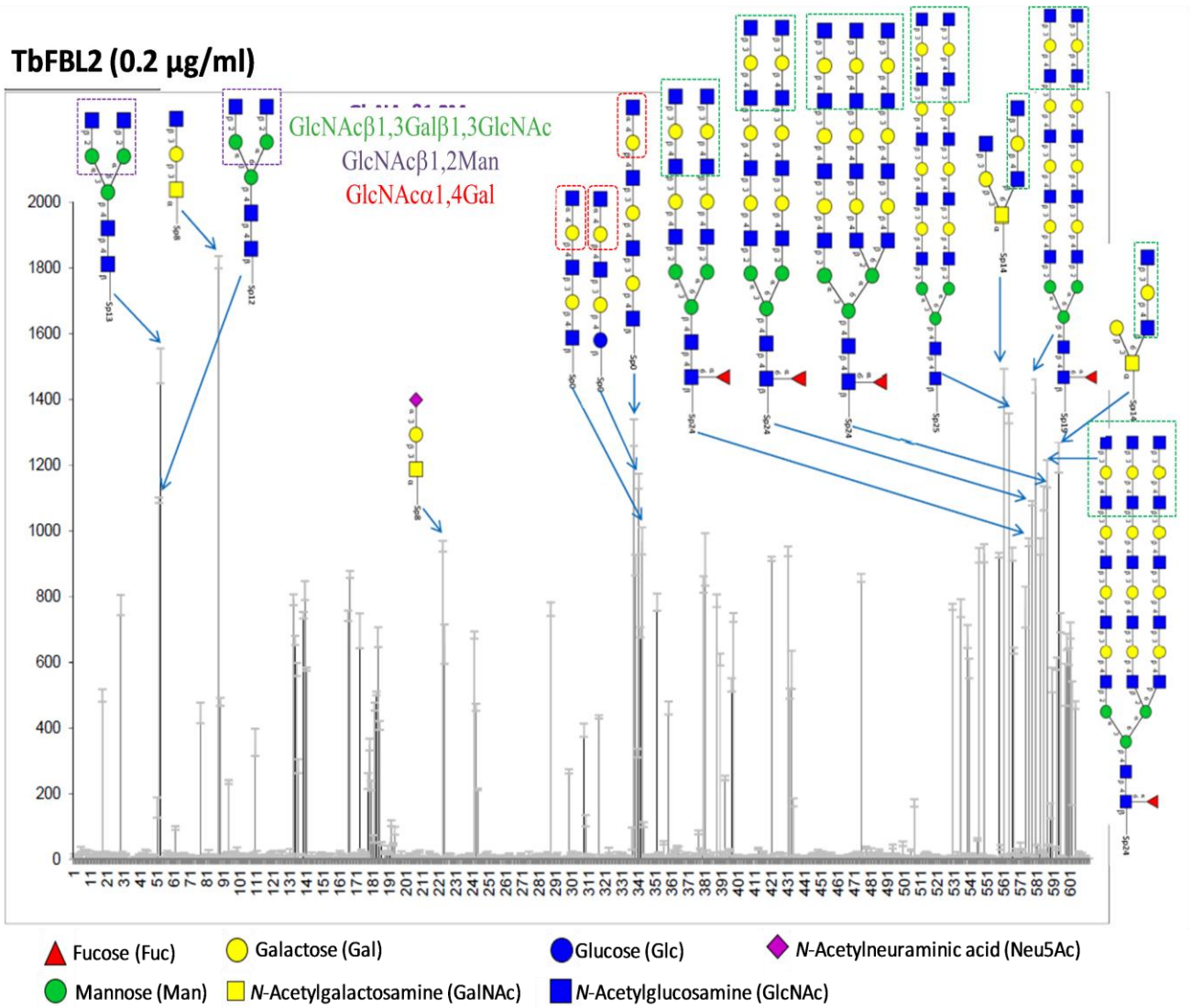


Fig31: Spectre de Fluorescence de TrFBL2

La technique de puces à sucres a permis d'identifier la spécificité et l'affinité des deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 pour différents oligosaccharides :

TrFBL1 présente une préférence nette pour les oligosaccharides présentant à leurs extrémités du Fucose (Fig 30 et tableau 09), qui peuvent être les motifs Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man, que l'on retrouve souvent (N° d'ordre 361, 76, 77, 472, 420, 449, 74 etc....).

Tableau 09: Résultats des puces à sucres de la lectine TrFBL1 NB (Average RFU représente l'intensité de fluorescence)

Chart Number	TbFBL1 (0.2ug/ml) Slide#:15567 Cfg:2646 V5.1 07/09/2012 Alexa488 CMZ	Average RFU
119	Gala1-4(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAcb-Sp8	3482
80	Fuca1-4GlcNAcb-Sp8	3465
544	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp24	3382
7	Fuca-Sp9	3276
78	Fuca1-2Galb-Sp8	3119
71	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb-Sp0	2663
609	GlcNAcb1-3Fuca-Sp21	2615
93	GalNAca1-4(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAcb-Sp8	2596
69	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb-Sp0	2582
507	GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-4)(GlcNAcb1-4(GlcNAcb1-2)Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Sp21	2439
361	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp20	2436
76	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb-Sp8	2302
6	Fuca-Sp8	2038
70	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb-Sp0	1951
531	Galb1-4GlcNAcb1-2 Mana1-6(GlcNAcb1-4)(Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Sp21	1950
484	Mana1-6(Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp19	1899
89	GalNAca1-3(Fuca1-2)Galb-Sp8	1679
79	Fuca1-3GlcNAcb-Sp8	1668
81	Fucb1-3GlcNAcb-Sp8	1656
77	Fuca1-2Galb1-4Glc-Sp0	1635
472	Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	1620
420	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp22	1603
449	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-6(Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-3)GalNAc-Sp14	1576
74	Fuca1-2Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp0	1446

TrFBL2 quant à elle présente une spécificité envers les oligosaccharides terminés par une séquence GlcNac β 1 2Man,GlcNac α 1-4 , GlcNac β 1-3Gal β 1-4GlcNac ; c'est ce qui est ressorti sur la tableau 10 et mis en évidence sur la figure 31.

Les lectines sont classées en cinq groupes en fonction de leur affinité pour (a) Le glucose / mannose; (b) du galactose et N-acétyl-Dgalactosamine; (c) la N-acétylglucosamine; (d) L-fucose, et (e) L'acide sialique (60). De plus ,de nombreuses lectines possèdent deux ou plusieurs sites de liaison de glucide qui sont essentiels pour leur capacité à agglutiner les érythrocytes(61).

Tableau 10 : Résultats des puces à sucres de la lectine TrFBL2 NB (Average RFU représente l'intensité de fluorescence)

Chart Number	TbFBL2 (0.2ug/ml) Slide#:15671 Cfg:2669 V5.1 08/13/2012 Alexa488 CMZ	Average RFU
88	GlcNAcb1-3Galb1-3GalNAca-Sp8	1818
53	GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp13	1503
561	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-3)GalNAca-Sp14	1444
580	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp19	1441
564	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp25	1343
338	GlcNAca1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp0	1299
594	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-3)GalNAca-Sp14	1224
587	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	1174
341	GlcNAca1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc-Sp0	1151
585	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	1099
52	GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp12	1094
578	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	1085
343	GlcNAca1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp0	970
576	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	965
223	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAca-Sp8	954
583	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	952
431	GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-4)(GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp21	938
549	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp25	932
566	GlcNAcb1-3Galb1-3GalNAc-Sp14	929
558	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp24	926
546	GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-6(GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp25	926
421	GlcNAcb1-2(GlcNAcb1-6)Mana1-6(GlcNAcb1-2)Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp19	915
381	Galb1-3GalNAca1-3(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAc-Sp0	914
339	GlcNAca1-4Galb1-4GlcNAcb-Sp0	896

5.9 Séquençage N-terminal et détermination des séquences nucléotidiques Nterminales (amorces ou primer) :

Les séquences N-terminales de nos deux lectines de truffe obtenues après purification ont été déterminées par la dégradation d'Edman en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (Applied Biosystems gas-phase séquenceur), modèle 492 de l'institut de Biologie Structurale de Grenoble.

La séquence N-Terminale pour TrFBL1 est :

VNTLTINTATA~~X~~VAFGNVQL

soit, en utilisant les autres codes des acides aminés revient:

Val-Asn-Thr-Leu-Thr-Ile-Asn-Thr-Ala-Thr-Ala-~~X~~-Val-Ala-Phe-Gly-Asn-Val-Gln-Leu

et la séquence codante nucléotidique est la suivante:

**GTNAAAYACNYTNACNATHAAAYACNGCNACNGC>NNNNGTNGCNTTYGGNAAAYGT
NCARYTN**

La Trypsine était incapable de digérer la lectine TrFBL2 ,si bien qu'on a eu recours à l'utilisation de la Proteinase K digéré TbFBL2,qui nous a fourni plus de cinq sous-unités qui ont été transféré sur une membrane de PVDF et la séquence N-terminale a été obtenue à partir de l'IBS de Grenoble.

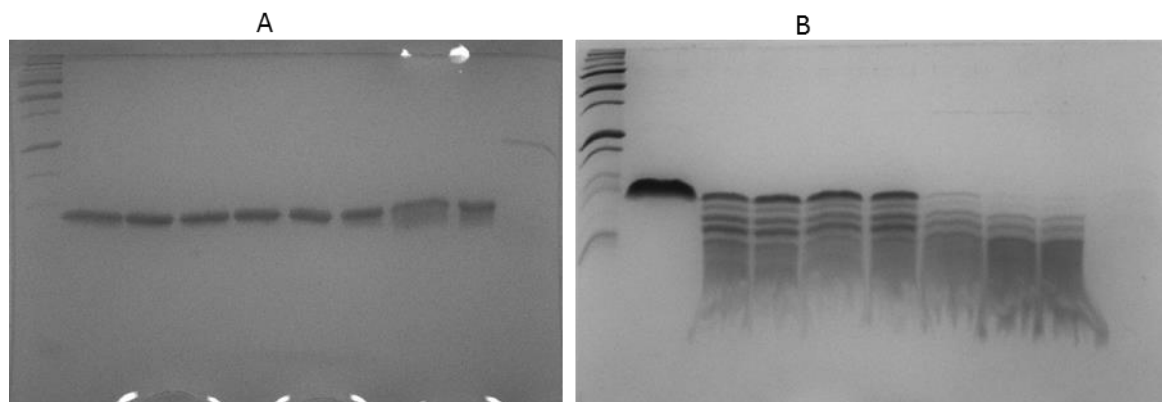


Fig 32 :Digestion de TrFBL2 utilisant de la trypsine (A) et de la proteinase K (B). Les enzymes à une dilution de 1/50 ont été utilisées et mises à incuber avec de la lectine à des intervalles de temps différents (5 min, 15 min, 1 h, 2h, 4h, etc.). SDS-PAGE effectuée utilisant un gel d'acrylamide à 20%.

La séquence N-Terminale pour TrFBL2 est :

(Q ou S)TNTNAFFQLVEXT(T ou V)

soit, en utilisant les autres codes des acides aminés revient:

Gln-Thr-Asn-Thr-Asn-Ala-Phe-Phe-Gln-Leu-Val-~~E~~-~~X~~-Thr-Val.

et la séquence codante nucléotidique est la suivante:

CARACNAAAYACNAAAYGCNTTYTTYCARYTNGTNGARNNNACNGTN

Les séquences de nucléotides des amorces (primers) dégénérées ont été obtenues par traduction inverse de la séquence d'acides aminés de chacune des lectines et ont été synthétisées par Eurofins MWG Operon, sous les N° de code 2733738 du 06/06/2012 et N° 2803618 du 20/09/2012.

TrFB1for1: 5'-GTNAAAYACNYTNACNATHAAAYACNGCNACNGC-3'

TrFB1for2: 5'-GTNGCNTTYGGNAAYGTNC-3

Et,

TrFB2for1: 5'- ACNAAYGCNTTYTTYCA-3'

TrFB2for2: 5'- GCNTTYTTYCARYTNGTNGA-3

La séquence partielle obtenue pour la lectine TrFBL2 a montré 87% de similarité avec la séquence de *Athelia rolfsii* de la lectine. L'exploitation de données de similitude du NCBI (protéines explosion) a donné les résultats suivants:

.QTNTNAFFQLVEXTV (ACN89784.1, lectin [*Athelia rolfsii*], score 43.1, E value 5e-04, max identity 87%)

.CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment TbFBL2 and *Athelia rolfsii* lectin

```
TrFB2          -----QTNTNAFFQLVEXTV-----
Athelia|D2D056|MTYKITVRIYQTNPNAFFQLVEETVWKYANGGTWAVENDQHVLTMGGSGT
                    ***.***** **

TrFB2          -----
Athelia|D2D056| SGTLRFQADDGESFVVAFGVHNYKRWCDIVTGLASNQTGIVINEEYYSLP

TrFB2          -----
Athelia|D2D056| VRERARERQLSEYQVKNAKGRNFQVNFTQAEGGDLHANVIIG
```

La lectine TrFBL1 quant à elle ne nous a fourni aucune homologie de séquences avec d'autres lectines répertoriées.

5.10 Production de Protéines Recombinantes :

Tout d'abord, nos premières tentatives ont été de purifier les lectines à partir d'un extrait brut de truffe. Deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 ont pu être obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne. Seule la lectine TrFBL1a permis d'obtenir des cristaux de qualité (résolution inférieure à 2.5Å).

En l'absence d'information sur la séquence primaire de la lectine de TrFBL2, une stratégie a été mise en place pour l'obtention et le clonage de son gène à partir des ARNm extraits à partir de la truffe elle-même. La production d'ADNc a été réalisée par des techniques décrites précédemment. Ensuite, les gènes spécifiques obtenus vont être clonés chez *Escherichia coli* afin de permettre l'expression de la protéine recombinante.

Le choix d'*E. coli* a tenu compte des critères suivants :

- Génétique très bien connue
- Nombreux outils de clonage commerciaux
- Facile à cultiver (fermentation)
- Expression élevée (plusieurs grammes / L de protéine recombinante)
- Pas de modifications post-traductionnelles (glycosylation)
- Faible potentiel de sécrétion

METHODOLOGIE



ADNc Transcriptase inverse

Isolation de l'ARNm (TRI reagent, SigmaConcert Plant RNA reagent, Invitrogen)



Synthèse de l'ADN Complémentaire



Amorce dégénérée synthétisée + Amorce-oligo dT /

(amorce spécifique dans le kit)

Amplification des Gènes spécifiques des lectines



Expression et production à grande échelle dans E. Coli

La lectine TrFBL2 a été clonée et séquencée par le Docteur Annabelle Varrot et le Docteur Anne Imberty, ainsi que les structures cristallographiques de la même lectine TrFBL2 en complexe avec le GlcNac et deux autres glycanes obtenues à haute résolution, font faire l'objet d'une publication commune prochainement.

5.11 La cristallisation des protéines par la méthode de goutte suspendue

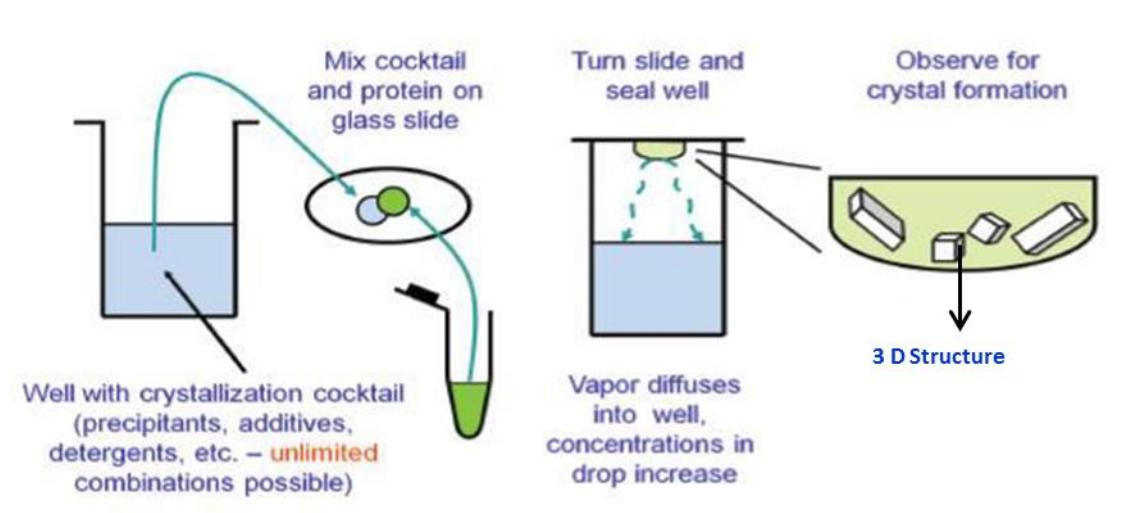


Fig33 : Protocole expérimental schématisé :

1. On ajoute 250 ul d'une solution d'agent de précipitation tamponnée au puits.
2. Puis 1 ul de la protéine concentrée (10 ug / ul) échantillon est pipeté sur une lamelle couverte de silicone, suivie de 1 ul de la solution de puits (solution de réservoir)

3. La lamelle est ensuite retournée sur le bien et scellé.
 4. Ce mélange est ensuite laissé au repos pendant au moins 24 heures
- La Cristallisation peut avoir lieu des jours ou des semaines ou des mois après.



→ Plaque de cristallisation (48 puits)

Les résultats obtenus suite à ce délai de cristallisation ont permis l'obtention d'un cristal pour la lectine TrFBL2 en utilisant 192 conditions de cristallisations, dont 96 tampons de cristallisations du Kit Morpheus et 96 autres du Kit MIDAS.

192 conditions de Cristallisation

96 Tampons Morpheus

96 Tampons MDAS

96 Tampons Morpheus

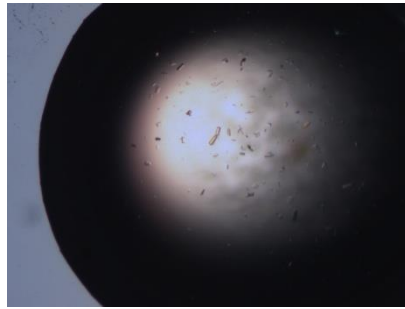
TrFBL1

TrFBL2



Cristal non observé

Obtention d'un Cristal
après 24 Heures



Hanging drop method:

Morpheus 2-28: 0,1M Mes pH 6,5 0.10 M Carboxylic acids 12.5% MPD, PEG 1K/3350



Data collection on 17-11-12 ↓



Tableau 11: Conditions optimisées à partir d'un criblage sur la plateforme de cristallisation de l'EMBL grenoble, pour TrFBL1 et TrFBL2.

Lectin	ligand	Conditions de cristallisation	Cryo	Beamline	Date	Résolution Å	Groupe d'espace	Maille
Trfbl1 9mg/ml	aucun	1.2M AMO4 Na Cit 4.0	25% glycérol	ID14-4	3/02/13	1.5	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	47.6 78.5 142.7 90 90 90
	methyl Selenofucose 2mM	2.5 M Malonate ph 5.0	3.1M	ID23-1	1/03/13	1.95	P 6 ₁ 2 2	86.8 86.8 213.8 90 90 120
Trfbl2 7mg/ml	GlcNAc 10mM	Morpheus 2-27 : 0.1M carboxylic acid, 0.1M HEPES-MOPS 7.5, 20% glycerol-10% peg4k	aucun	ID29	6/12/12	1.2	P1	53.2 54.6 58.8 87.5 65.5 62.6
	GlcNAc 10mM	morpheus 1-30 : 0.09M NPS, 0.1M Imidazole-MES 6.5, 20% ethylene glycol- 10% peg8k	aucun	BM30A	10/12/12	1.5	P1	53.0 54.4 58.5 87.4 65.6 62.4
	TFantigen Trempe 10min	morpheus 1-22 : 0.09M halogens, 0.1M tris-bicine 8.5, 20% ethylene glycol, 10% peg8k	aucun	BM30A	19/4/13	1.6	P1	53.2 54.5 58.7 87.2 65.3 62.4

	10mM							
--	------	--	--	--	--	--	--	--

Morpheus screen de Molecular dimension Ltd

NPS : NaNO3; Na2HPO4; (NH4)2SO4

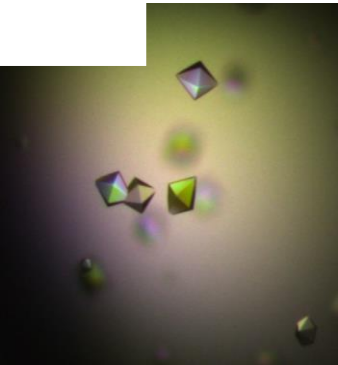
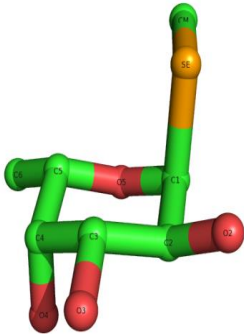
Halogens : NaF; NaBr; NaI

Carboxylic acids: Na-Formate; NH4-Acetate; Na3-Citrate; NaK-Tartrate (racemic); Na-Oxamate

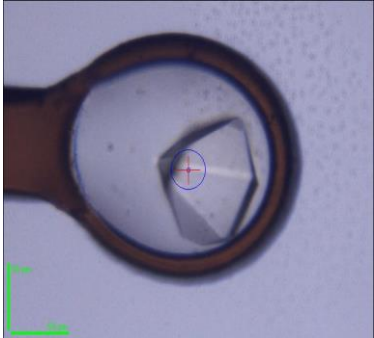
Trfb11



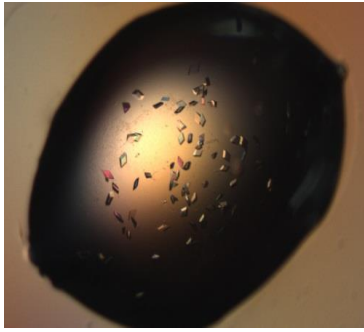
Native



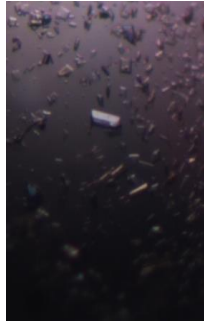
Cocristaux avec alpha-methylselenofucose donné
Martina Lahmann, University of Bangor, UK



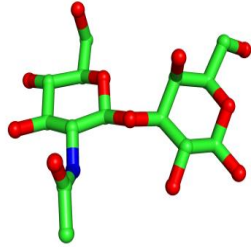
Trfb12



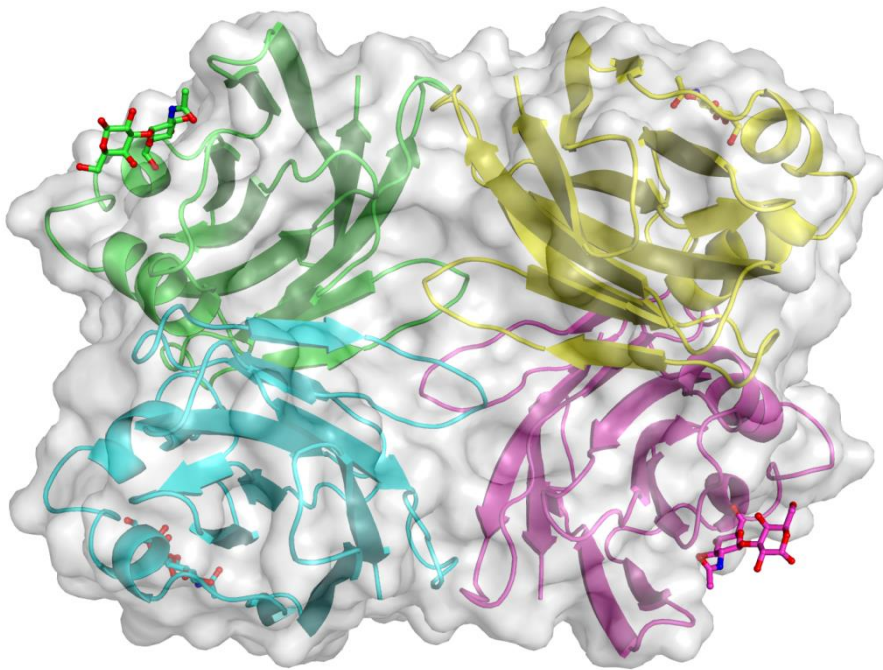
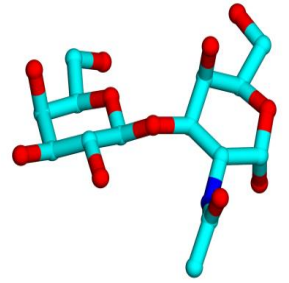
Morpheus 1-6



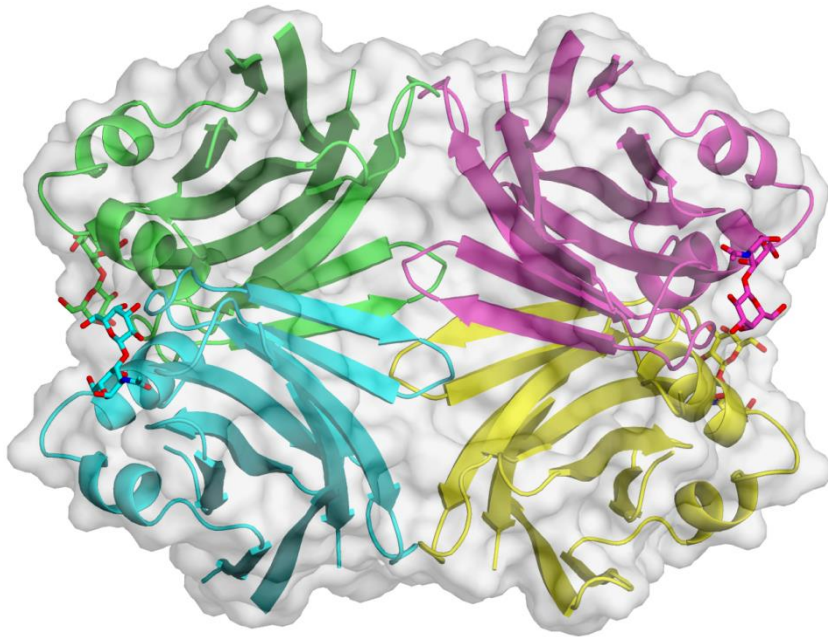
Morpheus 1-22



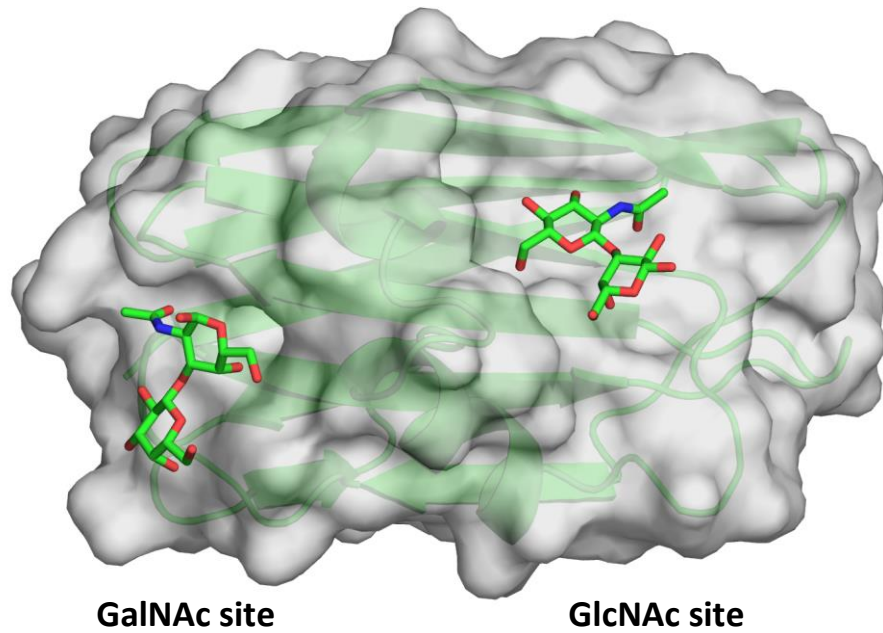
Morpheus 1-30



Trfb12 GlcNAcb13Gal



Trfbl2 TF antigen : Galb1,3GAINAc-O-Serine



TrFBL2

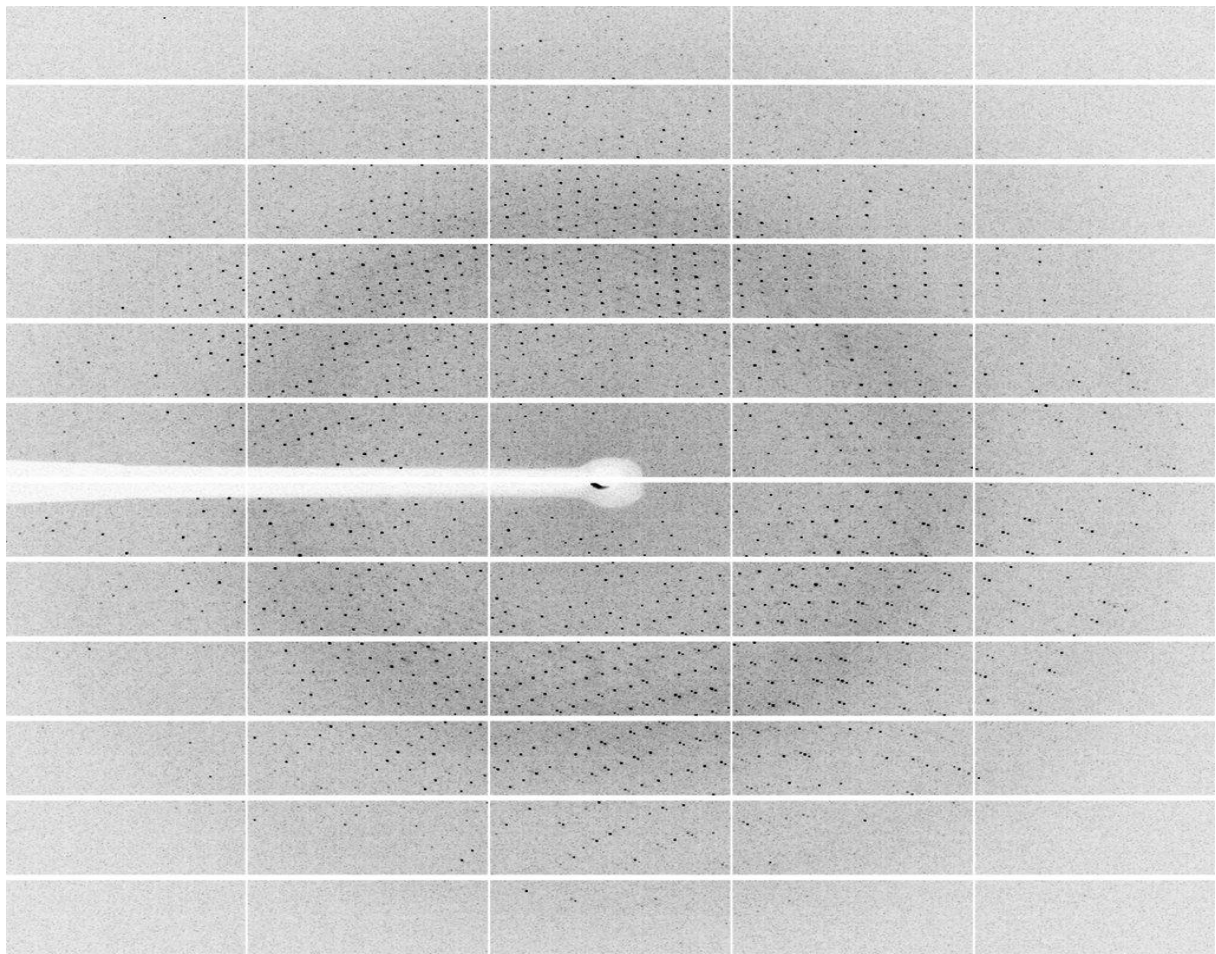


Fig 34: Cliché de Diffraction de TrFBL2 obtenu par Diffraction aux Rayons X

5.12 Génome de Terfezia boudiéri disponible Dec 2013

<http://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Terbo1>

Trfbl1

Terfeziaboudieri S1 v1.0 Model Name: fgenes1_pg.20_#_54 Track: fgenes1_pg
Protein Id: 64904
Transcript Id: 65467 Location: scaffold_20:335750-336784 (+)
IPR012475 Fungal fucose-specific lectin
HMMPfam:PF07938Fungal_lectin
superfamily:SSF89372 Fucose-specific lectin

335550 CCATTGGCGATCACAGGTGGTGGCATCAGCTGTAGGTGTAGCTAGAAGAGCATAAAAAGGGAGGTTTTCCC
335619

335620 CCTCTTCCATAGACTATCCAAAGCAAACAGATTCTTGAATCCAAAGAACACACAGAAATCTACTACTTA
335689

335690 CATTACCGCACCTCTTTACGCGTCCTAGCAATCTAGATATACAAGCTCAAAGTCACCACAATGGCGAATA
335759

335760 CGTTGACCGTCAACACCGCTACTGCCTGTATTGCCTTCGGGAATGTCCACCTTCGTGTGTACTTCCAGGA
335829

335830 CAACGAGGGCTACGTCAGAGAGTCTCAATGGGACGGAAGCTGGACCGGTGGCACCATGTAATAGATTGTT
335899

335900 CAGAGCAAAGCCAAACACCCCCCTTGCAGCAATCACTTGGGGAAGCAGCCACATGTAAGTGACTTCGGC
335969

335970 TGGGAAACTCATTCTCTTACTCTCTCAATTGATTCAAACCATGTTAACAGTTAGACTAGATCCGC
336039

336040 GTCTACTATGTGGACACCAACAATAAGCTCGCAGAGCACTGTTGGGATGGCAGCGGCTGGTACTACTGGT
336109

336110 CCTTGGGAGGCAGTAACATCGCGCTCGACTACCGATCCAAGATTGGTGCCTGCACTTGGAGCAACACCC
336179

336180 TTCTATCAGGGTATATTATCAATCGCCCGCAATCAAGCCATCCGAGAAGTATGCTGGGATGGAAACGGA
336249

336250 TGGACAGGGGGGCCACTCTCCGAATGCTCAACTTGAAGTGGCCTCGCTGCTATTGCATTCTCGAATA
336319

336320 ATGGAATCCACTTGAGGGTTTACTACCAAACACGAGACGACAACACAGTTCGTGAGCATTGCTGGGATGG
336389

336390 GTCATGGAGTGTAGGTATGTAGCACCTCAAAGAATGTCTCAATTGAGACCACGAGAGTCACCATAAGCTA
336459

336460 AGTCACTGCTTGAATGCATATGATAGTCAAATGACTGCACAAGCCCCCGGGACCGCCATTGGCGCT
336529

336530 ACTACCTGGGCCAGCGATCCTCAGATCAGAGTCTATATAGAGCAAACGCATGGAGGTCACGTCTCAGAGA
336599

336600 TGGCCTACAGCGGTGGATGGAGTGGTCCAAATGTTCTCACAACTGCCTCGCTGACACGAACTTGTCCGT
336669

336670 TTGCAGCTGGGGAAATATCCAGATTTCGCTTCTATTTCCAACGGGTTGTCAACGAGATCCAGGAGTACTGC
336739

336740 TGGAAACAATGGGTGGGTAAACGGGGCCACAATCCCAACCGACTAGTTCTCTCTTTCTTCGCTTCATGTCT
336809

336810 TCCTCGCTTCATGTCAGAACTGGGAAACAGATTGAAGGGATATACGAAGAAATGACCTTGGCGGCTTAAG
336879

336880 GTGGATAGGTATATGACTAGGTAGTGGCCTTGTATTCTTATGGCTGTTATCATTCTGAGTAGCAATGGCG
336949

336950 AAAATATGTAGCTAGTGCGGGAATATGAATATGGT 336984

From sequencing

335550 CCATTGGCGATCACAGGTGGTGGCATCAGCTGTAGGTGTAGCTAGAAGAGCATAAAAGGGAGGTTTTCC
335619

335620 CCTCTTCCATAGACTATCCAAAGCAAACAGATTCTTGAATCCAAAGAACACACAGAAATCTACACTCTA
335689

335690 CATTACCGCACCTCTTTACGCGTCCTAGCAATCTAGATATACAAGCTCAAAGTCACCACAATGGCGAATA
335759

335760 CGTTGACCGTCAACACCGTACTGCCTGTATTGCCTTCGGGAATGTCCACCTTCGTGTACTTCCAGGA
335829

335830 CAACGAGGGCTACGTCAGAGAGTCTCAATGGGACGGAAGCTGGACCGGTGGCACCATGTAATAGATTGTT
335899

335900 CAGAGCAAAGCCAAACACCCCCCTTGAGCAATCACTTGGGGAAGCAGCCACATGTAAGTACTTCGGC
335969

335970 TGGGAAACTCATTCTCTTACACTCTCTCAATTGATTCAAACCATGTTAACAGTTAGACTAGATCCGC
336039

336040 GTCTACTATGTGGACACCAACAATAAGCTCGCAGAGCACTGTTGGGATGGCAGCGGCTGGTACACTGGTG
336109

336110 CCTTGGGAGGCAGTAACATCGCGCTCGACTACCGATCCAAGATTGGTGCCTGCACTTGGAGCAACACCCC
336179

336180 TTCTATCAGGGTATATTATCAATCGCCCGGAATCAAGCCATCCGAGAAGTATGCTGGGATGGAAACGGA
336249

336250 TGGACAGGGGGGGCCACTCTCCGAATGCTCAACTTGGAAAGTGGCCTCGCTGCTATTGCATTCTCGAATA
336319

336320 ATGGAATCCACTTGAGGGTTTACTACCAAACACGAGACGACAACACAGTTCGTGAGCATTGCTGGGATGG
336389

336390 GTCATGGAGTGTAGGTATGTAGCACCTCAAAGAATGTCTCAATTGAGACCACGAGAGTCACCATAAGCTA
336459

336460 AGTCACTGCTTGAATGCATATGATAGGTCAAATGACTGCACAAGCCCCGCGGGACCGCCATTGGCGCT
336529

336530 ACTACCTGGGCCAGCGATCCTCAGATCAGAGTCTATATAGAGCAAACGCATGGAGGTCACGTCTCAGAGA
336599

336600 TGGCCTACAGCGGTGGATGGAGTGGTCCAAATGTTCTCACAAACTGCCTCGCTGACACGAACTTGTCCGT
336669

336670 TTGCAGCTGGGGAAATATCCAGATTTCGTTCTATTTCCAACGGGTGTCAACGAGATCCAGGAGTACTGC
336739

336740 TGGACAATGGGTGGGTTAACGGGGCCACAATCCAACCGACTAGTTCTCTCTTTCTTCGTTTCATGTCT
336809

336810 TCCTCGTTCATGTGAGAACTGGGAAACAGATTGAAGGGATATACGAAGAAATGACCTTGGCGGCTTAAG
336879

336880 GTGGATAGGTATATGACTAGGTAGTGGCCTTGATTCTTATGGCTGTTATCATTCTGAGTAGCAATGGCG
336949

336950 AAAATATGTAGCTAGTGCGGGAATATGAATATGGT 336984

Transcript deposited but error 15 amino acids are missing

1 ATGGCGAATACGTTGACCGTCAACACCGCTACTGCCTGTATTGCCTTCGGGAATGTCCAC 60
61 CTTCCAATCACTTGGGGAAGCACGCCACATATCCGCGTCTACTATGTGGACACCAACAAT 120
121 AAGCTCGCAGAGCACTGTTGGGATGGCAGCGGCTGGTACACTGGTGCCTTGGGAGGCAGT 180
181 AACATCGCGCTCGACTACCGATCCAAGATTGGTGCCTGCACTTGGAGCAACACCCCTTCT 240
241 ATCAGGGTATATTATCAATCGCCCGGCAATCAAGCCATCCGAGAAGTATGCTGGGATGGA 300
301 AACGGATGGACAGGGGGGGCCACTCTTCCGAATGCTCAACTTGAAGTGGCCTCGCTGCT 360
361 ATTGCATTCTCGAATAATGGAATCCACTTGAGGGTTTACTACCAACACGAGACGACAAC 420
421 ACAGTTCGTGAGCATTGCTGGGATGGGTCACTGGAGTGTAGGTCAAATGACTGCACAAGCC 480
481 CCGCCCGGACCGCCATTGGCGCTACTACCTGGGCCAGCGATCCTCAGATCAGAGTCTAT 540
541 ATAGAGCAAACGCATGGAGGTCACGTCTCAGAGATGGCCTACAGCGGTGGATGGAGTGGT 600
601 CCAAATGTTCTCACAAACTGCCTCGCTGACACGAACTTGTCCGTTTGCAGCTGGGGAAAT 660
661 ATCCAGATTTCGTTCTATTTCCAACGGGTGTCAACGAGATCCAGGAGTACTGCTGGAAC 720
721 AATGGGTGGGTTAACGGGGCCACAATCCAACCGACTAG 759

trfbl1 -VNTLTVNTATACIAFGNVHLRVYFQDNSGYTRESQWDGSWTGGTIDDRLFKAKPNTPLA 59
gen MANTLTVNTATACIAFGNVHL----- 21
.*****

trfbl1 AITWGAVPHIRVYYVDVNDKDAEFCWNGDGWYTGALGGS LIADYRSKIGACVWSGTPSI 119
gen PITWGSTPHIRVYYVDVNDKLAEHCWDGSGWYTGALGGSNIALDYRSKIGACTWSNTPSI 81
.****.*****.*:* **.*.*.***** ** *****.***.***

trfbl1 RVYYQSPGDQAIREVCWDGAGWAGGATLPDAQLGSGDAAIAFSASGIHLRVYYQTRDDNT 179
gen RVYYQSPGNQAIREVCWDGNGWTGGATLPNAQLGSGLAIAFSNNGIHLRVYYQTRDDNT 141
*****:***** **:******:***** ***** .*****

trfbl1 VREFCWDGSWSVGAKTAQAPAGTAIGATTWASDPQIRVYIQAVHGGHVSEMAYSGGWSGP 239
gen VREHCWDGSWSVQMTAQAPAGTAIGATTWASDPQIRVYIEQTHGGHVSEMAYSGGWSGP 201
.**** *****:*****:***** .*****

trfbl1 SSLTDCDADTNLSVCSWGAIEIRFYFQRVVNEIQEYCWSGGWSDGATVPTG 290
gen NVLTNCLADTNLSVCSWGNIQIRFYFQRVVNEIQEYCWNNGWVNGATIPTD 252
. **.* ***** *:*****:*****.*** :**.***.

atggcgaatacgttgaccgtcaacaccgctactgcctgtattgccttcgggaatgtccac
M A N T L T V N T A T A C I A F G N V H
cttccaatcacttgggggaagcacgccacatatccgcttactatgtggacaccaacaat
L P I T W G S T P H I R V Y Y V D T N N
aagctcgcagagcactgttgggatggcagcggctggtacactggtgccttgggagggcagt
K L A E H C W D G S G W Y T G A L G G S
aacatcgcgctcgactaccgatccaagattggtgcctgcaacttggagcaacaccccttct
N I A L D Y R S K I G A C T W S N T P S
atcagggatattatcaatcgccccgcaatcaagccatccgagaagtatgctgggatgga
I R V Y Y Q S P G N Q A I R E V C W D G
aacggatggacagggggggccactcttccgaatgctcaacttgaagtggcctcgctgct

N G W T G G A T L P N A Q L G S G L A A
attgcattctcgaataatggaatccacttgaggggttactaccaaacacgagacgacaac
I A F S N N G I H L R V Y Y Q T R D D N
acagttcgtgagcattgctgggatgggtcatggagtgtagggtcaaagactgcacaagcc
T V R E H C W D G S W S V G Q M T A Q A
cccgccgggaccgcccattggcgctactacctgggcccagcgatcctcagatcagagtctat
P A G T A I G A T T W A S D P Q I R V Y
atagagcaaacgcatggaggtcacgtctcagagatggcctacagcgggtggatggagtgg
I E Q T H G G H V S E M A Y S G G W S G
ccaaatgttctcaciaaactgcctcgtgacacgaacttgtccggttgcagctggggaaat
P N V L T N C L A D T N L S V C S W G N
atccagattcgttctatttccaacgggttgtcaacgagatccaggagtactgctggaac
I Q I R F Y F Q R V V N E I Q E Y C W N
aatgggtgggttaacggggccacaatccaaccgactag
N G W V N G A T I P T D -

Oligos to fish the gene

Trfbl1gfor: atggcgaatacgttgaccgtcaacaccg

Primer name: Trfblgfor

Primer sequence: atggcgaatacgttgaccgtcaacaccg

Sequence length: 28

Base counts: G=7; A=8; T=5; C=8; Other=0;

GC content (%): 53.57

Molecular weight (Daltons): 8582.63

nmol/A260: 3.66

micrograms/A260: 31.40

Basic Tm (degrees C): 63

Salt adjusted Tm (degrees C): 58

Nearest neighbor Tm (degrees C): 73.50

Trfbl1grev: GTCGGTTGGGATTGTGGCCCCG

Primer name: Tfrblgrev

Primer sequence: GTCGGTTGGGATTGTGGCCCCG

Sequence length: 22

Base counts: G=10; A=1; T=6; C=5; Other=0;

GC content (%): 68.18

Molecular weight (Daltons): 6814.45

nmol/A260: 4.95

micrograms/A260: 33.73

Basic Tm (degrees C): 62

Salt adjusted Tm (degrees C): 57

Nearest neighbor Tm (degrees C): 72.95

PCR suitability tests (Pass / Warning):

Single base runs: Pass

Dinucleotide base runs: Pass

Length: Pass

Percent GC: Warning: %GC is greater than 60;

Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;

GC clamp: Warning: There are more than 3 G's or C's in the last 5 bases;

Self-annealing: Pass

Hairpin formation: Pass

Résultats après séquençage

MANTLTVNTATACVAFGNVQLRVYFQDNEGYVRESQWDNGWTGG

TIHNRLFRAKPNTPLAAITWGSTPSIRVYYVDSNNKLAEHCWDGSGWYTGALGNSNIAID

YRSKIGACTWSTTPSIRVYYQSPGNEAIREVCWDGNGWTGGATLPDAQLGSGLAIAFSK

DGIHLRVYYQTRDDNTVREHCWDGSSWSVGQMTVQAPAGTAIGATTWASDPQIRVYIEQLR

GGHVAEMAYSGGWSGPKTLTNCLANTNLSVCSWGNIQIRFYFQIRIVNEVQEYCWDNGWYN

GATIPTDNH*

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MANTLTVNTA	TACVAFGNVQ	LRVYFQDNEG	YVRESQWDNG	WTGGTIHNRL	FRAKPNTPLA
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
AITWGSTPSI	RVYYVDSNNK	LAEHCWDGSG	WYTGALGNSN	IAIDYRSKIG	ACTWSTTPSI
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
RVYYQSPGNE	AIREVCWDGN	GWTGGATLPD	AQLGSGLAIA	AFSKDGIHLR	VYYQTRDDNT
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
VREHCWDGWS	SVGQMTVQAP	AGTAIGATTW	ASDPQIRVYI	EQLRGGHVAE	MAYSGGWSGP
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	
KTLTNCLANT	NLSVCSWGNI	QIRFYFQIRIV	NEVQEYCWDN	GWYNGATIPT	DNH

Number of amino acids: 293

Molecular weight: 32408.8

Theoretical pI: 5.85

Amino acid composition:

Ala (A)	26	8.9%
Arg (R)	15	5.1%
Asn (N)	22	7.5%
Asp (D)	14	4.8%
Cys (C)	8	2.7%
Gln (Q)	13	4.4%
Glu (E)	10	3.4%
Gly (G)	31	10.6%
His (H)	6	2.0%
Ile (I)	17	5.8%
Leu (L)	14	4.8%
Lys (K)	5	1.7%
Met (M)	3	1.0%
Phe (F)	6	2.0%
Pro (P)	10	3.4%
Ser (S)	19	6.5%
Thr (T)	26	8.9%
Trp (W)	15	5.1%
Tyr (Y)	15	5.1%
Val (V)	18	6.1%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 24

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 20

Atomic composition:

Carbon	C	1435
Hydrogen	H	2139
Nitrogen	N	405
Oxygen	O	437

Sulfur S 11

Formula: C₁₄₃₅H₂₁₃₉N₄₀₅O₄₃₇S₁₁ **Total number of atoms:** 4427

Extinction coefficients:

Ext. coefficient 105350 104850
Abs 0.1% (=1 g/l) 3.251, 3.235 (reduced)

Instability index: 27.36 This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 67.95

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.385

Rare codon

```
atggcgaatacgttgaccgtcaacaccgcc act
gcctgtgttgcccttcgggaatgtccaacttcgtgtgtacttc cag gacaac gag ggctacgtcAGA gag
tcccaatgggacaatggctggaccggtggcaccatc cat
aatAGAttgttcAGAgcaaagccaaacaccCCCcttgcagcaATAact
tggggaagcagccatctatccgcgtctac tat gtggacagcaacaataagcttgca gag cactgttgg
gat ggcagcggctggtac act
ggtgccttgggaaacagtaacatcgcgatcgactacCGAtccaagattggtgcctgcacctggagcaccaccct
tctatcAGGgta tat tatcaatcgCCGggcaatgaagccatcCGAgaagtatgctgg gat
ggaaatggatgg act gggggggcc act cttcca gat
gctcaacttgggaagtggcctcgtctgtattgcattctogaag gat
ggaattcacttgAGGgtttactaccaacaCGAgacgacaacacagttcgt gag cat tgctgg gat
gggtcatggagtgttaggtcaaatg act
gtacaagccCCCgccgggaccgccattggcgctaccacctgggccagt gat cct cag atcAGAgtc tat
atc gag caattgcgtggagggtcacgtcgca gag atggcctacagcgggtggatggagtgggtccaaag act
ctc act aactgcctcgttaacacgaactgtctgtttgcagctggggaaatatac cag attcgttc tat
ttccaacggattgtcaac gag gtc cag gag tactgctgggacaatgggtgg tat
aacggggccacaatccaaccgacaatcac tag
```

The length is: 882 nucleotides

Number of total single rare Argcodons: 9
occurring at codons: 33, 49, 52, 106, 121, 133, 170, 176, 217

Name:	Sequence	Length:	293
	MANTLTVNTATACVAFGNVQLRVYFQDNEGYVRESQWDNGWTGGTIHNRLFRAPNTPLAAITWGSTPSIRVYYVDSNNK		80
	LAEHCWDGSGWYTGALGNSNIAIDYRSKIGACTWSTTPSIRVYYQSPGNEAIREVCWDGNGWTGGATLPDAQLGSLAAI		160
	AFSKDGIHLRVYYQTRDDNTVREHCWDGWSVSGQMTVQAPAGTAIGATTWASDPQIRVYIEQLRGGHVAEMAYSGGWSGP		240

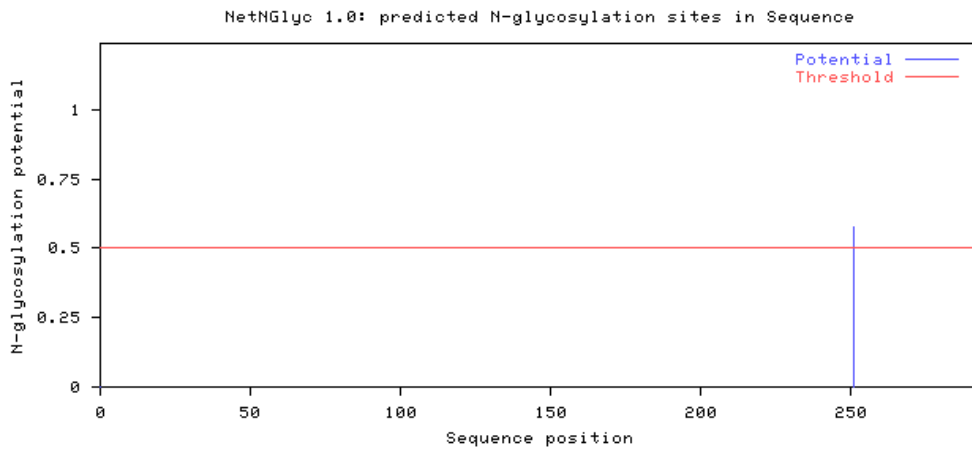
KTLTINCLANTNLSVCSWGNIQIREFYFQRIVNEVQEYCWWDNGWYNGATIPDNDH

..... 80
..... 160
..... 240
.....N..... 320

(Threshold=0.5)

SeqNamePosition Potential Jury N-Glyc
agreement result

Sequence 251 NLSV 0.5789 (6/9) +



Trfbl2

Model Name: e_gw1.44.77.1

Protein Id: 52528

Transcript Id: 53091

Location: scaffold_44:309268-309693 (-)

IPR009960 Fungal fruit body lectin

HMMPfam:PF07367FB_lectin

Transcript (426 bp) /CDS Sequence (426 bp)

1 ATGAGCTACACCATTACCGTCCGAATTTACCAGAAGAACACCAATGCGTTTTTCCAGCTTGTAGAGAAGA 70
71 CAGTCTGGAACCTACGCCAATGGTGAACCTGGACGGAGGCCAACGGTGAGCACATCCTAACCATGGGTGG 140
141 GAGTGGCACCTCAGGCACGCTACGCTTTTCCTCCGATACAGGCGAGCGCTTCCTTGTGTCCTTGGTGTG 210
211 CACAACCTACAACTCTGGGGCGATATTGTTACTGGTCTGTCCACCGATCAAACCGGTGTGGTGTCTCAACG 280
281 CAGAGTATTACAATTCAGTCCGTTTCGTTTCGCGCGGAGAAACAGCTCTCAACCTACACCGTGACCAGTGG 350
351 GCAAGGACGAACGTACACAGTTACATACACTGCAGCTGATGGATACAGCCTGAGAGCCAACATCATTATC 420
421 GGGTAA 426

atgagctacaccattaccgtccgaatTTaccagaagaacaccaatgCGTTTTTccagctt
M S Y T I T V R I Y Q K N T N A F F Q L
gtagagaagacagtctggaactacGCCAATGGTGAACCTGGACGGAGGCCAACGGTGAGCACATCCTAACCATGGGTGAG
V E K T V W N Y A N G G T W T E A N G E
cacatcctaaccatgggtgggagtgGCACCTCAGGCACGCTACGCTTTTCCTCCGATACAGGCGAGCGCTTCCTTGTGTCCTTGGTGTG
H I L T M G G S G T S G T L R F S S D T
ggcgagcGCTTCCTTgTtGTCCTTGGTGTGCACAACCTACAAACTCTGGGGCGATATTGTT
G E R F L V A L G V H N Y K L W G D I V
actggTctgtccaccgatCAAACCGGTGTGGTGTCTCAACGCAGAGTATTACAATTCAGTCT
T G L S T D Q T G V V L N A E Y Y N S V
CGTTCGTTTCGCGCGGAGAAACAGCTCTCAACCTACACCGTGACCAGTGGGCAAGGACGA
R S F A R E K Q L S T Y T V T S G Q G R

acgtacacagttacatacactgcagctgatggatacagcctgagagccaacatcattatc

T Y T V T Y T A A D G Y S L R A N I I I

gggtaa

G -

Trfb12 -SYTITVRIYQKNTNAFFQLVEKTVWDYANGGTWTEANGEHILTIGGSGTSGTLRFSSDT 59
gen MSYTITVRIYQKNTNAFFQLVEKTVWNYANGGTWTEANGEHILTMGGSGTSGTLRFSSDT 60
*****.*****

Trfb12 GERFLVALGVDNYNRWADIVTGLSTDQTVVVLNAEYNSVRSSAREKRLSTYTVTSGQGR 119
gen GERFLVALGVHNYKLWGDIVTGLSTDQTVVVLNAEYNSVRSFAREKQLSTYTVTSGQGR 120
*****.**: *.*****

Trfb12 TYTVTYTVADGRNLRANIIG 140
gen TYTVTYTAADGYSLRANIIG 141
*****.***.*****

Oligos to fish the gene

Trfbl2gfor: atgagctacaccattaccgtccgaattacc

Primer name: Trfbl2gfor

Primer sequence: atgagctacaccattaccgtccgaattacc

Sequence length: 31

Base counts: G=4; A=9; T=8; C=10; Other=0;

GC content (%): 45.16

Molecular weight (Daltons): 9399.17

nmol/A260: 3.38

micrograms/A260: 31.75

Basic Tm (degrees C): 62

Salt adjusted Tm (degrees C): 57

Nearest neighbor Tm (degrees C): 70.66

PCR suitability tests (Pass / Warning):

Single base runs: Pass

Dinucleotide base runs: Pass

Length: Warning: Contains more than 30 bases;

Percent GC: Pass

Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;

GC clamp: Pass

Self-annealing: Pass

Hairpin formation: Pass

Trfbl2grev:TTACCCGATAATGATGTTGGCTCTCAGGC

Primer name: Trfbl2grev

Primer sequence: TTACCCGATAATGATGTTGGCTCTCAGGC

Sequence length: 29

Base counts: G=7; A=6; T=9; C=7; Other=0;

GC content (%): 48.28

Molecular weight (Daltons): 8883.83

nmol/A260: 3.67

micrograms/A260: 32.60

Basic Tm (degrees C): 62

Salt adjusted Tm (degrees C): 56

Nearest neighbor Tm (degrees C): 70.58

PCR suitability tests (Pass / Warning):

Single base runs: Pass

Dinucleotide base runs: Pass

Length: Pass

Percent GC: Pass

Tm (Nearest neighbor): Warning: Tm is greater than 58;

GC clamp: Warning: There are more than 3 G's or C's in the last 5 bases;

Self-annealing: Pass

Hairpin formation: Pass

Résultatséquencage. Work first time with non degeneratedoligos

MSYTITVRIYQTNTNAFFQLVEQTVWNYANGGTWTEANGEHILTMGGSGTSGTLRFSSDTGERFLVALGVHNYKR
W

GDIVTGLSTDQTVVVLNAEYYNSVRSFAREKQLSTYTVTSGQGRKFTVYTVADGNSLRA

NIIIIG*

trfbl2gen MSYTITVRIYQKNTNAFFQLVEKTVWNYANGGTWTEANGEHILTMGGSGTSGTLRFSSDT

pGemT6-1

MSYTITVRIYQTNTNAFFQLVEQTVWNYANGGTWTEANGEHILTMGGSGTSGTLRFSSDT

*****.*****:*****

trfbl2gen GERFLVALGVHNYKLWGDIVTGLSTDQTVVVLNAEYYNSVRSFAREKQLSTYTVTSGQGR

pGemT6-1

GERFLVALGVHNYKRWGDIVTGLSTDQTVVVLNAEYYNSVRSFAREKQLSTYTVTSGQGR

trfbl2gen TYTVTYTAADGYSLRANIIIG

pGemT6-1 KFTVTYTVADGNSLRANIIIG

.:*****.*** *****

10 20 30 40 50 60
 MSYTITVRIY QTNTNAFFQL VEQTVWNYAN GGTWTEANGE HILTMGGSGT SGT LRFSSDT

70 80 90 100 110 120
 GERFLVALGV HNYKRWGDIV TGLSTDQTVV VLNAEYYNSV RSFAREKQLS TYTVTSGQGR

130 140
 KFTVYTYTVAD GNSLRANIII G

Number of amino acids: 141

Molecular weight: 15542.2

Theoretical pI: 8.00

Amino acid composition:

Ala (A)	8	5.7%
Arg (R)	8	5.7%
Asn (N)	10	7.1%
Asp (D)	4	2.8%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	4.3%
Glu (E)	6	4.3%
Gly (G)	16	11.3%
His (H)	2	1.4%
Ile (I)	7	5.0%
Leu (L)	9	6.4%
Lys (K)	3	2.1%
Met (M)	2	1.4%
Phe (F)	6	4.3%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	11	7.8%
Thr (T)	20	14.2%
Trp (W)	3	2.1%
Tyr (Y)	8	5.7%
Val (V)	12	8.5%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 10

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 11

Atomic composition:

Carbon	C	688
Hydrogen	H	1059
Nitrogen	N	191
Oxygen	O	217
Sulfur	S	2

Formula: C₆₈₈H₁₀₅₉N₁₉₁O₂₁₇S₂

Total number of atoms: 2157

Extinction coefficients:

Ext. coefficient	28420
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.829

Instability index:

is computed to be 26.07 This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 74.61

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.257

No Nglyco

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

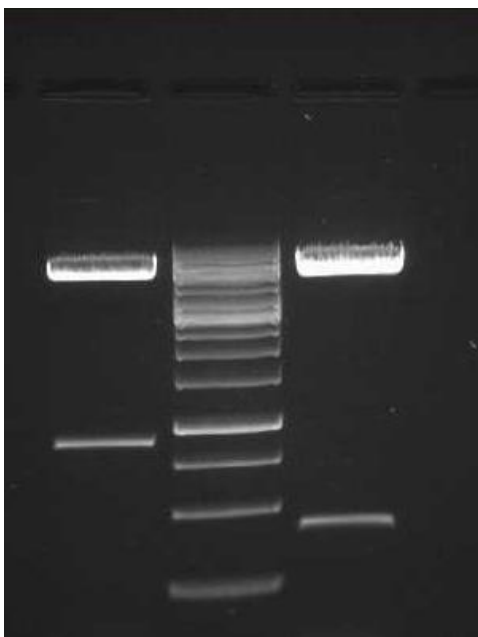
for the following input sequence:

```
atg agc tac acc att acc gtc cgaatt tac cag acc aac acc aat gcg ttt ttc cag
ctt gta gag cag aca gtc tgg aac tac gcc aac ggt gga aca tgg acc gag gcc aac
ggt gag cac atc ctt acc atg ggt ggg agt ggc acc tca ggc act CTAcgc ttt tcc
tcc gac aca ggc gag cgc ttc ctt gtt gcc ctt ggt gtg cac aac tac aaa cgc tgg
ggc gat att gtt act ggt ctg tct acc gac caa acc ggt gtg gtg ctc aac gca gag
tat tac aat tca gtc cgt tcg ttc gcg cgc gag aaa cag ctc tcc acc tac act gtg
acc agt ggg cag gga cgaaag ttc aca gtt aca tac act gta gct gat gga aac agc
ctg agagcc aac atc att atc ggg taa
```


The length is: 426 nucleotides

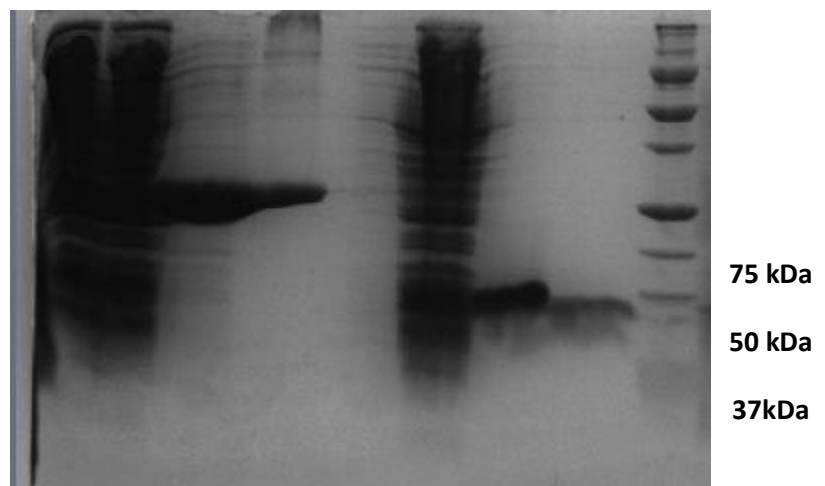
Number of total single rare Arg codons: 3
occurring at codons:
8, 120, 135

Trfb11 Trfb12 dans Pet29²



Purification Trfb11 et 2 sous forme
recombinante par chromatographie d'affinité

Trfb11 Trfb12



5.13 Activité Immunomodulatrice de la lectine de la truffe blanche du Sahara Algérien(*terfezia boudiéri*)

La modulation du système immunitaire (immunomodulation) est devenue un aspect important de la recherche anti-infectieuse. En effet, l'activation excessive ou inappropriée du système immunitaire peut engendrer des conséquences néfastes pour l'hôte.

L'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons est principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, antivirales et anticancéreuses (13,14,53 ;54).

Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet immunomodulateur d'un extrait de lectines obtenu à partir d'un champignon comestible, la Truffe blanche du Sahara Algérien, *Terfezia Boudiéri*, en évaluant l'activité phagocytaire par la mesure du taux de clairance d'une dose de carbone colloïdal testée chez des souris de laboratoire.

Les résultats obtenus sont les suivants :

5.13.1 Effet de *terfezia boudiéri* sur l'activité phagocytaire

Les résultats obtenus et affichés dans la **figure (35)** et le (**Tableau 11**) montrent qu'il y'a une différence dans les moyennes de l'index phagocytaire (k) entre le groupe T (témoin) et les groupes, A, B et C.

L'analyse statistique de notre extrait de lectine sur l'activité phagocytaire montre que l'augmentation de l'index phagocytaire chez les trois groupes (03 lots) est très hautement significative quand elle est comparée avec le lot témoin : valeur de $P=0,000$

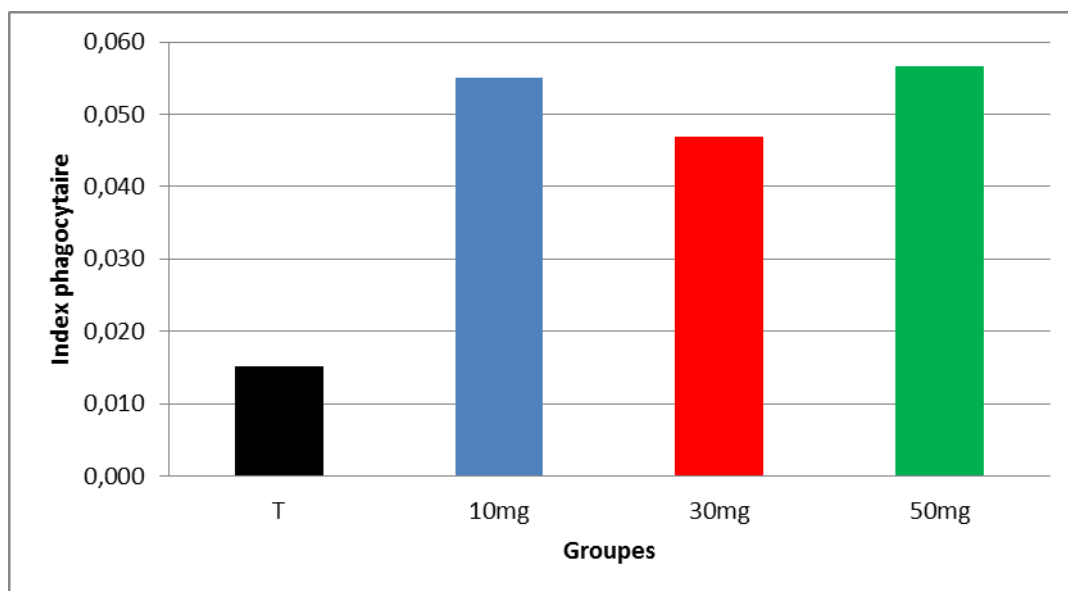


Figure 35: Effet de *terfezia.boudiéri* sur l'index phagocytaire

Tableau 11: Résultats obtenus avec L' ANOVA de l'index phagocytaire par rapport aux lots

Source	Degré de liberté (ddl)	Valeur de F	Valeur de P
Groupe	3 (r-1)	17,72	0,000
Erreur	24 r (n-1)		
Total	27		

5.13.2 Effet de terfezia boudiéri sur la clearance du carbone (demi-vie)

Les résultats obtenus dans la **Figure (36)**, nous montrent qu'il y'a une nette différence entre les groupes dans les moyennes de Demi-vie, et donc entre les taux de clearance du carbone.

L'analyse statistique de notre extrait de lectine sur l'activité phagocytaire montre que l'augmentation du taux de clearance du carbone et donc de son élimination dans le sang et par la suite dans les urines chez les trois groupes (03 lots) est très hautement significative quand elle est comparée avec le lot témoin : Valeur de P=0,000 (**Tableau 12**).

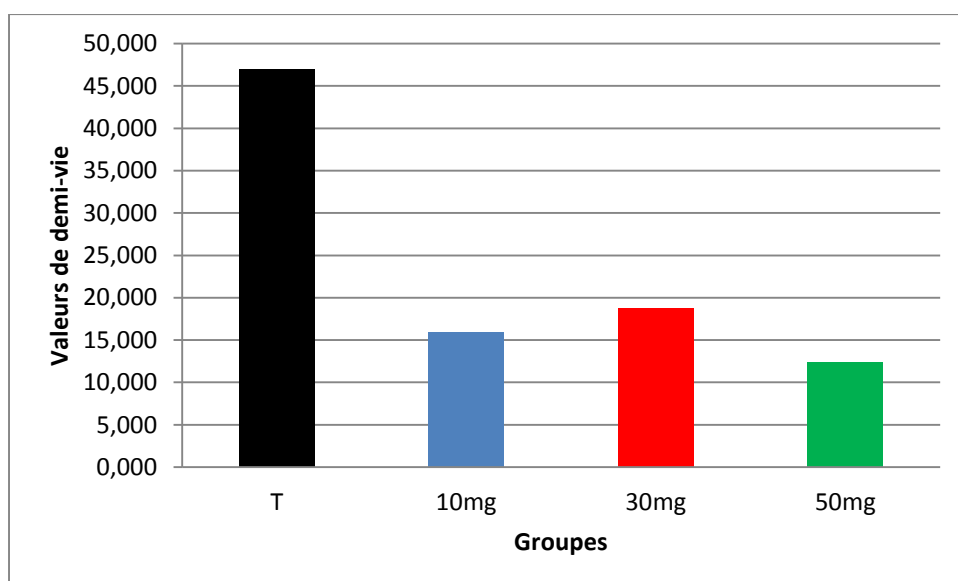


Fig 36 :Effet de terfezia boudieri sur la demi-vie

ANOVA de la Demi-Vie

Tableau 12 : Résultats obtenus avec L' ANOVA de la demi-vie par rapport aux lots

Source	Degré de liberté (ddl)	Valeur de F	Valeur de P
Groupe	3 (r-1)	10,42	0,000
Erreur	24 r (n-1)		
Total	27		

L'utilisation de certains champignons comestibles pour l'homme est aujourd'hui une forme de médecine assez répandue à travers le monde.

Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologique constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales.

Dans la présente étude nous nous sommes limités à la recherche d'éventuels effets immunomodulateurs liés aux lectines contenues dans la truffe blanche du Sahara Algérien.

Le choix de ce champignon assez répandu et consommé par les populations du Sud d'une part, et en raison du manque de recherches dans ce contexte d'autres parts, nous a orienté dans cette voie qu'est l'immunomodulation.

Le nombre de travaux publiés sur les lectines et l'intérêt montré ces dernières années pour les lectines de champignons est principalement motivé par la découverte que certaines lectines ont des propriétés pharmacologiques intéressantes comme par exemple la stimulation du système immunitaire, anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses (54),(53,(14), (13).

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de réaliser ce travail et de tester l'effet des lectines de ce champignon sur le mécanisme des défenses immunitaires, en testant l'activité phagocytaire.

Notre système immunitaire joue un rôle essentiel dans la défense naturelle, il a la capacité de reconnaître les agents étrangers à l'organisme, mettant en jeu deux types de défenses: les défenses non spécifiques, naturelles ou innées et les défenses spécifiques ou adaptatives. La pénétration d'agents pathogènes dans la circulation sanguine, provoque l'activation des cellules phagocytaires, notamment les macrophages, conduit à l'ingestion puis à la digestion de l'agent étranger, ainsi qu'à

la production de cytokines qui, à leur tour, contribuent à l'induction de la réaction inflammatoire (67),(68), (69).

La réponse adaptative ou spécifique représente la deuxième ligne de défense. Elle met en jeu les lymphocytes B et T, portant à leur surface des récepteurs d'antigènes (66).

6- Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre de ces travaux de recherche nous nous sommes intéressés à la purification, à la caractérisation biochimique et à l'étude structurale des lectines contenues dans la Truffe Blanche du Sahara Algérien.

La purification de ces lectines nous a permis d'avoir deux lectines TrFBL1 et TrFBL2.

-La lectine TrFBL1 a été obtenue en grande quantité (11mg /168g de Truffe) , soit un rendement de 6% par purification sur colonne de mannose puis de Fucose. La lectine a une forte activité hémagglutinante (0,003mg/ml) qui est inhibée par le Fucose, et dans une moindre mesure par le mannose. C'est une protéine stable jusqu'à 67°C en présence de Tris PH=7,5, et possède un PHisoélectrique acide (4-5).

Le séquençage de l'extrémité N-terminale a été effectué et aucune ressemblance avec des lectines connues n'a été trouvée.

Une séquence nucléotidique dégénérée a été utilisée pour purifier l'ARN correspondant du champignon.

Des stratégies d'expression et de purification des protéines recombinantes ont permis l'obtention de deux protéines recombinantes sous forme suffisamment pures.

La purification de ces lectines a permis d'avoir la qualité suffisante pour les cristalliser et déterminer les structures 3-D avec de bonnes résolutions. La structure de la protéine native de TrFBL1 et du complexe séléno-méthyl fucoside (Ligand spécifique) a été obtenue et sont en cours d'affinement. La résolution de ces structures va donner la possibilité de produire les premières structures cristallographiques des lectines de la Truffe Blanche du Sahara Algérien. Ces protéines représentent une nouvelle famille structurale de protéines.

-La lectine TrFBL2 a également été obtenue en bonne quantité de 8mg /168g de truffe) soit un rendement d'environ 4% par purification sur colonne de N-Acétyleglucosamine (GlcNac). La lectine a une forte activité d'hémagglutination (0,0009mg/ml) qui n'a pas pu être inhibée par aucun des monosaccharides testés (Fucose, N-acétyleglucosamine, Mannose, Lactose, Galactose, acide Sialique et N-Acétylegalactosamine). Il semble donc qu'elle requière un oligosaccharide de plus grande taille. Ce résultat a été confirmé par les résultats des puces à sucre qui indiquent que TrFBL2 est spécifique pour les oligosaccharides terminés par une séquence GlcNAc β 1-3Gal.

C'est une protéine stable jusqu'à 80°C en présence de Tris PH=7,5, et possède un PHisoélectrique basique égal à 9.

. Le domaine N-terminal est bloqué mais une séquence interne a été déterminée, présentant une forte similarité avec les lectines des champignons *Sclerotium Athelia rolfsii* et *Agaricus biporus* dont les structures cristallographiques sont connues. Cependant la spécificité semble différente. La lectine a été clonée et séquencée. Les structures des complexes TrFBL2GlcNAc β 1-3Gal, et TrFBL2 TF antigène :Gal β 1-3GalNac-O-sérine ont été obtenues à haute résolution.

La transformation et la croissance tumorale sont associées à des modifications de structure de résidus glycaniques membranaires appartenant aux glycoprotéines, aux glycolipides et aux protéoglycanes présents sur la surface cellulaire. Nos résultats constituent les bases moléculaires pour l'utilisation des lectines TrFBL1 et TrFBL2 dans la recherche de métastase comme marqueurs spécifiques possédant les mêmes propriétés que la lectine HPA

(*Helix Promatia Agglutinin*), isolée chez l'escargot et utilisée comme indicateur pronostic pour certains cancers (sein, estomac, colon) ceci afin de résoudre les problèmes constatés lors de l'étude de HPA(77).

Ces deux lectines produites sous forme recombinante pourront être testées pour leur capacité à reconnaître les glycanes portés par les cellules cancéreuses. Il serait aussi intéressant de tester des mutations de TrFBL1 et TrFBL2 recombinantes et leurs applications sur les cellules cancéreuses. Les informations devront aider à développer des outils de marquage qui permettront d'identifier rapidement le caractère métastatique de cellules cancéreuses

-Un autre volet de mon travail a été consacré à un test biologique portant sur l'effet immunomodulateur de l'extrait de truffe testé sur des rats. Pour ce faire, nous nous sommes attelés à évaluer l'activité phagocytaire des macrophages qui sont un élément très important des défenses de l'hôte contre tout corps étranger, et leur activité phagocytaire est un indicateur clé pour l'appréciation des fonctions immunitaires de l'organisme. Cette dernière a été évaluée par la mesure du taux de clairance d'une dose de carbone testée chez des souris de laboratoire.

Dans notre étude, nous avons commencé par extraire en premier lieu les lectines en mettant en évidence leur activité hémagglutinante

(25,1,17)

.Après différentes autres techniques d'analyses biochimiques nous avons obtenu un lyophilisat de cette glycoprotéine que l'on a administrée à un lot de 28 souris males.

Les résultats obtenus, tests statistiques à l'appui, nous ont montré à l'évidence une augmentation franche et hautement significative de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial des souris traitées au lyophilisat de lectines, et qui par voie de conséquence a fait augmenter le taux de clearance du carbone en comparaison avec le lot témoin.

Ces résultats nous montrent par contre que les deux paramètres (index k et la Clearance n'évoluent pas parallèlement à la dose de lectine injectée.

A ce stade du raisonnement, nous pouvons dire que l'intensité de la réponse phagocytaire obtenue chez les souris survient très rapidement et significativement juste après leur inoculation par un corps étranger (encre de chine) ; entre 5 et 15minutes après. Cette stimulation de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial (SRE) pourrait certainement relever de deux mécanismes de défense, spécifique et non spécifique. Le mécanisme spécifique serait lié à la formation d'anticorps contre le corps étranger. Le mécanisme de l'immunité non spécifique serait en relation directe avec l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages mononucléaires, ce qui est en conformité avec les expériences de plusieurs chercheurs (13,14)qui ont révélé une activité immunomodulatrice d'une nouvelle lectine isolée à partir d'un champignon *Volvariella volvacea* ;(70,71,72,73) dans des

travaux réalisées chez des souris traitées par *Argania spinosa* , *Stachys mialhesi* en présence de la lectine du Haricot rouge en présence du polysaccharide d'*Astragalus mongholicus* et les travaux de Yoeli (74), de Nussenzweig (75) et ceux de Biozzi et all (76) sur des rats infectés par *Plasmodium berghei* irradié.

La modulation des fonctions du système immunitaire est, et restera un sujet en plein développement, et il est clair qu'un certain nombre de plantes, de champignons, de molécules comme les lectines ont des propriétés d'importance thérapeutique. Une recherche approfondie de leur mécanisme d'action et de leur structure, devrait permettre leur sélection.

7- BIBLIOGRAPHIE

(1)**Sharon,N.and Halima,Lis.(2003)**Lectins.Kluwer Academic Publishers

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

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

(4)**Herrmann Stillmark(1888)**Ueber ricin,ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus
Comm.L.und einigen anderen Euphorbiaceen Thèse de Doctorat

(5)**Lis ,H.,and Sharon ,N.**Biological properties of lectins ;properties,functions and applications in biology an medecine.Orlando (USA):Liener,L.E.;Sharon,N.;Goldstein I.J.,Academic PressInc,1986,266-293

(6)**Debray,H.,Decout ,D,Stecker ,G.,Spik,G.,Montreuil ,J.(1981)**.Eur.J.Biochem,117,41-55

(7)**Wiley ,D.C,and Skehel,J.J.(1987)**.The structure and function of the hemagglutinin
Membrane glycoprotein of influenza .Annu.Rev.Biochem,56,365-394.

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

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

- (10) **Alencar, N.M., Cavalcante, C.F., Vasconcelis, M.P., Leite, K.B., Arangao, K.S., Assrevy, A.M., Nogueira, Cavada, B.S. and Vale, M.R. (2005)** Anti inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sériceus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm . Pharmacol* ,57,919-922
- (11) **Guillot J., Guerry, M., Kanska, G., Caldefie. Chez, F., Delatour, M and Penault Uorka, F. (2004)**. Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bull Cancer*,91,141-158
- (12) **Rudiger ,H., and Gabius., H.J. (2001)** Plant lectins. Occurrence, biochemistry, fonctions and applications. *Glycoconj .J*,18,589-613
- (13) **She ,Q.B., Ng, T.B. and Liu ,(1988)**. A novel lectin with potent immunomodulatory Activity isolated from both fruiting bodies and cultures mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research .Communication*,247,106-111
- (14) **Size ,S.C.W., H.O., J.C.K. and Liu, W.K. (2004)**. *Volvariella volvacea* lectins activities T lymphocytes by calcium dependent pathway . *J. Cell. Biochem. y*,92,1193-1202.
- (15) Pemberton (1994) Agglutinins cal properties from some british higher fungi, *Mycol. Res.*, 98,277-290.
- (16) **Goldstein, IJ, Hughes. R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N.** What should be called a lectin? *Nature* 285 (1980) 66
- (17) **Gianluca Cioci** ; Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongigiques.. *Biomolécules*. Université Joseph-Fourier -Grenoble I, 2006. French. <tel-00081084>
- (18) **Himansha Singh, Sai Pantha Sarathi**, Inside of lectins-A review . *International journal of scientific&Engineering Research*, Volume3, Issue 4, April-2012. ISSN 2229-5518
- (19) **Yagi, F., T. Iwya, T. Haraguchi and I.J. Goldstein, (2002)**. The Lectin from leaves of Japanese cycad. *Cycas revolute* Thumb. (Gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *Eur. J. Biochem.*, 269: 4335-4341
- (20) Lis, H., and Sharon, N. (1986) Application of lectins, p. 293- 370. In I. E. Liener, N. Sharon, and I. J. Goldstein (ed.), *the lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- (21) **Lenka s., Imberty A., Jaroslav, k., 2006**: Modelisation moleculaire des lectines et des glycosyltransferases. thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université joseph

fourier. universite grenoble i – joseph fourier.

(22) **Karoline S.A., 2008** : Etudes structure-fonction de lectines (Discl et Discll) de *Dictyostelium discoideum*. These Pour l'obtention du Diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier. Universoté Grenoble 1- Joseph Fourier.

(23) **Peumans W.J., Van Damme J.M. (1995)**-lectine as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, ,109,347-352

(24) **Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M. (2005)** Structural basis for high affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 525- 534.

(25) **Sharon, N. (1996)** Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*,408, 1-8.

(26) **Imberty, A., Mitchell, E.P. and Wimmerová, M. (2005)** Structural basis for high affinityglycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 525 534.

(27) **Low, D., Braaten, B. and Van der Woude, M. (1996)** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology PressA, Washington D.C.

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

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

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

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

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

(33) **Giollant, M., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., and Didier, E. (1993)** Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus* - research on the possible

involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol.*, 101, 513-522.

(34) **Lee, Y.C. and Lee, R.T. (1995)** Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327.

(35) **Park, S., Lee, M.R. and Shin, I. (2008)** Chemical tools for functional studies of glycans. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 1579-1591.

(36) **Renato DE A, Moreira (1991)**. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Suppl. II, 211-218.*

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

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

(39) **Falasca A.I. (1989)**. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowics. *Febs Lett.*, , 246(1-2) 159 -162

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

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

(42) **Lopez S (2003)**. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta medica*,69 (2), 109-112

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

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

(45) **Kulkarni G.V (1998)**. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A

induced apoptosis in human fibroblast. *Experimental cell.Research*, 245,170-178

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

(47) **Mancheno J., Tateno H., Goldstein I.J., Martinez-Ripoll M., Hermoso J., 2005:** Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *J. Biol. Chem.*, 280, 17251-17259.

(48) **Mancheno J., Tateno H., Goldstein I.J., Martinez-Ripoll M., Hermoso J., 2005:** Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *J. Biol. Chem.*, 280, 17251-17259.

(49) **Jaffe W.G.** hemagglutinins (Lectins) (1980). In toxic constituents of plant foodstuffs. New –York,, Academic Press, 502 p.

(50) **Kenoth R., et al (2001).** Thermodynamic and kinetic analysis of porphyrin binding to *Trichsanthes cucumerina* seed lectin. *Eur.J. Biochem.*, , 268, 5541-5549

(51) **Murdockl .L Shade R.E (2002).** Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insectectes. *J.Agric. food. Chem.* 50 (22)6605-6611

(52) **Freund, J., J. Casalal, and H. P. Hismer. 1937.** Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 37:509.

(53) **Wang,H.,J.Gao and T.B. Ng,2000.** A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275:810

(54) **Waiser, S.P. and A.L. Weis, 1999.**Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms : A modern perspective . *Crit. Rev. Immunol.*,19:65-96

(55) **Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993)** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291.

(56) **Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Jr., Brice, M.D., Rodgers, J.R.,**

Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: a

computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* **112**: 535-542.

- (57) **Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Jr., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977)** The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* **112**: 535-542.
- (58) **Dulaney J.T.(1979)** Factors affecting the binding of glycoproteins to concanavalin A and Ricinus communis agglutinin and the dissociation of their complexes communis. Analytical Biochemistry. 12/1979; 99(2):254-67. DOI: 10.1016/S0003-2697(79)80004-4 Source: PubMed
- (59) **Drickamer, K. (1988)** Two distinct classes of carbohydraterecognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 263, p9557–9560.
- (60) **Nicolson, G. L. (1974)** The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39, p89-190.
- (61) **Wu, A. M., Sugii, S. and Herp, A. (1988)** A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 228, p819-847.
- (66) **Revillard, J.-P., 2001.** Immunologie. Bruxelles, Belgium: De Boeck Université. 595 p.
 Robyt, J.F., 1998. Essentials of Carbohydrate Chemistry. New York, U.S.A.: Springer-Verlag, Inc. 399 p.
- (67) **Josien, R., 2002.** Cellules dendritiques. Dans: Immunologie, de la biologie à la clinique. J.F. Bach et L. Chatenoud. Paris, France: Flammarion Médecine-Sciences. 369 p.
- (68) **Genetet, N., 1997.** Immunologie. Paris, France: Éditions Médicales Internationales. 604p
- (69) **Chatenoud, L, 2002.** Cellules de l'immunité. Dans: Immunologie, de la biologie à la clinique. J. F. Bach et L. Chatenoud. Paris, France: Flammarion Médecine-Sciences. 369 p.
- (70) **Youcef Necib(a), *, Ahlem Bahi(a), Sakina Zerizer(b) , Cherif Abdennour(c), Mohamed Salah Boulakoud(c)**Immunomodulatory Activity of Argan oil (*Argania Spinosa. L*) *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 23(1), Nov – Dec 2013; n° 11, 57-59
- (71) **Youcef Necib (a), *, Ahlem Bahi (a), Sakina Zerizer (b)** Immunomodulatory Effect of Argan oil (*Argania spinosa. L*)After Exposure to Mercuric Chloride in Mice *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 23(1), Nov – Dec 2013; n° 37, 191-193
- (72) **Boutheyna Aribi,Sakina Zerizer*1,Zahia Kabouche*2,**Immunomodulatory activity of Argania Spinosa seeds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491 Vol 5, Issue 3, 2013

- (73) **Hou Yufang.,Hou Yubao.,Yanyan Liu .,Qin Guang.,Li Jichang.(2010)**Extraction and purification of lectin from red kidney bean and preliminary immune function studies of the lectin and four Chinese herbal polysaccharides *.Journal of biomedicine and biotechnology ID217342:1-9.*
- (74) **Yoeli, M. (1966)** Bull. Soc. Path. exot., 59, 593
- (75) **Nussenzweig, R. S. (1967)** Exp. Parasit., 21, 224
- (76) **Biozzi, G., B. Benacerraf, B. N. Halpern (1953):** Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system II. J. Exp. Path. 34, 441-457.
- (77)**M.Dwek, H. Ross, A. Streets et coll.,** Helix pomatia agglutinin lectin –binding oligosaccharides of aggressive breast cancer” Int J Cancer, 2001 Mar 20;95 (2): 79-85.
- (78) **Abourouh .M., 2011 :** Truffes du désert du Maroc : Diversité et modes d’exploitation.
- (79) **Blixt, O., et al. (2004)** Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 17033-1703
- (80) **Philippe Desjardins, (1), Joel B.Hansen, (1), and Michael Allen (1).**Microvolume Spectrophotometric and Fluorometric Determination of Protein Concentration.Current Protocols in Protein Science.3.10.1-3.10.16.**February 2009.**
- (81) **Edman P and Begg G (1967)** A protein sequencator. European Journal of Biochemistry 1:80 –91.
- (82) **Rebuffat S., el Hajji M., Hennig P., Davoust D. et Bodo B.,** Isolation, sequence, and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. *Int J Pept Protein Res* 34, 200-210 **(1989)**

Nom : ZITOUNI	Date de Soutenance : 20 Mai 2015
Prénom :Abdelbaki	
Thème : Extraction, purification ,caractérisation et effet immuno-modulateur des lectines fongiques	
de <i>Terfèzia boudiéri</i> (Truffe Blanche du Sahara Algérien.)	

RESUME

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, polyvalentes et d'origine non immunitaire, qui se lient de manière réversible et spécifiquement aux hydrates de carbone. Elles sont souvent multivalentes et possèdent la capacité bien connue d'agglutiner les érythrocytes.

Les champignons, y compris les champignons microscopiques et levures, ont fait l'objet d'un vif intérêt ces dernières années en raison de leur potentiel biomédical et leurs applications biotechnologiques. Les informations sur les lectines fongiques, particulièrement du point de vue structurel, sont minimales par rapport à celles de leurs homologues végétales et animales. C'est dans ce contexte que se situe notre objectif qui s'est concrétisé par la caractérisation biochimique et structurale de la lectine fongique *Terfèzia boudiéri* (Truffe du Sahara Algérien) sur laquelle nous n'avions auparavant aucune donnée de ce type .

Deux lectines TrFBL1 et TrFBL2 ont été extraites, purifiées, caractérisées et séquencées.

Les structures en 3D de la protéine native de TrFBL1 et de son complexe avec un ligand, le sélénométhyl fucoside ont été obtenues et sont en cours d'affinement .Les structures des complexes de TrFBL2 avec le N-Acétyleglucosamine et deux autres glycanes ont été obtenues à haute résolution.

Le Génome de *Terfèzia boudiéri* a été obtenu et est disponible depuis le mois de Décembre 2013, et fera désormais partie de la Base de données recueillies dans Lectin 3D(<http://lectin3d.cermav.cnrs.fr>).

Mots clés : lectines, <i>terfèzia boudiéri</i> , purification, caractérisation , immuno-modulation .	
Laboratoire de recherche : Immunologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Constantine 1 , Laboratoire de Glycobiologie Moléculaire. CERMAV de GRENOBLE .(CNRS) France.	
Directeur de thèse : Mr NECIB Youcef	Professeur, Université des Frères Mentouri
Devant le Jury :	
Président : Mr KHELIFI. D	Professeur, Université des Frères Mentouri
Examineurs : Mr ABDENNOUR. C	Professeur ,Université Badji Mokhtar-Annaba
Mr SAKA . S	Professeur ,Université Badji Mokhtar-Annaba
Mr KHENNOUF. S	Professeur ,Université Ferhat Abbès -Sétif
Mr BENSEGUENI. A	Professeur, Université des Frères Mentouri

