



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
Frères Mentouri Constantin I University
Université Frères Mentouri Constantine I

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE-1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE

N° d'ordre :

Série :

Thèse Présentée par :

TOUMI Mohammed Esseddik

En Vue De L'obtention Du Diplôme De DOCTORAT De 3ème Cycle LMD

EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

THEME :

Purification et caractérisation des lectines à partir des champignons : *Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus* avec des tests biologiques

Devant le jury :

Soutenu le :

Président : HAMIDECHI M. A.

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Directeur de thèse : NECIB Y.

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Examineurs :

NOUADRI T.

MCA Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

ABDENNOUR C.

Pr. Univ. Badji Mokhtar ANNABA

KHELILI K.

Pr. Unive. Badji Mokhtar ANNABA

Année universitaire: 2020/2021

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, Professeur NECIB Youcef, directeur du laboratoire de la Genie Microbiologique et Applicatios, Université MENTOURI- CONSTANTINE 1, de m'avoir aidé dans la réalisation de ce travail avec ses motivations et conseils proposés au niveau theorique et pratique ainsi que son collegue Mr. NOUADRI Taher pour l'oppertunité de travail et accessibilité avec son equipe de recherche.

J'exprime mon estime et mes remerciements aux membres de mon jury: Le Professeur HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je le remercie également pour ses conseils et son soutien.

Professeurs KHELILI Kamel, ABDNOUR Cherif et ainsi que le MCA. NOUADRI Taher d'avoir pris de leur temps pour examiner ce travail.

Je tiens à passer mes chères expressions de remerciement et de respect agréablement à mon Directeur de thèse Pr. NECIB Youcef et Pr. PERDUCA Massimiliano qui grâce à leurs efforts et potentiels durant toutes les années de mon doctorat le présent travail sort à la lumière pour la vie scientifique.

Un grand remerciement de plus à Pr. PERDUCA.M qu'il est grâce à lui, nous offre une opportunité pour transférer les informations et d'apprendre des nouvelles compétences scientifiques et bien sûr nous nous n'oublierons pas son ambiance de collaboration auxquels nous complétons ce sujet intéressant.

Aussi, un grand merci à mon cher encadreur du cycle Master Pr. Hamidechi Mohamed Abdelhafid pour tous ces encouragements et collaborations durant les années de mes études universitaires.

Je dois passer mes salutations et remerciements à l'équipe du laboratoire de Biocrystallography and nanostructure. Département de Biotechnologie. Université de Vérone. Italie, pour ces aides et ces orientations proposées durant ma présence au sein du laboratoire et exceptionnellement mon cher ami Dr. Salvatore Calogero Gaglio.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide, et particulièrement à mes collègues Rebai Redouane, Kebaili Fethi Farouk et Mr. Boutamina Ali.

Je dédie cette thèse à :

Mes chers parents, source de vie, d'amour et d'affection

Mes chers frères et chères sœurs, source de joie, d'ambiance et

du bonheur

Toute ma famille, l'origine d'espoir et de motivation

Mes chers amis et collègues

Mon cher ami Kheredine Foughali décédé qu'ALLAH ait pitié

de lui

Mes chers Professeurs

Chers lecteurs

Résumé :

Dans cette étude, deux lectines fongiques ont été purifiées et caractérisées à partir *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 (dénommées LDL et PSLec respectivement) par différentes techniques chromatographiques et ses potentiels biologiques ont été évalués. La caractérisation de LDL a montré qu'elle est une agglutinine hétérodimérique (18 et 19 kDa du poids moléculaire pour chaque unité), spécifique pour le galactose et le méthyl- α -D-galactopyranoside ; une affinité pour le lactose, la fétuine et la mucine. LDL induit une hémagglutination (HA) à des températures inférieures à 70 °C, dans pH optimal égale à 7. L'essai d'immunomodulation (test de clairance de carbone) par LDL *in vivo* a montré un effet hautement significatif de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial des souris à $p < 0,0001$. La lectine PSLec a été caractérisée par une structure homo-tétramérique, de 35,904 kDa de poids moléculaire pour chaque sous unité déterminé par LC-MS/MS-MALDI. Elle est une lectine métallo-dépendante, stable à pH alcalins. En outre, l'étude protéomique du Mascote de ces peptides fragmentés par la trypsine et MALDI-TOF/TOF nous a montré que PSLec a un score d'identité de 43 avec la protéine 16 liée à l'autophagie de *Meyerozyma guilliermondii* (souche ATCC 6260/ CBS 566/ DSM 6381/ JCM 1539/ NBRC 10279/ NRRL Y -324) (Expasy id : ATG16_PICGU). Le test préliminaire d'activité antitumorale MTT a révélé que la PSLec est une lectine cytotoxique.

Mots-Clés : lectine, *Lactarius deliciosus*, agglutination, affinité, spécifique, clairance, activité phagocytaire, *Laetiporus sulphureus*, MALDI-TOF/TOF, activité cytotoxique.

المخلص :

في هذه الدراسة، تم عزل اثنين من اللكتينات الفطرية (Lectines fongiques) من السلالتين *Lactarius deliciosus* و *Laetiporus sulphureus* TME25 و TME43 (سميا على التوالي LDL و PSLeC) من خلال تقنيات كروماتوغرافية مختلفة وتم تقييم نشاطاتها البيولوجية. أظهرت دراسة خصائص LDL أنه بروتين ثنائي الوحدات (18 و 19 كيلو دالتون كوزن جزيئي لكل وحدة)، بالإضافة إلى خاصيته في الارتباط مع سكر Galactose و Methyl- α -D-Galactopyroside، و جاذبيته نحو للاكتوز وبروتين الفيتون والميسين. يتمتع اللكتين LDL بنشاط التراص الدموي (HA) agglutination عند درجات حرارة أقل من 70 درجة مئوية، ودرجة pH مثلى تساوي 7. كما بين نتائج اختبار تحفيز المناعة (اختبار إزالة الكربون من الدورة الدموية) من قبل LDL في الجسم الحي أظهر تأثيرا كبيرا على النشاط البلعمي (activité Phagocytaire) للجهاز الشبكي البطاني système réticulo-endothélial باحتمال p > 0.0001. ويتميز PSLeC ببنية رباعية الوحدات structure homotéramérique 35,904 كيلو دالتون كوزن جزيئي لكل وحدة حددت بتقنية LC-MS/MS-MALDI. إنه لكتين يتطلب الارتباط مع المعادن الكاتيونية Métalloprotéine مستقرا في الأوساط القلوية ذات درجة pH < 7. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت لنا الدراسة البروتيومية (étude protéomique) أن الببتيدات اللكتين المجزأة من قبل التريسين و Maldi-TOF / TOF أن PSLeC لديها درجة هوية (identité) 43 مع البروتين : (Expasy id : protéine 16 liée à l'autophagie (ATCC 6260/CBS (سلالة Meyerozyma guilliermondii للفطر المجهرى (566/DSM 6381/ JCM 1539/NBRC 10279/NRRL Y-324). كشف اختبار الأولي لتنشيط الخلايا السرطانية MTT أن PSLeC هو لكتين ذو نشاط سمي على الخلايا الحية activité cytotoxique.

الكلمات المفتاحية : Lectine، *Lactarius Deliciosus*، agglutination (HA)، خاصية ارتباط، جاذبية، تصريح، نشاط بلعمي، *Laetiporus Sulphureus*، Maldi-TOF / TOF، نشاط سمي خلوي .

Abstract:

In this study, two fungal lectins having a lactose affinity have been purified and characterized from *Lactarius deliciosus* strain TME25 and *Laetiporus sulphureus* strain TME43 (called LDL and PSLec respectively) by different chromatographic techniques and its biological potentials were evaluated. The characterization of LDL showed that it is a heterodimeric haemagglutinin (18 and 19 kDa molecular weight for each unit), specific for galactose and methyl- α -d-galactopyranoside; affinity for lactose, fetuin and Mucin. LDL induces agglutination (ha) at temperatures below 70 ° C, and in optimal pH equal to 7. The immunomodulation assay (carbon clearance test) by LDL *in vivo* showed a highly significant effect of phagocyte activity of mice reticulo-endothelial system at $p < 0.0001$. The PSLec was characterized by a homotetrameric structure of 35,904 kDa of each subunits determined by LC-MS/MS-MALDI. It is a metallodependent lectin, stable at alkali pH. In addition, the proteomic study of the mask of these peptides fragmented by the trypsin and MALDI-TOF/TOF showed us that PSLec has an identity score of 43 with the Autophagy-related protein 16 from *Meyerozyma guilliermondii* (ATCC strain 6260 / CBS 566 / DSM 6381 / JCM 1539 / NBRC 10279 / NRRL Y -324) (Expasy Id: ATG16_PICGU). The antitumoral preliminary assay MTT revealed that PSLec is a cytotoxic lectin.

Keywords: lectin, *Lactarius deliciosus*, agglutination, affinity, specific, clearance, phagocytic activity, *Laetiporus sulphureus*, MALDI-TOF/TOF, cytotoxic activity.

AAA *Agrocybe aegerita* agglutinin

AAL *Agrocybe aegerita* lectin

ABA II *Agaricus bisporus* agglutinin II

ABA IV *Agaricus bisporus* agglutinin IV

Ac Si Acide sialique ou l'acide N-acétylneuraminique NeuAc

ACG *Agrocybe cylindracea* galectin

AMS Sulfate d'ammonium

ANOVA Analysis of variance

APL *Auricularia polytricha* lectin

BEL *Boletus edulis* lectin

CDR Domaine de reconnaissance saccharidiques

CDs Cellules dendritiques humaines

CML *Cordyceps militaris* lectin

CMP Cytidine-5'-monophosphate

CMP-Sia Cytosine-5'-monophosphate-N-acide neuraminique

CNL *Clitocybe nebularis* lectin

DEAE-Sephacyl Diethylaminoethyl-Sephacyl gel

ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FasR (APO-1, CD95) est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs de TNF

FimH Adhésine Fimbrial Type 1

FPLC Fast protein liquid chromatography

Gb3 Globotriaosylceramide

GFL *Grifola frondosa* lectin

GLL *Ganoderma lucidum* lectin

GM1 Monosialotetrahexosylganglioside

GM2 (18:0) Sialotriaosylceramide: (N-acetyl-beta-D-galactosaminyl-(1->4)-alpha-N-acetyl-neuraminosyl-(2->3)-beta-D-galactosyl-(1->4)-beta-D-glucosyl-N-acylsphingosine)

GNA *Galanthus nivalis* lectin

HRL *Hygrophorus russula* lectin

IC₅₀ Concentration inhibitrice médiane

ITS Internal Transcribed Spacer

Lec Lectine

LDL *Lactarius deliciosus* lectin

Le^x Antigène Lewis X

LRL *Lactarius rufus* lectin

LSL *Laetiporus sulfureus* lectin

MAL *Mycoleptodonoides aitchisonii* lectin

MALDI-TOF/TOF Tandem Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/ Time of Flight

MAP-Kinase Mitogen-activated protein kinase

MIC Concentration inhibitrice minimale

MOA *Marasmius oreades* Mannose-recognizing agglutinin

MOL *Marasmius oreades* Mannose-recognizing lectin

Muc/PSM Mucine porcine de stroma

MPS système monocyte phagocytaire

ND Non déterminé

nuc-LSU Ribosomal Nuclear-Large Subunit gene

nuc-SSU Ribosomal Nuclear-Small Subunit gene

PA-III *Pseudomonas aeruginosa* lectin 2

PA-II *Pseudomonas aeruginosa* lectin 1

PHA *Phaseolus vulgaris* Agglutinin

PMN Les leucocytes polymorphonucléaires

PNA *Arachis hypogaea* lectin ou Peanut agglutinin

PPL *Pleurocybella porrigens* lectin

PSL *Polyporus squamosus* lectin

PSLec *Polyporus sulphureus* lectin

RBC Globule rouges ou Red blood cells

RE Réticulum Endoplasmique

SAC Activité spécifique (UHA/mg de protéines)

SER Système Réticulo-endothélial

T Antigène Thomsen-Friedenreich

TCR Lymphocyte T- Cell receptor

TK Tyrosine kinase enzyme

TLR4 Toll-like receptor 4

TML-1 *Tricholoma mongolicum* lectin 1

TML-2 *Tricholoma mongolicum* lectin 2

Tn Tumor-associated carbohydrate antigen

TNF- α Tumor necrosis factor- alpha

V-CAM La protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1

Liste des figures

Figure	Légende	Page
1	Structure tridimensionnelle de la concavoline A. Une lectine d'origine légumineuse de <i>Canavalia ensiformis</i> . Possède une structure simple qui comprend quatre S/U symétriques. Chaque monomère, comporte un site CDR spécifique du mannose ou du glucose et un site pour la fixation des oligoéléments manganèse et calcium (source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., <i>et al.</i> , 1999)	6
2	Structure mosaïque d'une lectine virale (H1 hémagglutinine du virus A d'influenza) : Contient de nombreux domaines α et β et des CDR pour le 2-(Acetylamino)-2-déoxy- α -D-glucopyranose et N-acétyl-D-glucosamine (source PDB: 1RUZ, Skehel J.J., <i>et al.</i> , 2004).	7
3	Représente la structure des lectines en complexe moléculaire : a- schéma de différents types de fimbriae chez <i>E. coli</i> (Sharon N. et Lis H., 1998), b- la structure tridimensionnelle d'une S/U de la lectine FimH chez <i>E. coli</i> uropathogène responsable de l'infection urinaire et une spécificité pour le mannose (représenté en bâtons épais) (source PDB: 1tr7, Bouckaert J., <i>et al.</i> , 2004)	7
4	L'interaction entre le galactose ([GAL]2) et la galectine humaine 'galectin 1' par des liaisons hydrogènes entre groupements hydroxyles en position 6 du sucre avec les chaînes latérales des acides aminés respectivement : l'asparagine (N61) et le glutamate (E71) ; le Gal est représenté par des bâtons épais, les aa par des bâtons fins, les liaisons hydrogènes par des pointillés bleus (source PDB: 1GZW, Lopez-Lucendo M.I.F., <i>et al.</i> , 2004)	9
5	L'interaction entre les aa du CDR de lectine de « EcorL » avec la N-acétylgalactosamine (A2G [401]). Les liaisons H-H sont représentées par des pointillés bleus et les interactions hydrophobes avec des pointillés griss (source PDB : 3N35, Thamotharan S., <i>et al.</i> , 2011)	10
6	L'interaction entre mannose et protéine A du rat (<i>Rattus norvegicus</i>) lectine de type C et méthyl- α -L-fucose (Met-Fuc) par des liaisons hydrogènes (pointillés bleues) et des liaisons de coordination 'ionique' (pointillés violettes) ont été assurées par le calcium (CA703 avec les groupements hydroxyle du sucre (source PDB: 1KWW, Ng K.K., <i>et al.</i> , 2002)	10

Liste des figures

7	Les principaux sucres intervenant dans la glycosylation des protéines et lipides membranaires, la flèche indique le groupement qui permet de former une liaison hydrogène (le site de glycoconjugaison) et qu'ils sont détectés par les lectines (Gabijs H.J., <i>et al.</i> , 2009)	11
8	Champignon <i>Lactarius deliciosus</i> de la pinède Tonga. Park national El Kala-Taref (photo personnelle prise le 10/11/2016, à l'aide d'une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).	29
9	Représentation de l'opéron ribosomique des eucaryotes (nuc-SSU, petite sous unité ribosomique 18s ; nuc-LSU, grande sous unité ribosomique 28s et ITS, séquence interne du transcrit), et la position des amorces utilisées dans l'amplification de ces régions d'ADNr (Halwachs B., <i>et al.</i> , 2017)	30
10	Test d'HA des érythrocytes fixées, en présence d'un témoin négatif (PBS), (photo personnelle prise le 15/03/2017, avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel)	31
11	Plan experimental suivi dans l'évaluation du potentiel immunomodulateur de la lectine LDL <i>in vivo</i>	37
12	<i>Laetiporus sulphureus</i> attachée au tronc d' <i>Eucalyptus</i> . (Photo personnelle prise le 12/2018 avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel)	38
13	La réaction de réduction du réactif MTT de coloration jaune vers le formazan de coloration violète soit par des enzymes mitochondriales ou des agents réducteurs	45
14	a- Profil chromatographique de la séparation des protéines contenues dans la fraction 30-80% de saturation en AMS sur colonne DEAE-Sephacyl ; b- Evaluation de l'activité hémagglutinante des fractions récupérées	47
15	Test d'HA des fractions du pic P2	48
16	Résultats d'électrophorèse de la fraction active récupérée après purification par échangeuse d'anions DEAE-Sephacyl (a- SDS-PAGE, b- PAGE). Ligne 1 représente les protéines de poids moléculaire connu du marqueur Prestained BlueRay PS-103 ; les lignes 2 et 3 représentent la lectine de <i>L. deliciosus</i> et les sous unités de la lectine (A et B).	49

Liste des figures

17	Test d'inhibition de l'activité hemagglutinante par les sucres et les glycoprotéines (photo personnelle prise avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).	50
18	Effet de la variation de température sur la stabilité de la protéine. (Photo personnelle prise avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel)	51
19	Activité phagocytaire K chez les différents groupes : la boîte à moustache de la variation moyenne \pm SD de l'indice phagocytaire (k comme activité phagocytaire) comparée au groupe Témoin	53
20	Effet de LDL sur l'indice phagocytaire corrigé. La boîte à moustache de la variation moyenne \pm SD de l'activité phagocytaire corrigée α en fonction des différentes doses de lectine par rapport au groupe Témoin	54
21	Effet du LDL purifiée sur le temps de clairance du carbone: la boîte à moustache de la variation moyenne \pm SD de la variation de $t_{1/2}$ par rapport au groupe Témoin	54
22	Le profil chromatographique de la fraction 80% de saturation en AMS: a- le spectre d'absorption UV des fractions séparées sur le Sepharose 4B obtenu par l'FPLC ; b- le spectre des fractions éluées par le lactose 0,4 M, après la mesure des densités optiques	56
23	Résultats du poids moléculaire de la lectine PSLec : a- Electrophorèse PAGE, le puits 1 : le marqueur de taille protéique PS-103, les puits 2 jusqu'à 6 représentent la bande protéique de la lectine PSLec après la concentration par l'acétone ; b- Electrophorèse SDS-PAGE, les puits 1 et 2 représentent les deux bandes obtenues après la dénaturation de la lectine PSLec (A et B) de PM approximative 36 et 18 kDa respectivement, le puits 3 correspond au marqueur PS-103	57
24	Détermination du PM de la lectine par MALDI-MS, le spectre exprimé avec le rapport masse/charge (m/z)	57
25	Résultats du test d'inhibition par les sucres de PSLec	58
26	Influence de la variation du pH (a) et la température (b) sur l'activité hémagglutinine (HA) de PSLec	60
27	Effet du traitement par l'EDTA disodique et différents métaux sur l'activité HA de la PSLec	60

Liste des figures

28	Spectre de la Fragmentation Tandem MALDI-TOF/TOF, les ions massiques des peptides ont indiqué selon le rapport m/z et l'intensité d'occurrence	61
29	Effet du traitement par des concentrations de PSLeC sur la croissance des cellules malignes A375 et les cellules normales NHEM, les résultats ont exprimé en $\text{Moyen} \pm \text{SD}$, avec les équations et les coefficients de corrélation correspondantes $Y = 3,658X + 35,98, 0,4746$; $Y = 3,894X + 4,786, 0,9243$ pour les cellules NHEM et A375 respectivement	64

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
1	Quelques lectines utilisées dans le groupage sanguin (Sharon N. et Lis H., 2003)	13
2	Certains glycanes du cancer détectés par les lectines (Guillot J., <i>et al.</i> , 2004)	15
3	Certains caractères biochimiques de quelques lectines de basidiomycètes (Hassan M.A.A., <i>et al.</i> , 2015 ; Singh S.S., <i>et al.</i> , 2015)	17
4	Quelques lectines purifiées à partir des champignons ayant une activité antitumorale	21
5	Quelques lectines de champignons activant la mitogénèse	22
6	Taxonomie et quelques propriétés biologiques des deux champignons étudiés <i>L. deliciosus</i> et <i>L. sulphureus</i>	28
7	Purification de la lectine à partir <i>Lactarius deliciosus</i>	46
8	Résultats de test d'inhibition d'HA par les sucres.	50
9	Résultats de l'évaluation de l'inhibition par les glycoprotéines	51
10	Effet de la variation de pH du milieu sur le titre d'hémagglutination (UHA)	51
11	Effet de traitement par l'EDTA sur le titre d'HA de LDL	51
12	Effet du prétraitement avec LDL sur l'activité phagocytaire, le taux de clairance, et la demi-vie du colloïde de carbone <i>in vivo</i>	53
13	Etapes de purification de la lectine PSLec à partir la poudre de <i>L. sulphureus</i>	55
14	Effet de différents sucres et les glycoprotéines sur l'activité HA de PS Lec	59
15	Résultats de l'effet de traitement par l'EDTA et les métaux sur l'activité HA	59
16	Résultats de la recherche de l'empreinte peptidique (Mascot peptide fingerprint research)	62-63

Sommaire

Remerciements *i*

Dédicaces *ii*

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tables et tableaux

Introduction..... 1

Revue bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur les lectines 4

1. Les lectines 4

1.1. Découverte et définition 4

1.2. Biochimie des lectines 5

2. Applications des lectines dans le domaine thérapeutique 12

2.1. Agglutination et groupage sanguin 12

2.2. Applications immunologiques 14

2.3. Traitement et diagnostic du cancer 14

Chapitre 2: Les lectines chez les basidiomycètes..... 16

1. Les lectines des basidiomycètes 16

2. Caractéristiques des lectines des basidiomycètes 16

3. Rôles des lectines dans le cycle de vie des champignons..... 18

4. Classification des lectines fongiques 18

4.1. Les lectines fongiques réparties des familles des Galectine, R-Type, Jacalin et Monocot Related..... 19

4.2. La famille des lectines type ABL-Like (Fungal Fruiting Bodies)..... 19

4.3. La famille des Fuc-lectines AAL-like 20

4.4. La famille des *Pholiota squarrosa* like lectines (PhoSL) 20

5. Les activités biologiques des lectines fongiques 20

5.1. Activité antitumorale	20
5.2. Activité mitogénique et anti-mitogénique	22
5.3. Activité immunomodulatrice	23
5.4. Activité antivirale	23
6. Intérêt de purification et les applications biotechnologiques des lectines	24
7. Techniques de purification des lectines des basidiomycètes	25
8. Les champignons de la flore algérienne (<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i>)	26
8.1. Données taxonomiques des deux champignons collectés	26
8.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques	27

Matériels et méthodes

Partie 1: Caractérisation d'une lectine du champignon *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et évaluation *in vivo* de leur potentiel immunomodulateur.

1. Récolte et Identification moléculaire de <i>Lactarius deliciosus</i>	29
2. Extraction et Purification de la lectine du champignon <i>Lactarius deliciosus</i>	30
1.1. Extraction de protéines totales	30
1.2. Préparation et fixation des érythrocytes	30
1.3. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA)	31
1.4. Purification	32
3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée	33
3.1. Détermination du poids moléculaire	33
3.2. Dosage des protéines	34
3.3. Test limite d'HA et d'inhibition	34
3.4. Evaluation de la stabilité protéique	34
4. Evaluation du potentiel immunomodulateur 'test de clairance de carbone'	35
4.1. Mesure de l'indice phagocytaire <i>in vivo</i>	35
4.2. Protocole expérimental	36
5. Analyse statistique	37

Partie 2: Caractérisation lectine isolée à partir *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 et évaluation du leur potentiel antitumoral.

1. Collecte et identification moléculaire	38
2. Extraction et caractérisation de la lectine de <i>L. sulphureus</i>	39

2.1. Extraction et fractionnement des protéines totales	39
2.2. Chromatographie liquide protéique FPLC	40
2.3. Quantification des protéines et sucres totaux	40
2.4. Détermination de la spécificité saccharidique	41
2.5. Influence de la variation de température, pH, EDTA et cations sur la l'HA	41
2.6. Détermination du poids moléculaire	41
3. Etude protéomique	41
3.1. Préparation et la digestion enzymatique des bandes protéiques.....	41
3.2. Fragmentation LC-MS/MS MALDI-TOF/TOF à tandem.....	42
3.3. Traitement bioinformatique (Mascot peptide fingerprint research)	43
4. Evaluation du potentiel antiprolifératif de la lectine purifiée	43
4.1. Culture cellulaire.....	43
4.2. Principe du test de la viabilité cellulaire (MTT)	44
5. Analyse statistique.....	45

Résultats

Partie 1: Caractérisation d'une lectine du champignon *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et évaluation *in vivo* de leur potentiel immunomodulateur.

1. Purification de la lectine	46
2. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée	48
2.1. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et PAGE	48
2.2. Inhibition de l'activité hémagglutinante	48
3. Activité immunomodulatrice	52

Partie 2: Caractérisation lectine isolée à partir *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 et évaluation de leur potentiel antitumoral.

1. Caractérisation de la lectine (PSLec) de <i>L. sulphureus</i>	55
1.1. Purification de la lectine.....	55
1.2. Electrophorèse et MS-MALDI.....	55
1.3. Les propriétés biochimiques.....	58
2. L'analyse protéomique	61
3. Activité cytotoxique	64

Discussion

Partie 1: Caractérisation d'une lectine du champignon *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et évaluation in vivo de leur potentiel immunomodulateur.

1. Purification de la lectine LDL	65
2. SDS-PAGE et PAGE.....	67
3. Test d'HA et d'inhibition	67
4. L'influence de facteurs physico-chimiques sur la stabilité protéique	69
5. L'activité immunomodulatrice	72

Partie 2: Caractérisation lectine isolée à partir *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 et évaluation du leur potentiel antitumoral.

1. Caractérisation de la lectine de <i>L. sulphureus</i>	76
1.1. Purification de PSLeC	76
1.2. Détermination du poids moléculaire, MALDI- MS et la spécificité saccharidique	76
1.3. Stabilité de l'activité protéique.....	77
2. Etude protéomique.....	78
3. Activité cytotoxique	79

Conclusion et Perspectives..... 81

Références bibliographiques..... 83

Annexes

Résumé

Liste des communications réalisées durant l'étude doctorale:

1- Le 1^{er} Congrès International sur les biotechnologies au service du développement durable, 24 - 25 Octobre 2017, intitulé: Mise en évidence de l'activité agglutinante et purification partielle des lectines par la chromatographie sur le DEAE-Cellulose à partir du champignon *Lactarius deliciosus*.

ème

2- 3^{ème} Congrès International-Constantine de la société Africaine de Physiologie et de la Physiopathologie (Sa2P), 09, 10 et 11 Avril 2018, intitulé: Étude de l'effet à moyen terme de la thérapie nutritionnelle par une algue marine *Enteromorpha compressa* sur l'obésité chez des rats Wistar blancs.

3- Séminaire International Environnement et Toxicologie (SINENTOX 2019). Constantine, 18 - 19 Février 2019, intitulé: Extraction et purification des lectines du champignon basidiomycète de genre : *Lactarius* pour l'usage dans le domaine biothérapie.

4- Séminaire International Environnement et Toxicologie (SINENTOX 2019). Constantine, 18 - 19 Février 2019, intitulé : effet neuroprotecteur et antidépresseur de la fluoxétine contre la neuro-inflammation induite par les lipopolysaccharides chez les rats.

Introduction

Introduction

Les protéines sont des biomolécules très répandues dans les domaines médicaux-biologiques grâce à leurs structures et leurs propriétés. Elles interviennent dans plusieurs voies métaboliques importantes des cellules vivantes. Actuellement, le diagnostic médical de certaines pathologies repose sur deux fonctions protéiques :

L'adhésion cellulaire est la fonction principale de ces macromolécules. Elle dépend de la structure 3D et le type de protéines. Par exemple les intégrines, les cadhérines, N-CAM, V-CAM et les sélectines.

La force de leurs interactions avec les cellules et les matrices extracellulaires nécessite le type et le degré de la glycosylation chez les protéines membranaires et lipides. Plusieurs microorganismes exercent leurs effets pathologiques en se basant sur le mécanisme de l'adhésion cellulaire, car ils produisent des molécules comme les toxines (les lectines et des adhésines) ayant une capacité de reconnaître et de lier spécifiquement avec les glycoprotéines ou les sucres portés sur les récepteurs des cellules hôtes.

La reconnaissance et la liaison spécifique aux glucides situés dans la membrane plasmique des cellules sont considérées comme étant un modèle moléculaire important dans l'étude de la glycosylation des surfaces cellulaires et la détection des anomalies dans les cellules lors du changement de type de glucides portés sur les glycoprotéines membranaires chez les cellules cancéreuses ou malignes, les cellules infectées par les microbes (bactéries, virus, mycètes).

Les mécanismes de l'adhésion et la reconnaissance cellulaire dépendent du type de la glycosylation ou plus spécifiquement du type de glucides et de leurs degrés de complexités portés sur les glycoprotéines ou les glycolipides. Après la biosynthèse des protéines au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et la maturation dans l'appareil de Golgi, où elles ont été modifiées au niveau de la chaîne polypeptidique pour devenir matures, ces modifications post-traductionnelles donnent des protéines fonctionnelles. Elles sont principalement : la phosphorylation, la biotinylation, l'acylation, la sulfatation, et la glycosylation qui est une des modifications les plus essentielles dans la synthèse des glycoprotéines et glycolipides membranaires (Freeze H.H., et Elbein A.D., 2009).

La détermination du code porté par les sucres ou oligosaccharides couplés dans les glycoprotéines membranaires est l'un des objectifs les plus importants dans le diagnostic, le traitement et la détection des pathologies à cause de l'apparition de certaines anomalies de la glycosylation qui peut créer des dysfonctionnements cellulaires et des maladies graves telles que le cancer, les infections, les maladies auto-immunes et les inflammations.

Actuellement, les recherches biomédicales étudient l'utilisation des biomolécules d'origines protéiques ayant des propriétés intéressantes dans la lecture du langage saccharidique, qui peuvent ouvrir la porte dans le traitement de ces problèmes. Ces biomolécules exercent des effets bénéfiques et néfastes, ce sont les lectines (ou agglutinines).

Elles sont définies comme étant des protéines d'origine non-immune ubiquitaires et ayant la capacité de se lier spécifiquement et réversiblement aux sucres et aux glycoconjugués sans induire une modification catalytique sur leurs ligands comme dans le cas des enzymes (Lam S.K., et Ng T.B., 2011).

Le développement de techniques d'analyse biologique comme la chromatographie d'affinité et la cristallographie, les techniques de séquençage, la prédiction de la structure protéique, les analyses bioinformatiques de similarité des séquences polypeptidiques montrent qu'un grand nombre de lectines exerce plusieurs fonctions grâce à «leurs structures tridimensionnelles et à leur affinité aux glycanes», notamment la détection des cellules cancéreuses, la reconnaissance, l'adhésion cellulaire avec les virus, les micro-organismes pathogènes, les cellules sanguines et participent aussi dans la signalisation intracellulaire (Hassan M.A.A., *et al*, 2015).

Les recherches et travaux sur la purification des lectines d'origine fongiques essentiellement chez les champignons macroscopiques précisément les basidiomycètes et l'évaluation de leurs potentiels biologiques montrent qu'elles possèdent des effets bénéfiques dans l'inhibition de la prolifération des cancers, et la lutte contre les virus dont le VIH et le virus influenza (Hassan M.A.A., *et al*, 2015).

L'absence des études approfondies sur la flore fongique algérienne et l'exploitation des champignons dans la médecine populaire, et le régime alimentaire nous offrent une opportunité de choisir ce sujet à cause de leur importance afin d'exploiter la richesse de notre flore. Toute fois, des problèmes sur les lectines sont apparus : Comment choisissent-elles ces cibles membranaires et par quels mécanismes induisent-elles ces effets biologiques?

Comment pouvons-nous utiliser ces protéines pour des applications médicales et agroalimentaires ?

A partir de ces observations, plusieurs objectifs ont été tracés pour réaliser ce travail scientifique :

- Extraction et purification des lectines à partir des espèces choisies
- Détermination des caractéristiques biochimiques des lectines purifiées : la structure, le poids moléculaire, l'affinité, la spécificité et les propriétés physico-chimiques (pH, T °C et résistance au stress salin).
- Evaluation de leurs potentiels biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Revue bibliographique

1. Les lectines

1.1. Découverte et définition

La toxicité de certaines graines de plantes et légumes a été connue depuis longtemps, mais leur cause n'a pas été déterminée, au cours du 19^{ème} siècle. Les généticiens ont considéré que la toxicité est liée aux toxines bactériennes du sol vivant avec les graines. Warden et Weddell (1884), ont refusé cette considération, car ils ont découvert des molécules dans l'extrait aqueux des graines d'*Abrus precatorius*. L qui se précipitent dans l'alcool.

Après certaines années, le chercheur Dixson a obtenu des extraits extrêmement concentrés et toxiques des graines du castor: *Castor commun* et du ricin: *Ricinus communis* (Himansha S. et Sarathi S.P., 2012).

Se basant ces résultats, Hermann Stillmark en 1888 a découvert une molécule qui agglutine les érythrocytes dans l'extrait toxique des graines du ricin, puis il l'a caractérisée comme étant de nature protéique dénommée la Ricine. Il a donné le terme " phytoagglutinines " à toutes protéines induisant l'agglutination. Cette démarche scientifique est l'initiation d'évolution des sciences immunologiques et glycobiologiques (Peumans W.J., et Van Damme E.J., 1995).

En 1897, Elfstrand donna le nom phytoagglutinines ou hémagglutinines et agglutinines aux protéines ayant une activité agglutinante. Boyd et Reguera (1949) ont découvert des hémagglutinines dans l'extrait d'haricot, qui agglutinent préférentiellement les érythrocytes humaines du groupe A. Ils ont montré que cet effet repose sur des spécificités sérologiques.

En 1954, Boyd et Shapleigh ont désigné le terme lectines à ces macromolécules protéiques, qui provient du verbe latin: «legere » qui signifie: sélectionner ou choisir. Par contre, certains immunologistes n'ont pas accepté la dénomination lectine à ces protéines à cause de leur origine végétale et l'existence des autres molécules agglutinantes chez les autres types cellulaires.

Le généticien Goldstein a proposé une définition scientifique basée sur les propriétés biochimiques des lectines (la spécificité cellulaire, le mécanisme d'agglutination, la spécificité et l'affinité aux ligands). Il les a définies comme étant des protéines ou glycoprotéines d'origine non-immune, qu'elles se lient aux sucres ou précipitent les

glycoconjugués fixées ou solubles, et agglutinent les cellules sans entraîner une modification catalytique sur les ligands (Slifkin M. et Doyle R.J., 1994).

1.2. Biochimie des lectines

La biochimie structurale des lectines montre qu'elles contiennent un ou deux domaines peptidiques portant le site de reconnaissance et d'interaction spécifique avec les mono ou oligosaccharides. Ce domaine est s'appelé domaine de reconnaissance saccharidique (CDR). Il peut lire l'information codée par les sucres (libres ou liées aux lipides ou protéines cytoplasmiques et membranaires) (Hans J.G., *et al.*, 2011; André S., *et al.*, 2015).

L'interaction s'effectue entre les résidus d'acides aminés situés sur la chaîne peptidique du CDR et sa spécificité dépend de l'affinité saccharidique et du type de la liaison. Les études structurales des lectines ont montré qu'elles ne possèdent pas une similitude structurale primaire, à cause de l'évolution de leurs gènes (Gorelik E., *et al.*, 2001).

1.2.1. Structure biochimique

En général, leurs structures biochimiques varient en fonction de la polymérisation et le repliement de la chaîne polypeptidique. Selon Sharon N. et Lis H., (1998), il existe trois catégories structurales de lectines.

1.2.1.1. Lectines de structure simple

- De topologie spatiale formée de plusieurs monomères, ayant un PM inférieur à 40 KDa et ne sont pas totalement identiques. Les sous-unités (S/U) contiennent un site pour fixer un ou deux cations métalliques intervenant dans l'adaptation de la conformation pour la liaison avec le sucre (figure 1).
- Elles regroupent les lectines végétales (les légumineuses), bactériennes et certaines galectines (Galec).

1.2.1.2. Lectines de structure mosaïque

- Issues d'association de plusieurs domaines ou modules structuraux d'hélices α et de feuillets β . L'un de ces domaines contient un seul CDR (figure 2).
- Elles regroupent un ensemble de diverses agglutinines : les hémagglutinines virales et les lectines animales de type: calcium-dépendant-lectins (type C), mannose-6-phosphate-binding-proteins (type P), Immunoglobulin like-lectins (Ig-like-lectins).

1.2.1.3. Lectines de structure complexe

- Résultantes de l'assemblage et la condensation des chaînes polypeptidiques, elles se sont présentées fréquemment chez les bactéries au niveau de la paroi, et elles forment des structures filamenteuses de diamètre 3-7 nm et jusqu'à 100 nm de longueur (figure 3).
- Elles se sont appelées les fimbriaes ou pili et jouent un rôle structurale, possèdent une S/U contenant d'un CDR.

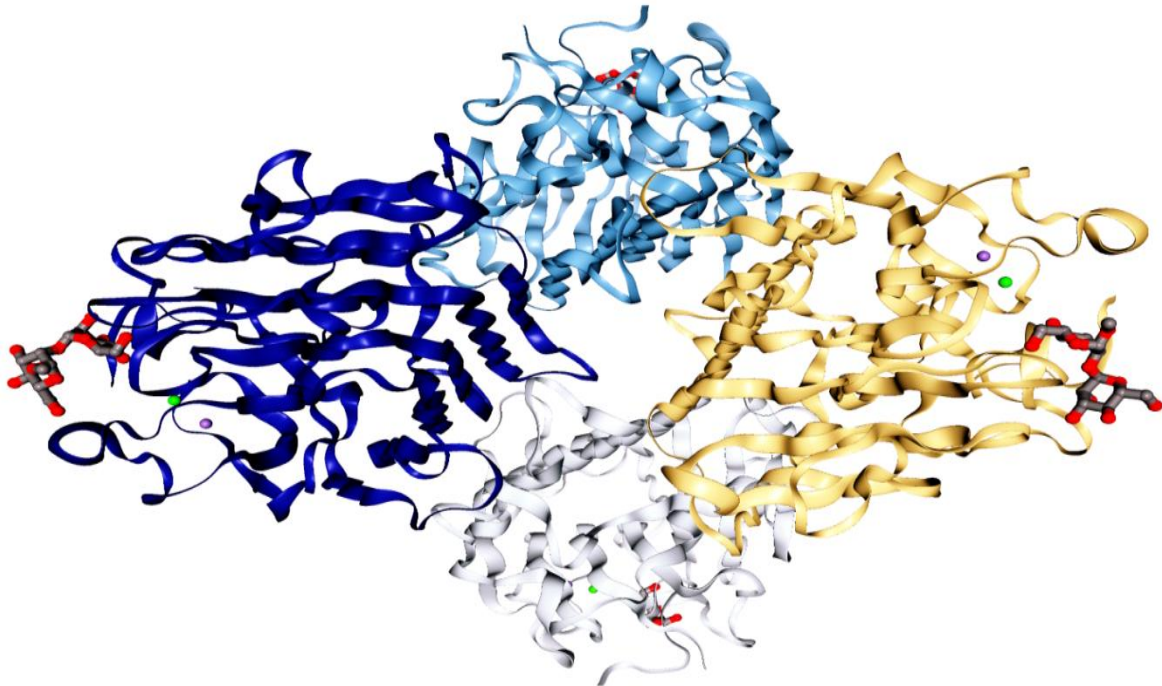


Figure 1: Structure tridimensionnelle de la concavalline A. Une lectine d'origine légumineuse de *Canavalia ensiformis*. Possède une structure simple qui comprend quatre S/U symétriques. Chaque monomère, comporte un site CDR spécifique du mannose ou du glucose et un site pour la fixation des oligoéléments manganèse et calcium (source PDB: 1BXH, Moothoo D.N., *et al.*, 1999).

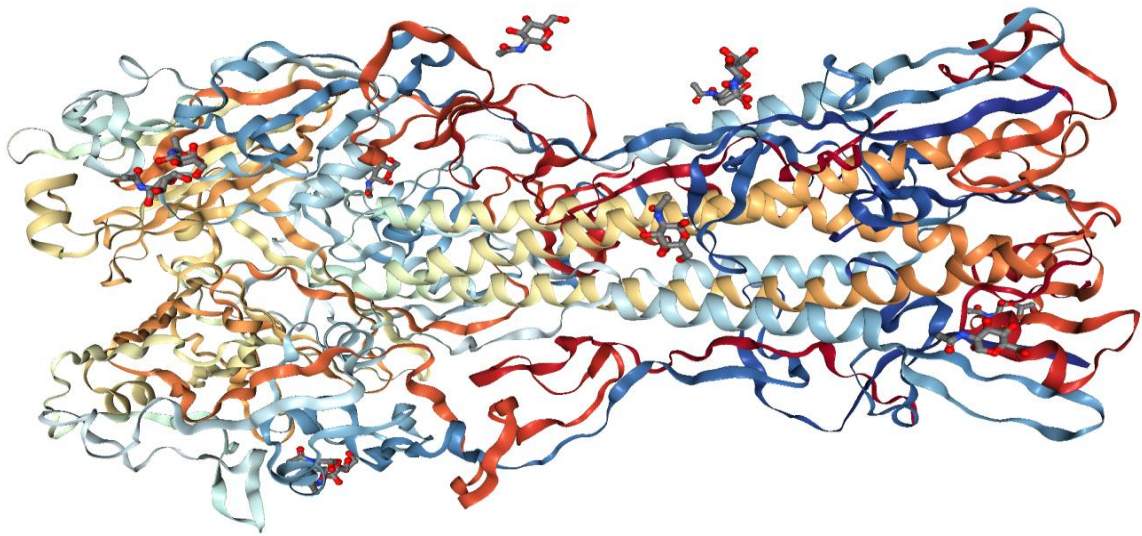


Figure 2: Structure mosaïque d'une lectine virale (H1 hémagglutinine du virus A d'influenza): Contient de nombreux domaines α et β et des CDR pour le 2-(Acétylamino)-2-déoxy- α -D-glucopyranose et N-acétyl-D-glucosamine (source PDB: 1RUZ, Skehel J.J., *et al.*, 2004).

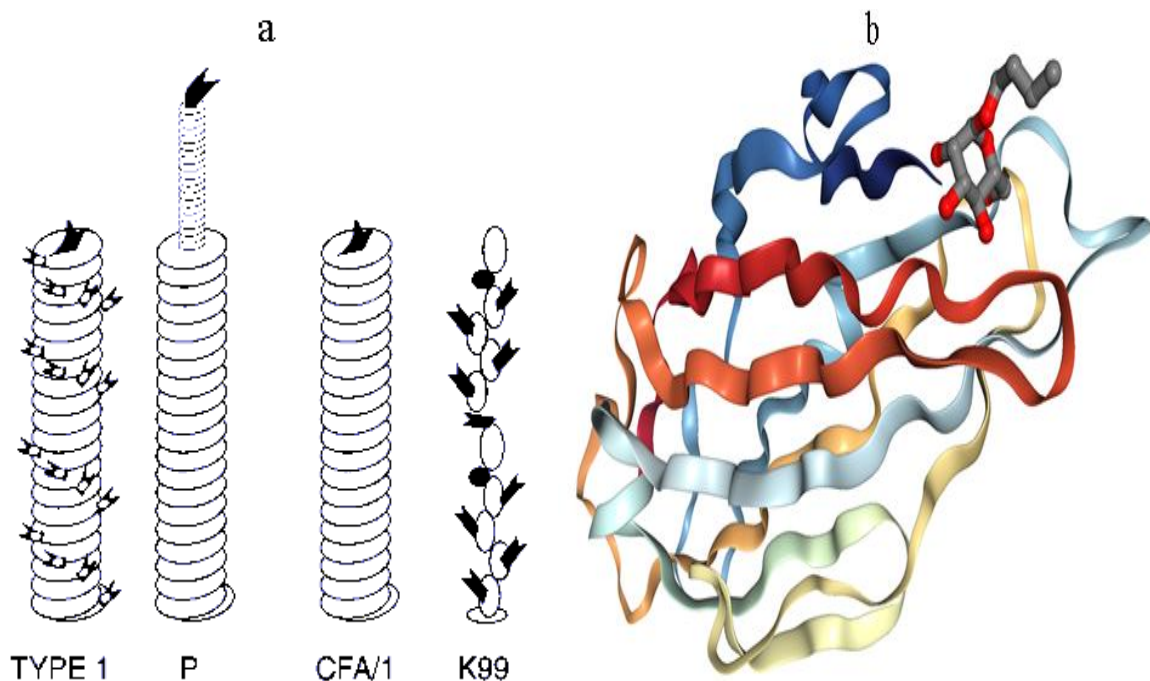


Figure 3: Représente la structure des lectines en complexe moléculaire : **a-** schéma de différents types de fimbriae chez *E. coli* (Sharon N. et Lis H., 1998), **b-** la structure tridimensionnelle d'une S/U de la lectine FimH chez *E. coli* uropathogène responsable de l'infection urinaire et une spécificité pour le mannose (représenté en bâtons épais) (source PDB: 1tr7, Bouckaert J., *et al.*, 2004).

1.2.2. Site de reconnaissance

Les lectines reconnaissent et interagissent avec les sucres par les aa du CDR qui se représente sous la forme d'un creux ou d'une dépression à la surface de la protéine, contrairement à celles qui sont spécifiques aux oligosaccharides. Ce domaine s'expose à l'intérieur ; ce qui permet de créer une forte complémentarité avec le ligand (Sharon N. et Lis H., 1993).

Généralement une ou deux extrémités du sucre peuvent se lier avec les aa du CDR. La conformation de cette région ne change que légèrement après l'interaction. Les sites au sein d'une famille de lectine sont similaires, mais tout à fait différents dans les différentes familles, même si la spécificité est la même, l'interaction est maintenue par des liaisons chimiques comme chez les autres interactions protéines-ligands.

Les liaisons hydrogènes H assurent la stabilité d'interaction et sont fortement impliquées dans l'attribution de la spécificité d'interaction, et l'augmentation de l'affinité. Elles ont lieu entre les chaînes latérales des résidus chargés comme l'acide aspartique D, l'acide glutamique E, l'asparagine N et la glutamine Q par leurs atomes d'oxygène du groupement carboxylique avec les groupements hydroxyles des sucres, le cas des Galec (figure 4).

Parfois les groupements hydroxyles dans les chaînes latérales des autres résidus (aa alcools) et les groupements NH et CO de la chaîne principale de la protéine participent aussi dans la création des liaisons hydrogènes.

Le groupement OH du sucre joue un rôle d'un donneur ou récepteur de proton (H^+), dans le cas donneur d'hydrogène l'OH possède l'avantage de libre rotation sur l'axe C-OH ce qui permet de créer une liaison linéaire avec l'accepteur, cela renforce la spécificité lorsque deux groupements OH voisins du sucre interagissent avec différentes atomes du même résidu, par exemple les deux atomes oxygènes du carboxyle d'ac aspartique ou ac glutamique.

Les forces de Van Der Waals interviennent également dans le complexe lectine-sucre et l'interaction par l'hydrophobicité (*stacking interaction*) est due à la position spéciale des groupements OH des sucres (molécules de forte polarité permettent de créer des zones hydrophobes), pouvant donner la possibilité d'interagir avec les aa aromatiques, observés beaucoup plus chez les lectines des légumineuses, les Galec et certaines lectines de type C (Sharon N. et Lis H., 1993).

Le cas de la lectine de l'*Erythrina corallodendron* «EcorL», l'interaction avec le Gal est assurée par des liaisons H entre les groupements OH avec D89, A218 et N133 successivement. Les interactions hydrophobes sont créées avec la tyrosine Y108 et le tryptophane W135 (figure 5).

Les ions cationiques maintiennent aussi la stabilité de l'interaction, c'est le cas des lectines de type C (figure 6) qui possèdent un site de fixation du Ca^{2+} qui participe directement dans la liaison de coordination avec les groupements hydroxyles OH en position 3 et 4 du Man ou 2 et 3 chez le Fuc.

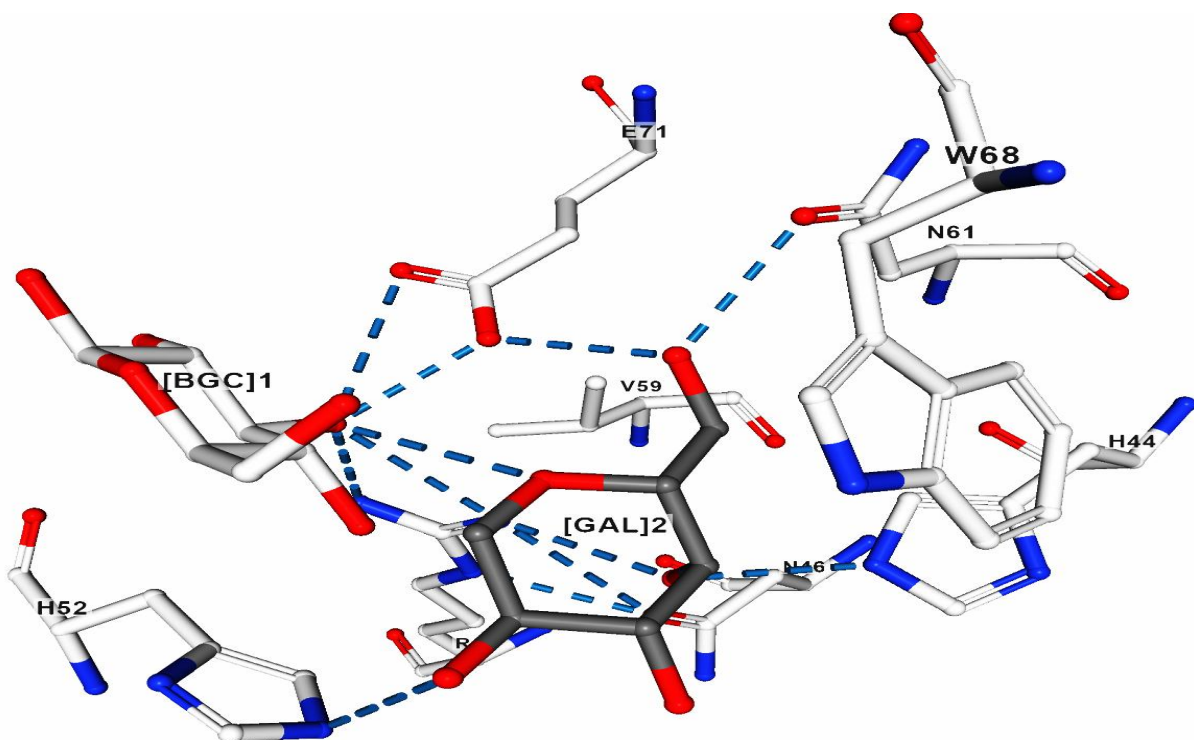


Figure 4: L'interaction entre le galactose ([GAL]2) et la galectine humaine 'galectin 1' par des liaisons hydrogènes entre groupements hydroxyles en position 6 du sucre avec les chaînes latérales des acides aminés respectivement: l'asparagine (N61) et le glutamate (E71) ; le Gal est représenté par des bâtons épais, les aa par des bâtons fins, les liaisons hydrogènes par des pointillés bleus (source PDB: 1GZW, Lopez-Lucendo M.I.F., *et al.*, 2004).

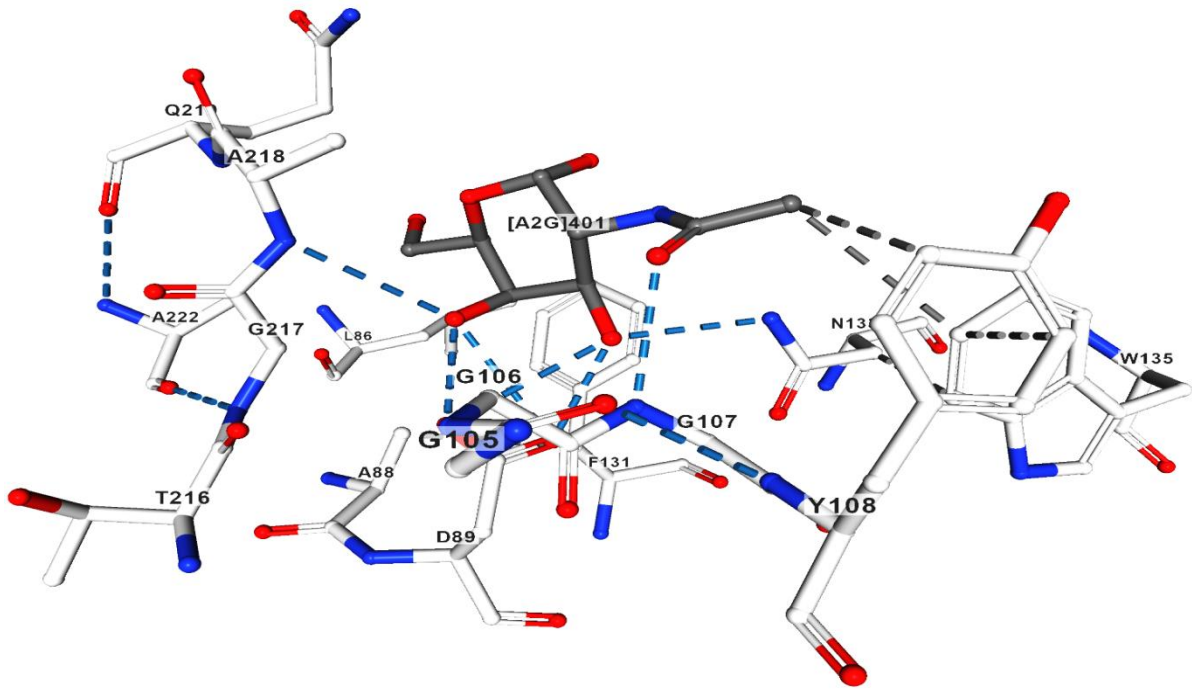


Figure 5: L'interaction entre les aa du CDR de lectine de «EcorL» avec la N-acétylgalactosamine (A2G [401]). Les liaisons H-H sont représentées par des pointillés bleus et les interactions hydrophobes avec des pointillés griss (source PDB: 3N35, Thamotharan S., *et al.*, 2011).

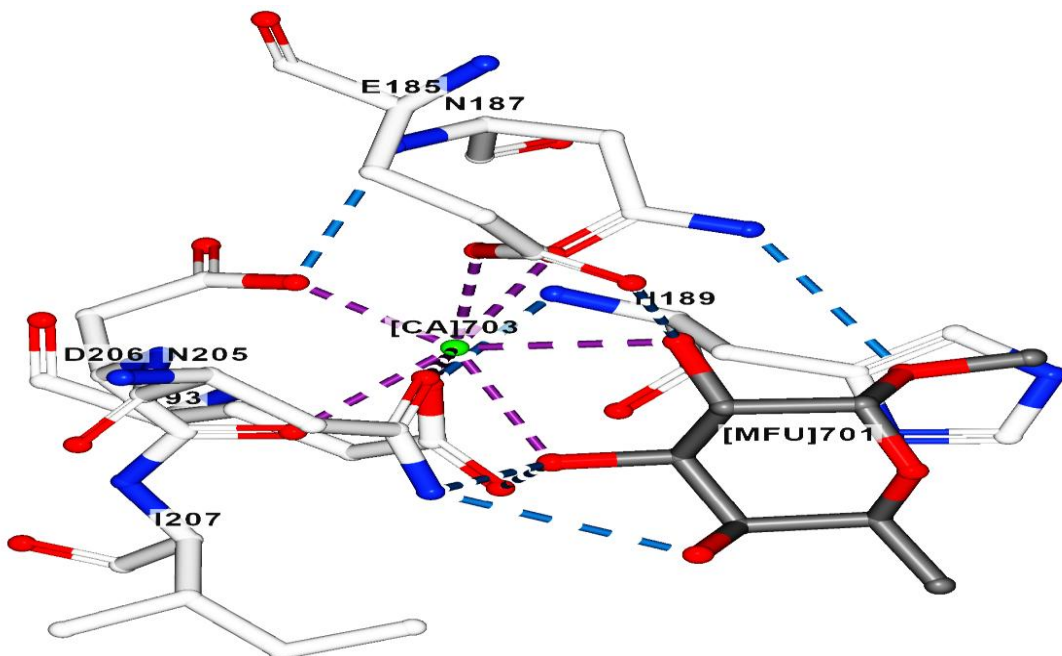


Figure 6: L'interaction entre mannose et protéine A du rat (*Rattus norvegicus*) lectine de type C et méthyl- α -L-fucose (Met-Fuc) par des liaisons hydrogènes (pointillés bleues) et des liaisons de coordination 'ionique' (pointillés violetes) ont été assurées par le calcium (CA703 avec les groupements hydroxyle du sucre (source PDB: 1KWW, Ng K.K., *et al.*, 2002).

1.2.3. Spécificité et affinité saccharidique

Elle se base sur l'interaction Ag-Ac à cause de la disposition de ces sucres sur les épitopes des récepteurs membranaires des cellules, bien que les lectines interagissent spécifiquement avec les monosaccharides, mais à une plus faible affinité pour eux par rapport aux oligosaccharides ; cela est due à la présence d'une concentration élevée de ces sucres dans les chaînes oligosaccharidiques ou polysaccharidiques, où la constante d'association K_a pour les monosaccharides est de l'ordre du millimolaire (mM), contrairement aux oligosaccharides qui est en micromolaire (μM).

Sharon N. et Lis H. (1998) les classent en cinq groupes en fonction de leurs affinités pour les monosaccharides pour les quels la lectine possède une spécificité et une affinité élevées: Man, GlcNAc, Gal/GalNAc, le Fuc, et l'acide sialique (Ac Si/NANA) de la série D à l'exception du Fuc de la série L qui sont présents au niveau de la membrane de la cellule eucaryote (figure 7).

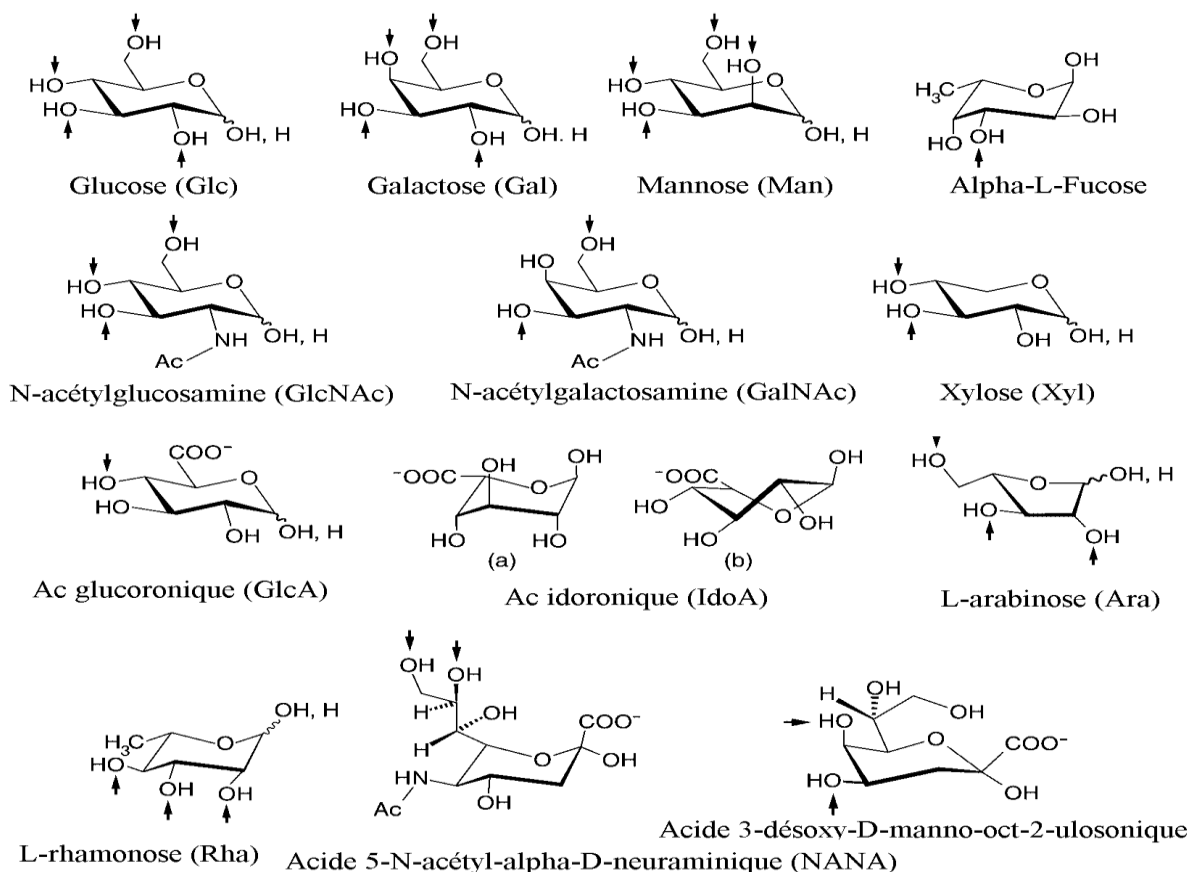


Figure 7: Les principaux sucres intervenant dans la glycosylation des protéines et lipides membranaires, la flèche indique le groupement qui permet de former une liaison hydrogène (le site de glycoconjugaison) et qu'ils sont détectés par les lectines (Gabijs H.J., *et al.*, 2009).

1.2.4. Multivalence

Les lectines sont des protéines multivalentes grâce à leurs structures biochimiques (la présence de plusieurs CDR). Bien qu'un monomère (ou un dimère ou un trimère) puisse s'attacher avec un monosaccharide avec une faible affinité, la présence de plusieurs CDR pour le même ligand joue un rôle important dans le renforcement de l'interaction.

La multivalence peut provenir de la répétition en tandem du CDR dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou à l'exposition de plusieurs lectines sur la membrane cellulaire (Van Kooyk Y. et Rabinovich G.A., 2008).

Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multivalentes plutôt qu'une seule interaction forte. Elles peuvent également assurer une haute spécificité et affinité entre ces récepteurs et les surfaces cellulaires (Lee R.T. et Lee Y.C., 1995).

2. Applications thérapeutiques et biologiques des lectines

Il existe de plusieurs applications des lectines dont les intérêts thérapeutiques ne sont pas négligeables: l'usage dans le greffage de la moelle osseuse, le diagnostic médical de la glycémie, le traitement antiviral (VIH et Influenza H2N1), et des applications nutritionnelles (anti-obésité pour le cas de la lectine de *Pleurotus ostreatus*) (Kawagishi H., *et al.*, 2000 ; Necib Y., *et al.*, 2014).

2.1. Agglutination et groupage sanguin

Lorsque une lectine possède deux ou plusieurs CDR, elle interagit spécifiquement avec les cellules sanguines par des ligands membranaires ; ce qui initie leur agglutination et leur précipitation. C'est une méthode de détection des lectines, en utilisant les hématies des animaux et en déterminant leurs spécificités par inhibition d'HA avec les sucres. Elle dépend de la structure, le nombre CDR et la taille moléculaire (Sharon N. et Lis H., 1998 ; Santos A.F.S., *et al.*, 2015).

Dans le groupage sanguin (système ABO ou ABH), les antigènes sont divers sucres (tableau 1) ou des protéines attachés aux diverses composantes de la membrane érythrocytaire différenciés par des résidus saccharidique terminaux spécifiques de la chaîne commune d'oligosaccharide. La typologie du système ABO sera possible et facile grâce à la spécificité

saccharidique des lectines (qui peuvent aussi utilisées dans la détermination des autres types cellulaires et la taxonomie de certains microorganismes).

Elles peuvent également être utilisées dans le traitement des syndromes de polyagglutination provoqués par les sialidases lors de certaines pathologies comme les maladies cancéreuses, les maladies héréditaires, et les infections bactériennes ou virales. Ces enzymes hydrolysent l'Ac Si qui couvre l'antigène du Thomson Friedrich (Anti-T), le Tumor-associated-antigens (Anti-Tn) et Anti A+N qui sont des antigènes naturels fortement exprimés sur la membrane érythrocytaire dans ces circonstances pathologiques (Sharon N. et Lis H., 2003).

Tableau 1: Quelques lectines utilisées dans le groupage sanguin (Sharon N. et Lis H., 2003).

Lectine	Affinité	Spécificité	espèces
LBL	GalNAc, α -D-GalNAc-(1→3), (α -L-Fuc-[1→2])-D-Gal.	Anti-A (A)	<i>Phaseolus limensis</i>
HPA	α -GalNAc, Muc		<i>Helix pomatia</i>
MOA	Gal1,3Gal, Gal1,3Gal1,4GlcNAc	Anti-B (B)	<i>Marasmius oreades</i>
PPA	Résidu α -D-Gal terminale		<i>Ptita plumosa</i>
AAA	Anti-H type 1: (Fuc α 1-2 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ; l'antigène de Lewis : (Gal β 1-3[Fuc α 14] GlcNAc β 1-3Gal β 1- 4Glc)	Anti-A+B (O)	<i>Anguilla anguilla</i>
PNA	Gal	Anti-T	<i>Arachis hypogaea</i>
MLL	GalNAc	Anti- A+N (A ^{MM} et O ^{NN})	<i>Moluccella laevis</i>
SSL	GalNAc α -O-Ser/Thr	Anti-Tn	<i>Salvia sclarea</i>

2.2. Applications immunologiques

Plusieurs lectines testées *in vitro* sur les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, neutrophiles) ont induit leurs stimulations et leurs recrutements via l'interaction avec ses glycanes membranaires. Elles peuvent activer une réponse immunitaire indirecte via la signalisation intracellulaire par des messagers secondaires après interaction avec les épitopes glycosylés des récepteurs spécifiques des cellules immunitaires.

Dans le cas d'un déficit immunitaire comme la mitogénèse et la prolifération lymphocytaire (Van Kooyk Y. et Rabinovich G.A., 2008), elles peuvent être utilisées comme stimulateurs de la division cellulaire, par exemple la lectine de graines d'*Artocarpus lingnanensis* qui stimule la prolifération des LT via la voie de la tyrosine kinase/phosphorylase like receptor CD45 (Cui B., *et al.*, 2017).

2.3. Traitement et diagnostic du cancer

La prolifération cancéreuse nécessite un apport alimentaire ou énergétique très élevé pour diffuser dans la totalité du corps animal ou humain, qui provient de la dégradation des sucres, des lipides, et des protéines. Les agglutinines inhibent la croissance et provoquent la mort des cellules malignes par plusieurs mécanismes tels que l'autophagie et l'apoptose.

Elles induisent l'apoptose ou *Program of Cell Death*, après leurs interactions avec les glycanes de ces cellules, elles déclenchent une série de signalisation conduisant à l'activation de la voie de caspase 8 et caspase 3 et interagissent avec le récepteur membranaire de la mort cellulaire «FasR» (Lichtenstein R.G. et Rabinovich G.A., 2013).

Grâce à la forte expression des glycoprotéines (tableau 2) à la membrane des cellules cancéreuses et à la forte affinité d'interaction comparée avec celles des cellules normales, on peut utiliser les lectines dans des kits médicaux de détection du cancer (Dan X., *et al.*, 2015).

Tableau 2: Certaines glycanes du cancer détectés par les lectines (Guillot J., *et al.*, 2004).

Antigène	Séquence glycannique
Le ^x	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal- α1-3 Fuc
Le ^y	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal α1-3 Fuc
N-acétyllactosamine	Galβ1-4GlcNAc
Séquence b 1-6-branchée	GlcNAcβ1-6Manα1-6Manβ- (oligosaccharides N-liés)
Sialyl- Le ^x	SAα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal- α1-3 Fuc
Sialyl-Lea	SAα1-3Galb1-3GlcNAcb1-3Gal- α1-4 Fuc
Sialyl-Tn	SAα2-6GalNAcα-Ser/Thr
T	Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr
Tn	GalNAcα-Ser/Thr

SA: acide sialique.

1. Les lectines des basidiomycètes

Les champignons contiennent une teneur plus élevée en lectines que les plantes. Ces lectines ont été isolées depuis différentes parties du champignon : le mycélium, le stipe ou le pied, les basides, les spores et le fruit. Elles ont été initialement purifiées à partir de fruits des champignons comestibles d'*Agaricus campestris* et d'*Agaricus bisporus* (Goldstein I.I. et Poretz R.D., 1986) ; d'autres ont été isolées depuis des champignons toxiques voire mortels: *Amanita phalloides*, *A. subjunquillea*, *A. pseudoporphyri*, et *Botrytis Cinerea* (Santhiya M. et Jansi M., 2013).

Certaines lectines purifiées du mycélium lors de la culture à partir de différentes parties de champignons peuvent être similaires dans la structure et l'affinité ; le cas de *Lactarius deliciosus* et *L. deterrimus* (Guillot J., *et al.*, 1991; Guillot J. et Konsa G., 1997), et dans autres cas elles peuvent être différentes : *Pholiota squarrosa* et *Agrocybe aegerita*. (Ticha M., *et al.*, 1985).

Certaines exercent une activité hémolytique avec l'HA. Cette hémolyse pourra être le responsable de l'intoxication ou de la mortalité. Grâce à cette fonction, la lectine joue un rôle dans la défense contre les prédateurs des champignons. Parmi les hémolysines, on distingue : la lectine de l'*Amanita phalloides* ou Phallin et la lectine de polypores soufré (*Laetiporus sulphureus* lectin, PSL).

Actuellement, elles sont utilisées dans des applications thérapeutiques, notamment en oncologie, en diagnostic des infections, dans l'inhibition de la transcriptase reverse de VIH, dans la caractérisation des glycoconjugués cellulaires (Hassan M.A.A., *et al.*, 2015).

2. Caractéristiques des lectines des basidiomycètes

Elles possèdent un poids moléculaire qui varie de 13 à 190 KDa (tableau 3) et constituent une ou plusieurs S/U identiques ou non. Elles sont reliées par des ponts disulfures comme chez la lectine de *Lactarius lignyotus* et *Phallus impudicus*. D'autres lectines présentent une structure protéique résultant d'association de tri, de tétra ou de polymères par des liaisons non covalentes comme celles de *Lactarius deliciosus*, *L. deterrimus*, *L. Salmonicolor*, *Pholiota aurivella*, *Pleurotus cornucopiae* et *Xerocomus chrysenteron*.

Tableau 3: Certains caractères biochimiques de quelques lectines de basidiomycètes (Hassan M.A.A., *et al.*, 2015 ; Singh S.S., *et al.*, 2015).

Lectine	Espèce	Structure	PM (kDa)	Sucre (%)	Affinité
APL	<i>Auricularia polytricha</i>	Monomère	23	3,5	Gal et Lac
CML	<i>Cordyceps militaris</i>		31	-	Glycoprotéines à Ac. Si
AAL	<i>Agrocybe aegerita</i>	Dimère	15,8	-	la glycophorine A, κ -caséine, la PSM, les β -galactosides, GlcNAc et Lac-BSM
ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>		31,5	-	l'inuline et lactose, les trisaccharides riches en NeuAc- α 2, 3Gal β -(Ac S), les β -galactosides
ABA IV	<i>Agaricus bisporus</i>	Trimère	64	7,7	β Gal, GalNAc
CNL	<i>Clitocybe nebularis</i>		70	2,6	Lac, GalNAc
HRL	<i>Hygrophorus russula</i>	Tétramère	74	-	Glc α 1-6Glc, α 1-6 Mannobiose isomaltose
MAL	<i>Mycocleptodonoides aitchisonii</i>		64	-	Asialo-BSM, BSM
LRL	<i>Lactarius rufus</i>	Hexamère	98	-	4-nitrophenyl- β -D-glucosamine, la thyroglobuline humaine et bovine.
GLL	<i>Ganoderma lucidum</i>		114	-	Les glycanes N et O

3. Rôles des lectines dans le cycle de vie des champignons

Les lectines ont des fonctions essentielles dans la vie des basidiomycètes, précisément dans les différents stades de croissance. Lors de la phase de mycorhization, elles interviennent dans différentes circonstances ; par exemple: la croissance, l'explosion des sporomes et la dégradation ou la dépolymérisation des produits stockés (polysaccharides, protéines de réserve), le transport et le stockage des sucres et des protéines, ainsi que l'activation des voies métaboliques (l'induction enzymatique) via leurs parties glycolysées (Guillot J. et Konsa G., 1997).

L'espèce *Pleurotus cornucorpiæ* produit une lectine dont la concentration augmente progressivement depuis la mycorhization jusqu'à la fructification. Elle peut être impliquée dans la cohésion des hyphes durant la phase de développement du carpophore (Kaneko T. *et al.*, 1993 ; Oguri S., *et al.*, 1996). En outre, la concentration des lectines dans la sporomes varie avec le temps de la moisson. Elle pourrait être liée à la levée de dormance du mycélium comme chez les lectines végétales.

Les lectines fongiques pourraient intervenir dans les activités de reconnaissance spécifique entre l'arbre et leur symbiote ectomycorhiziens, notamment dans les réactions symbiotiques, dans le parasitisme, et au niveau du maintien de la croissance depuis le mycélium jusqu'à la fructification (Kobayashi Y. et Kawagishi H., 2014).

4. Classification des lectines fongiques

Les séquences peptidiques des milliers de lectines et leurs structures tridimensionnelles sont déterminées et attribuées dans des bases de données spécifiques: UniLectin interactive lectin database (<https://www.unilectin.eu>), Lectin Frontier DataBase (<https://acgg.asia/lfdb2/>) et 3D Lectin Database (<http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/search.php?type=lectin>). Une classification en 48 familles a été proposée pour les différencier selon la similitude structurale et l'évolution de leurs gènes (Fujimoto Z., *et al.*, 2014).

Les lectines fongiques sont classées en galectines, les lectines de type Ricin B domain like (R type), les lectines de type Jacalin et monocote-like comme les lectines animales et végétales, d'autres n'entrent pas dans cette classification à cause de l'absence de similarité

structurale de la séquence peptidique avec les autres familles. Kobayashi Y. et Kawagishi H. (2014) ont proposé une classification en 4 familles:

4.1. Les lectines fongiques des familles des Galectine, Ricin-like type, Jacalin et Monocot related

La classification des lectines fongiques n'est pas bien claire comme dans le cas des lectines végétales et animales. En général, les séquences en aa sont utilisées afin de déterminer les relations évolutives et d'attribuer la réactivité de ces molécules. Cependant, il n'y a pas de lectines fongiques classées avec celles animales ou végétales dans la même famille. Par exemple, les lectines d'*A. aegerita* (AAA et ACG) sont classées comme galectines grâce à la présence d'un ou plusieurs domaines structuraux et une spécificité pour les β galactosides et les Lac/LacNAc. D'autre part, les lectines purifiées de *Pleurocybella porrigens* (PPL), *Polyporus squamosus* (PSL) et *Marasmius oreades* (MOA) sont classées dans la famille Ricin like-type. Les autres lectines ayant une affinité pour le Gal et ces dérivés ne sont pas incluses dans cette famille car elles n'ont pas de structure bien définie et l'absence d'une homologie avec les séquences appartenant à ces familles.

Les lectines semblables de la famille Jacalin-related comme HRL et GFL possèdent un CDR spécifique pour le Man et mucine de stroma porcine (PSM) respectivement. La deuxième lectine MOL de *Marasmius oreades* spécifique pour le Man appartient à la famille monocot related lectin.

4.2. La famille des lectines type ABL- Like (Fungal Fruiting Bodies)

Elle comporte les lectines de structure biochimique similaire à celle d'ABL. Elle constitue un hétérotétramère dont l'organisation de chaque monomère de forme α/β sandwich et un domaine de feuilles β connectés par un motif structural hélice-boucle-hélice. Il existe deux sites CDR distincts dans chaque monomère qui reconnaissent différentes configurations du groupement hydroxyle épimérique du sucre. Cette famille rassemble: *Xerocomus chrysenteron* lectin (XCL), *Sclerotium rolfisii* lectin (SRL), ABL et *Boletus edulis* Lec (BEL).

4.3. La famille des Fuc-lectines AAL-like

Généralement, elle regroupe les agglutinines de spécificité et d'affinité pour les glycanes fucosylés, ayant une similarité structurale avec celle de la lectine d'*Aleuria aurantia*. Elle se constitue d'un dimère dont chaque est organisé en hélice à six pales β et un petit feuillet antiparallèle aux deux brins β . Le pli de l'hélice β est important pour la reconnaissance du fucose, et les cinq sites de fixation se situent dans les pales d'hélice. Le petit feuillet β comprend la séquence responsable du repliement de la lectine. Elle regroupe celles des micromycètes AFL (autres souches fangiques, *Aspergillus fumigatus* lectin), AOL (autres souches fangiques, *Aspergillus oryzae*), et l'AAL.

4.4. La famille des *Pholiota squarrosa* like lectines (PhoSL)

Elle englobe certaines molécules d'origine fongique comme les lectines des Strophariaceae. Elle est caractérisée par la structure multimérique où les unités sont assemblées par des liens non-covalents comme chez *Pholiota squarrosa* qui produit une lectine de structure trimérique composée de 40 aa, spécifique pour la séquence saccharidique Fuc-1-6GlcNAc (Fuc-corps). Elle permet à la lectine une forte agglutination cellulaire et une précipitation des glycoconjugués similairement à l'interaction Ac-Ag. Cette lectine peut être un outil efficace dans l'étude des glycoconjugués et le diagnostic médical des changements anormaux des glycanes membranaires.

5. Activités biologiques des lectines des basidiomycètes

En plus de l'agglutination des cellules et la lutte contre les microorganismes, elles peuvent assurer d'autres fonctions biologiques:

5.1. Activité antitumorale

Les lectines isolées à partir des basidiomycètes possèdent un pouvoir anticancéreux très élevé par rapport à celles des plantes (tableau 4) et ce, grâce à leurs structures biochimiques et leurs effets toxiques. Les études montrent qu'elles ont intervenu dans la production des médicaments anticancéreux.

L'effet antitumoral a réduit à l'induction d'apoptose cellulaire par l'activation de voie enzymatique de caspase, ou le potentiel d'activer le système immunitaire (Lichtenstein R.G. et Rabinovich G.A., 2013).

L'évaluation du potentiel antitumoral de la lectine ABL *in vitro* a donné une inhibition avec une IC₅₀ de 50 µg/mL du cancer de colon humain HT-29 (Yu L., *et al.*, 1993 ; Wang H., *et al.*, 1998). La lectine de *Stropharia rugosoannulata* à un PM de 18 kDa et des IC₅₀ *in vitro* de 7 µM et 19 µM respectivement de la multiplication des cellules tumorales hépatique HepG2 et les cellules leucémiques lymphatiques L1210 (Zhang W., *et al.*, 2014).

Le champignon hallucinogène *Boletus speciosus* (BSH) produit une lectine de 31 KDa et inhibe les cellules cancéreuses du foie (hepatoma) HepG2 et les cellules leucémiques lymphatiques L1210 avec des IC₅₀ de 4,7µM et 7,0 µM respectivement (Sun J., *et al.*, 2014).

Tableau 4: Quelques lectines purifiées à partir des champignons ayant une activité antitumorale.

Lectine	IC ₅₀ / dose à effet	Cellules malignes	Référence
ABL	50 µg/mL 10µg	HT-29 CT26 cells	Ditamo Y., <i>et al.</i> , 2015
<i>Amanita phalloides</i> Lec	1,7 µg/mL	L1210	Lutsik-Kordovsky M.D., <i>et al.</i> , 2001
<i>Armillaria luteovirens</i> Lec	2,5 µM 10 µM	MBL2 L1210	Feng K., <i>et al.</i> , 2006
BEL	10 µg/mL	HT29, breast cancer cell line (MCF)-7	Bovi M., <i>et al.</i> , 2011
	dose à effet (40, 80 µg/mL)	A375 and MeWo melanoma cells	Perduca M., <i>et al.</i> , 2017
<i>Paxillus involutus</i> Lec	ND	A-549 et HCT-8	Wang S.X., <i>et al.</i> , 2013

5.2. Activité mitogénique et anti-mitogénique

L'activation de la mitogénèse comme chez les lymphocytes T et les splénocytes de la rate est l'une des propriétés des lectines (tableau 5). Elles stimulent la transformation des lymphocytes à partir de l'état natif vers l'état actif (mature) lors de certaines affections du système immunitaire avec une faible concentration. Il existe également d'autres lectines ayant un potentiel d'induire une suppression de la mitose (Sharon N. et lis H., 2003).

Le mécanisme d'induction de la division et d'activation des LT par les lectines de basidiomycètes est effectué par la stimulation de la sécrétion de l'Interleukine 2 (IL-2) (Nel A.E., 2002) qui se fixe sur son récepteur porté sur la cellule elle-même, ensuite une cascade de signalisation au niveau intracellulaire aboutit à l'activation de la mitose et la production d'une colonne de LT.

Les lectines peuvent interagir avec le récepteur des LT (par l'interaction sur le ou les sucres de la partie glycosylée du TCR) et d'induire leur activation via la voie de signalisation du calcium et la voie de la tyrosine kinase TK intervenant dans l'induction de la mitose des lymphocytes T (Ho J.C.K., *et al.*, 2004).

Tableau 5: Quelques lectines de champignons activant la mitogénèse

Lectine	CM	Cellules	Référence
ACG	2 µM	Les splénocytes de la souris	Wang H., <i>et al.</i> , 2002
BEL	1 µM		Zheng S., <i>et al.</i> , 2007
HRL	0,15 µM		Suzuki T., <i>et al.</i> , 2012
<i>Flammulina velutipes</i> Lec	100 µM	Les lymphocytes du spleen	Ng T.B., <i>et al.</i> , 2006
<i>Volvarella volvacea</i> Lec	8-125 nM		Ho J.C.K., <i>et al.</i> , 2011

CM: concentration minimale induit un effet mitogénique.

5.3. Activité immunomodulatrice

Elles ne sont pas toutes capables de stimuler les composants du système immunitaire. L'immunomodulation s'effectue par la régulation de l'activité sécrétoire de certaines molécules impliquées dans les réactions immunologiques (les interleukines, les cytokines, l'ion nitrique NO⁻, TNF- α , et la production des prostaglandines). Parmi les plus connues par leurs potentiels immunomodulateurs, on cite : l'ABL testée par Ditamo Y., *et al.* (2015) sur des souris ayant une inflammation provoquée par la lipopolysaccharide bactérienne (LPS) injectée par voie intrapéritonéale. Elle a inhibé *in vivo* la production des NO⁻ à 53% avec une concentration de 10 μ g/dose et de 45% par une dose de 2 μ g.ml⁻¹ *in vitro*.

Sze S.C.W. *et al.* (1996) ont purifié une lectine de *Volvariella volvacea* qui exerce une activité antitumorale vis à vis de la souche Sarcoma S-180 et entraîne le retardement de sa croissance par le prolongement de la durée de vie des souris de 63 à 100%. Elle a induit une immunomodulation par la régulation des cytokines via l'amélioration de l'expression d'IL-2 et IL- γ (She Q.B., *et al.*, 1998).

Švajger U. *et al.* (2011) ont trouvé que la lectine purifiée à partir *C. nebularis* (CNL) a stimulé les cellules dendritiques 'CDs' (human monocyte-derived) sous l'activation de voie de Toll Like Receptor- 4 (TLR4), et la activation de la production de certains facteurs moléculaires par ces cellules, qu'ils sont interleukines IL6, IL8 et la synthèse de TNF- α après l'inhibition de TLR-4 par un inhibiteur spécifique CLI-095: Myd88 inhibitory peptide.

L'expérience a été comparée avec des cellules dendritiques sensibilisées par la LPS. Ils ont trouvé que les CDs matures, traitées par la CNL, atteignent une maturation plus rapide via l'activation de la voie MAP-Kinase et des autres voies après l'interaction avec les glycanes du TLR4 que les cellules traitées par LPS qu'après cette phase de vie cellulaire. Les CDs matures expriment des facteurs moléculaires intervenant dans leurs recrutements pour être des cellules phagocytaires et les représenter vers les LT-helper type 1, induisant ensuite leurs maturations.

5.4. Activité antivirale

Afin de développer leurs systèmes de défense et de symbiose, les champignons produisent des lectines toxiques pour lutter contre les agents mycopathogènes. De nombreuses études ont montré que ces protéines inhibent la prolifération virale telles que la lectine antiphytovirus de *Paxillus involutus* qui inhibe le virus de la mosaïque du tabac (TMV: virus à

ARN infecte les plantes comme le tabac et les autres des solanacées) à 70,6% correspondant à une concentration de 200 µg/mL. Une autre lectine d'*Agrocybe aegerita* testée par Sun H., *et al.* (2002) a exercé une inhibition de l'infection de *Nicotiana glutinosa* par TMV.

Les lectines fongiques ont donné une activité très importante dans l'inhibition de la transcriptase reverse de VIH-1, induisant ensuite la diminution de sa vitesse de prolifération, où elles bloquent probablement son contact via les produits GP120 et GP41 du clivage des composées d'enveloppe virale GP160 et GP120 aux cellules immunitaires : LT helper, les macrophages et CD4 (Akkouh O., *et al.*, 2015).

Parmi celles ayant le pouvoir d'inhiber la RT du VIH type 1, on peut citer la lectine d'*Inocybe umbrinella* avec une IC₅₀ 4,7±0,2 µM (Zhao J.K., *et al.*, 2009) ; ou celle de *Stropharia rugosoannulata* à un PM 38 kDa qui inhibe l'activité de RT du SIDA à une IC₅₀ de 10 µM (Zhang W., *et al.*, 2014).

6. Intérêt de la purification et applications biotechnologiques des lectines

Vis-à-vis de toutes les informations concernant ces biomolécules, plusieurs laboratoires et compagnies comme Cytel (San Diego, CA), Glycomed/Alberta Research Council (Alameda, CA), GlycoTech (Rockville, MD) et Alpha-Beta (Boston, MA) Glycodiag ont lancé des projets de recherches pour les purifier et les produire afin de les commercialiser, vue leurs toxicités et leurs spécificités pour les carbohydrates et glycoconjugués ; ce qui ouvrira les portes à la biothérapie et à la protection des plantes et des champignons.

– Biothérapie: Le traitement et l'inhibition de la prolifération des cellules malignes, la lutte contre les virus: VIH, virus de l'hépatite B avec l'ABL (He M., *et al.*, 2017), le virus d'influenza, l'induction de mitogénèse cellulaire chez les lymphocytes, les macrophages. Dans le cas du diabète insulino-dépendant, l'ajout d'ABL-I dans les régimes alimentaires stimule la régénération des cellules pancréatiques de type β (Wang Y., *et al.*, 2012).

– Biomarqueurs: L'usage dans le marquage et la typologie des cellules comme les érythrocytes, la détection des cellules cancéreuses avec l'index mitogénique *in vitro*, dans les prélèvements biologiques par techniques immunologiques notamment l'ELISA, et la technique lectin array pour déterminer le profil saccharidique des glycoprotéines membranaires et solubles, et l'identification de certaines souches microbiennes (Cook G.M.W., 1989).

– Biopesticides: La toxicité des lectines peut jouer un rôle dans la protection des plantes, cette propriété biologique donnera l'espoir de produire des biopesticides par l'ajout des lectines comme l'AAL et la lectine de *Paxillus involutus* avec des doses modérées dans la lutte contre les agents phytopathogènes.

7. Techniques de purification des lectines des basidiomycètes

Chez les basidiomycètes, les lectines sont intra-cellulaires. Leur extraction dépend donc de la dégradation des constituants de la membrane cellulaire et la libération du liquide intracellulaire ; ce qui nécessitera des méthodes d'extraction physiques, mécaniques et chimiques, suivies par les différentes méthodes chromatographiques conventionnelles utilisant différentes résines.

Parmi les résines utilisées, il y a la DEAE/CM- (Cellulose ou Sepharose et Sephadex), la QAE-Sephadex/Tyoperal pour la chromatographie échangeuse d'ions (Zhao J.K., *et al.*, 2009), la chromatographie hydrophobe sur le Phenyl-sepharose (Guillot J., *et al.*, 1997), l'exclusion moléculaire par des gels spécifiques Sephadex (G50-G200), sepharose, sephacryl, superdex 75. La chromatographie d'affinité: utilisant des résines dans des colonnes prêtes par le sepharose, agarose où l'arylamine est combiné avec le ligand spécifique, parmi les ligands utilisés: Gal, Lac, Man, N-GALNAc et N-GlcNAc, (Pohleven J. *et al.*, 2009), Fet, PSM, les glycoprotéines des membranes des hématies.

De nouveaux équipements de haute performance ont été utilisés pour la purification : HPLC, FPLC, le clonage des gènes codons pour ces protéines et la purification par la chromatographie d'affinité pour l'histidine (His-tag) et Nickel (Žurga S., *et al.*, 2014).

8. Les champignons de la flore algérienne (*Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus*)

La flore algérienne représente une source essentielle de champignons avec une biodiversité très implorante et non ciblée par les recherches biologiques. Le présent travail a pour but de caractériser deux différentes lectines à partir de deux champignons: *Lactarius deliciosus* (collecté à l'Est Algérien: Park National d'El Kala-Taref) et *Laetiporus sulphureus* (collecté à partir des troncs d'*Eucalyptus* situées dans la route nationale n° 5 liée les deux villes Oued Athmania-Mila et Ain Smara-Constantine) et évaluer ces potentiels biologiques (activité immunomodulatrice pour la lectine de *L. deliciosus* et le potentiel antiprolifératif pour l'autre du second champignon).

8.1. Données taxonomiques des deux champignons collectés

a- *Lactarius deliciosus*

C'est un champignon de la famille des Russulacées. Croît dans les zones humides sablonneuses couvertes par des forêts riches en arbres du pin et du liège, généralement proche de la mer où le climat dominant est méditerranéen. Son nom scientifique déterminé par le chercheur Gray S.F en 1821 vient du latin *Lactarius deliciosus* où la première partie signifie le genre des lactaires car les champignons produisant du lait, et la deuxième signifie l'espèce. Il existe une confusion entre ce champignon et deux autres de la même famille *L. sanguifluus* et *L. determinus* qui possède presque les caractéristiques morphologiques similaires (Base de données ChampYves: <https://champanyves.pagesperso-orange.fr/champignons/> ; Bon M., 2004).

Espèce robuste possédant une taille de chapeau de 5-15 cm, un pied ferme, épais, s'amincissant de haut en bas, d'abord plein, puis creux et fragile. Un chapeau de couleur orange, mais plus pâle et marqué de taches ovales déprimées et plus foncées. Lors de la coupure du pied et du chapeau, la couleur change de l'orange au vert bleu foncé. Les lames sont oranges jaunes, avec l'absence des anneaux dans le pied (carpophore). Elles portent de 7 à 9 spores de taille variée entre 5,5 à 6,5 µm. crêtées, subréticulées. Commun (Base de données ChampYves: <https://champanyves.pagesperso-orange.fr/champignons/> ; Bon M., 2004).

b- *Laetiporus sulphureus* ou polypores soufré

C'est une espèce saprophyte appartient à la famille des polypores, se développe annuellement sur le bois vivant ou mort, fréquemment sur les arbres d'*Eucalyptus*. son nom vulgaire en anglais est «Chicken of the woods», connu en Europe et Amérique. Selon les données bibliographiques de la base de données mycologiques MycoDB (www.mycodb.fr), cette espèce est comestible et médicinale.

Elle est considérée comme rare en Afrique et de bonne qualité nutritionnelle (Khatua S., *et al.*, 2017). Elle est connu pour sa comestibilité à conditions de bien suivre les conseils réguliers de cuisson car peut provoquer des intoxications ou des allergies parfois graves (Ian R.H., *et al.*, 2003).

Grâce à sa couleur jaune à rose vive, sa répartition est facile à réaliser dans les forêts. Ce champignon est formé d'une imbrication souvent imposante d'une largeur de 50 cm de consoles en forme d'éventail directement appliquées sur un support. La surface est rugueuse voire noduleuse, souvent zonée concentriquement, elle pâlit en séchant. Sa chair est épaisse de 1 à 5 cm, et une couleur blanche, homogène, tendre et charnue. L'hyménium est finement poré, avec une coloration jaune intense ayant une forme irrégulièrement arrondie avec des pores de 3 à 5 mm de diamètre (MycoDB).

8.2. Propriétés biologiques des deux champignons

Les deux champignons sont largement consommés dans le monde MycoDB (www.mycodb.fr), mais pas en Algérie à cause de la mauvaise connaissance des noms scientifiques et la confusion entre les espèces comestibles, toxiques ou mortelles. De nombreuses études et enquêtes biologiques montrent que ces deux espèces possèdent des propriétés médicinales et nutritionnelles très intéressantes grâce à la présence des métabolites primaires et secondaires en forte teneur (tableau 6).

Tableau 6: Taxonomie et quelques propriétés biologiques des deux champignons étudiés *L. deliciosus* et *L. sulphureus*.

Espèce	Taxonomie	Propriétés	Molécules bioactives
<i>L. deliciosus</i>	<p>Règne: Fungi</p> <p>Division: Basidiomycota</p> <p>S/Division: Agaricomycotina</p> <p>Classe: Agaricomycètes</p> <p>Ordre: Russulales</p> <p>Famille: Russulaceae</p> <p>Genre: Lactarius</p> <p>Section: Dapetes</p>	<p>Un excellent dépuratif rénal, utilisé pour le traitement des infections urogénitales</p> <p>Antidiabétique, anti-inflammatoire, et antiradicalaire (Moro C., <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>27% Protéines, 28% sucres, lipides 7% et 6% de matière minérale (Bâ A., <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>Polyphénols 34,55 mg/kg, flavonoïdes 6,03 mg/kg, β-carotène 1,15 mg/100 mL d'extrait organique et lycopène 0,25 mg/100 mL (Bozdogan A., <i>et al.</i>, 2018)</p>
<i>L. sulphureus</i>	<p>Règne: Fungi</p> <p>Division: Basidiomycota</p> <p>S/Division: Agaricomycotina</p> <p>Classe: Agaricomycètes</p> <p>Ordre: Polyporales</p> <p>Famille: Laetiporaceae</p> <p>Genre: Laetiporus</p> <p>Espèce: sulphureus</p>	<p>Anticancéreuses, antioxydants et hépatoprotectrices (Younis A.M., <i>et al.</i>, 2019 ; Petrović J., <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>Riche en ac oléique, ac octadecenoïque et des dérivés d'ergostérol</p> <p>Produit trois différentes lectines</p> <p>Une teneur élevée en sucres et protéines, riche en acides organiques: ac oxalique et ac citrique (Younis A.M., <i>et al.</i>, 2019 ; Petrović J., <i>et al.</i>, 2014)</p>

Matériels et Méthodes

1. Récolte et Identification moléculaire de *Lactarius deliciosus*

Lactarius deliciosus est un champignon comestible qui se rencontre dans les écosystèmes riches en conifères et pins. La cueillette a été effectuée durant la période d'automne, les mois d'octobre et novembre 2016, au niveau de la pinède du lac Tonga, la route nationale Oum T Boul, Park national El Kala-Wilaya de Taref (figure 8).

L'identification taxonomique de l'espèce a été effectuée dans le laboratoire de biologie moléculaire ALVALAB, DNA analysis of Biodiversity, Espagne, par les techniques suivantes: la réaction de polymérisation en chaîne PCR, le séquençage et l'alignement bioinformatique blast. Le champignon a été séché à la température ambiante 25 °C durant 10 jours, puis broyé avec l'azote liquide. La poudre obtenue est utilisée dans l'extraction, suivie par une amplification et un séquençage des amplicons (figure 9): ITS (Internal Transcribed Spacer), nuc-LSU (nuclear Large Ribosomal Subunit, RNA 25S ou ARNr 28S), nuc-SSU (nuclear Small Ribosomal Subunit ou ARNr 18S). Les séquences obtenues ont fait l'objet d'un Blast contre les séquences de GenBank pour rechercher leurs homologies (voir annexe 1).



Figure 8: Champignon *Lactarius deliciosus* de la pinède Tonga. Park national El Kala- Taref (photo personnelle prise le 10/11/2016, à l'aide d'une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).

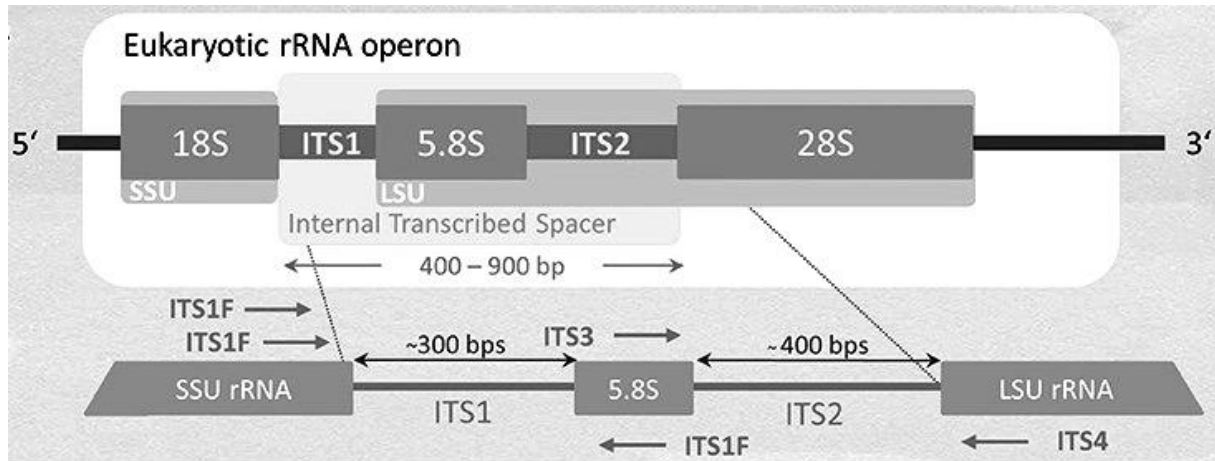


Figure 9: Représentation de l'opéron ribosomique des eucaryotes (nuc-SSU, petite sous unité ribosomique 18s ; nuc-LSU, grande sous unité ribosomique 28s et ITS, séquence interne du transcrit), et la position des amorces utilisées dans l'amplification de ces régions d'ADNr (Halwachs B., *et al.*, 2017).

2. Extraction et purification de la lectine du champignon *Lactarius deliciosus*

2.1. Extraction de protéines totales

Le champignon a été lavé avec l'eau distillée pour être découpé en petits morceaux. L'extraction des protéines a été réalisée selon la méthode de Xu C.J., *et al.* (2014), par une macération de 500 g de morceaux dans un volume de 900 mL du tampon PBS 10 mM pH 7,4 (10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl ; 137 mM NaCl ; 2 mM EDTA) puis broyés au mixeur. Le mélange a été agité pendant 24h puis centrifugé pendant 30 min à 15000 rpm à 4 °C. Le surnageant obtenu a servi pour évaluer la présence des lectines par le test d'HA et quantifier les protéines totales.

2.2. Préparation et fixation des érythrocytes

Les groupes sanguins du système ABO ont été collectés après un prélèvement des patients à partir de la veine du pli du coude de la main et le sang du lapin a été recueilli par ponction du sinus rétro-orbitaire dans des tubes citratés. Les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min à 4 °C, ensuite les plasmas ont été éliminés et les culots récupérés.

Les culots récupérés ont été lavés par une solution saline stérile (eau physiologique NaCl 0,9 %, soit par le tampon PBS 10 mM pH 7,4) suivie d'une centrifugation de 5 min à 1000 rpm et à 4 °C. Les deux étapes seront répétées cinq fois successives.

La fixation des globules rouges (GR ou les érythrocytes) sera réalisée selon la méthode de Sano K et Ogawa H. (2014). Les GR ont été incubés dans le PBS 10 mM pH 7,4 contenant le glutaraldéhyde 1% (Sigma Aldrich, G5882) pendant 10 à 15 min. Cinq cycles de lavage et de centrifugation ont été réalisés afin d'éliminer l'excès du glutaraldéhyde. Une étape de lavage, par une solution glycine 1M dans NaCl 0,9% ou le PBS a été ajoutée pour éliminer l'interaction du glutaraldéhyde avec les glycanes membranaires des érythrocytes. A la fin, les érythrocytes fixées s'immergent dans le PBS avec une concentration (v/v) de 3% pour les érythrocytes du lapin et 4% pour le système ABO et sont conservées à 4 °C (Sano K. et Ogawa H., 2014).

2.3. Evaluation de l'activité hémagglutinante (test d'HA)

C'est la méthode la plus rapide utilisé pour détecter des lectines et leur accumulation dans les extraits protéiques mais elle n'est pas toujours précise (Sharon N. et Lis H., 1998). Dans une plaque à microtitration 50 μ L du tampon PBS (10 mM pH 7,4) ont été déposés dans tous les puits, un volume équivalent de la solution protéique aura ajouté dans le 1^{ier} puits et mélangé doucement à l'aide de micropipette, un volume de 50 μ L a été prélevé puis dilué avec 25 μ L de PBS pour obtenir une dilution au demi (1/2). Les dilutions géométriques ont été réalisées pour la totalité des puits de la microplaque. En fin, 50 μ L de suspension des RBC du lapin ont ajouté dans les puits (figure 10) (Sano K. et Ogawa H., 2014).

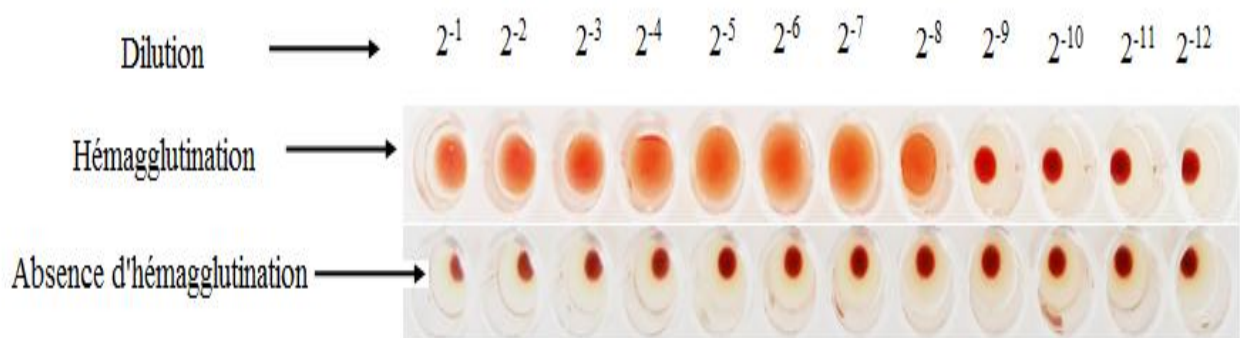


Figure 10: Test d'HA des érythrocytes fixées, en présence d'un témoin négatif (PBS), (photo personnelle prise le 15/03/2017, avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).

2.4. Purification

2.4.1. Précipitation et fractionnement des protéines par salting out

Le fractionnement des protéines de l'extrait brut se fait par le sel de sulfate d'ammonium (AMS) selon Dawson R.M.C., *et al.* (1969) (tableau de précipitation à 0 °C, annexe 2). Deux fractions protéiques avec différentes saturation en AMS ont été collectées après la solubilisation du sel dans l'extrait protéique selon la procédure suivante : Ajout d'une quantité suffisante d'AMS pour atteindre une saturation de 30 % dans l'extrait initial puis dissolution sous agitation à froid dans un bain de glace pendant 20 min. Les protéines précipitées sont récupérées après 30 min de centrifugation à 15000 rpm et à 4 °C. Le surnageant récupéré contient 30% AMS sera utilisé pour atteindre la saturation de 80 % en AMS.

2.4.2. Dialyse

Les deux fractions 30% et 80% sont solubilisées dans un volume de 15 mL de tampon PBS (10 mM à pH 7,4) et versées dans un boudin de dialyse de nature cellulosique de 12 kDa de force de rétention (Spectra/Por[®] Membrane Dialysis Products), puis dialysées pendant 24 h contre le PBS (10 mM pH 7,4). Les dialysats ont été récupérés et un test d'HA a appliqué pour choisir la fraction de titre d'activité le plus élevé (annexe 2).

2.4.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacyl

La résine utilisée dans la chromatographie est préparée et conservée dans l'éthanol 50% selon les conditions du producteur Pharmacia Biotech. Après le dégazage avec une pompe à vide Labetech à grand débit pendant 30 min, elle a été coulée dans une colonne de 1,5 cm×10 cm, puis lavée 5 fois et équilibrée avec le PBS 10 mM pH 8,4 (dégazé et filtré avec membrane de filtration de 0,45 µm).

Un volume de 3 mL de la fraction 80% a été injecté dans la colonne. Les fractions non adsorbées par la résine ont été éliminées par un lavage par le tampon d'équilibration. L'élution des fractions adsorbées a été effectué successivement par de trois tampons PBS 10 mM pH 8,4 à des molarités croissantes en NaCl 0,5 ; 1 et 2 M (annexe 2) à l'aide d'une pompe péristaltique LONGER PUMP avec un débit de 0,5 mL/min. Les fractions ont été collectées avec un volume de 2 mL par un collecteur de fractions GILSON FC80. Le spectre chromatographique a été réalisé après la lecture des absorbances (Abs) dans un

spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible à 280 nm. Un test d'HA a été appliqué pour détecter la fraction active.

3. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée

3.1. Détermination du poids moléculaire

3.1.1. Electrophorèse dénaturante SDS-PAGE

L'analyse électrophorétique de la fraction active a été réalisée dans un système Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell au laboratoire de Biocrystallography and Nanostructures (Vérone- Italie); sur un gel de polyacrylamide de 5 à 12% et 1,5 mm d'épaisseur, en présence de SDS dans les conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli U.K. (1970). Les fractions à analyser ont été mixées avec le tampon de dénaturation (annexe 3) à un rapport de 1/4 (v/v) puis incubées à une température de 95 °C /10 min. Les fractions ont été ensuite déposées dans des puits. Un kit de marqueurs de taille (BlueRay Prestained Protein Marker- PS-103) de 11-180 KDa a été utilisé.

La migration a été effectuée sous un champ électrique à 180V et une tension de 50 mA pendant 1h. Le gel a été retiré puis traité par la solution de coloration contenant l'éthanol, l'acide acétique glacial et le bleu de Coomassie solubilisé dans la MilliQ (annexe 3). Après 20 min sous agitation, la solution a été éliminée et substituée par une solution de décoloration composée d'éthanol et d'acide acétique glacial mélangé dans la MilliQ (annexe 3). La lecture et l'observation des bandes se sont effectuées après une nuit d'incubation.

3.1.2. Conditions natives PAGE

Les mêmes conditions de préparation du gel SDS-PAGE sont appliquées pour PAGE sauf l'ajout du SDS dans la préparation du gel 5 à 12% (annexe 3) et la dénaturation de l'échantillon par le réchauffement (Laemmli U.K., 1970). La fraction active est mixée avec le tampon de charge à un rapport de 1/4 (v/v) et déposée dans un puits du gel. Le même kit de marqueurs de taille PS-103 a été utilisé. Après migration sous le même champ électrique utilisé en SDS-PAGE, les bandes seront observées après les étapes de coloration et décoloration.

3.2. Dosage des protéines

La quantification de protéines récupérées de chaque étape de la purification a été réalisée par la méthode du Bradford. (1976), En utilisant le sérum albumine bovin (BSA) comme un standard, les Abs ont été lues à 595 nm avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible (annexe 4).

3.3. Test limite d'HA et d'inhibition

Les fractions obtenues ont été testées pour déterminer la fraction correspondant à une lectine par la méthode citée précédemment. Le titre d'agglutination correspond à l'inverse de la dilution maximale ayant induit une activité. L'activité spécifique est égale au nombre d'unités de l'hémagglutination (UHA) divisé par la masse des protéines (mg).

Le test d'inhibition d'HA avec les glucides et les glycoprotéines se fait de la même manière que le test HA (Sano K., Ogawa H., 2014). Dans une microplaque de 96 puits (8 lignes et 12 colonnes), ont été ajoutés (dans tous les puits) 25 μ L de PBS 10 mM pH 7,4 et un même volume (25 μ L) de sucre (400 mM pour les mono ou oligosaccharides et 1mg/mL pour les glycoprotéines préparées dans PBS pH 7,4) uniquement dans le premier puits. À partir de ce premier puits (25 μ L + 25 μ L PBS), un volume de 25 μ L a été prélevé puis dilué avec 25 μ L de PBS pour obtenir une dilution au demi (1/2). Les dilutions géométriques ont été réalisées pour la totalité des puits de la microplaque, un autre volume égal de la lectine a été ajouté dans tous les puits et mixé à l'aide de la micropipette. L'incubation des plaques a été effectuée pendant 1h à 37 °C. Un volume de 50 μ L des érythrocytes (4%) de lapin fixés a été additionné dans tous les puits de la microplaque. La lecture des résultats a été effectuée après 1h d'incubation à 37 °C.

3.4. Evaluation de la stabilité protéique

- La lectine partiellement purifiée (LDL) a été incubée dans le bain marie pendant 1h sous une variation de température (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90,100 °C).
- L'évaluation l'effet du pH sur l'HA: LDL a dialysé 24 h dans différents Tampons à des pH croissants: 2 (20 mM glycine-HCl) ; 4, 6 (20 mM citrate phosphate) ; 8 (20 mM Tris-HCl), et 10 (20 mM glycine-hydroxyde de sodium) (annexe 2).

– La solution de lectine a été incubé dans le tampons PBS contenant différentes concentration d'EDTA pendant 2h (v/v) 20, 30, 40 et 50 mM et des tampons PBS avec différents cations CaCl₂, CoCl₂, FeCl₃, MgCl₂, MnCl₂ et ZnCl₂.

A la fin, un test d'HA a été réalisé pour évaluer l'effet du chaque traitement sur l'activité protéique.

4. Evaluation du potentiel immunomodulateur 'test de clairance de carbone'

L'effet immunomodulateur de LDL a été évalué et mesuré par le test de clairance de carbone selon le protocole décrit par Biozzi G., *et al.* (1953, 1970). Il consiste à évaluer *in vivo* l'activité immunomodulatrice de certaines molécules sur le système réticulo-endothélial (RES) constitué majoritairement de cellules phagocytaires jouant un rôle vital dans la clairance des particules de la circulation sanguine (Bronte V. et Pittet M.J., 2013).

Lorsque des particules du carbone colloïdal sous la forme d'encre sont injectées directement dans la circulation sanguine d'une souris, les cellules phagocytaires vont essayer de les neutraliser. Cette activité phagocytaire est exprimée par l'indice phagocytaire (K) et évaluée par la mesure du taux de particules du carbone présentées dans le sang dans un intervalle de temps bien précis. L'élimination des particules de carbone dans le sang est régie par une équation exponentielle (Gokhale A.B., *et al.*, 2003). Dans le cas d'une immunostimulation, le taux de clairance des particules de carbone par les cellules phagocytaires sera très important, à l'inverse une immunosuppression caractérisée par un taux de clairance du carbone très faible.

4.1. Mesure de l'indice phagocytaire *in vivo*

L'évaluation du potentiel de la lectine du champignon *Lactarius deliciosus* (LDL) *in vivo* s'est effectuée sur des souris mâles de genre *Albinos Wistar* (*Mus musculus*, 25 à 35 g) de l'Institut Pasteur d'Alger, incubées à l'animalerie de département de pharmacie à l'université Bounider Salah Constantine 3 puis déplacées à l'animalerie de la faculté de sciences de la nature et de la vie de l'université frères Mentouri Constantine 1. Les souris sont logées dans les conditions adaptées de température moyenne (25±1 °C) avec une exposition à la lumière

de 12/24 h. Un régime alimentaire et accès à l'eau *ad libitum*. Toutes les expériences sont réalisées suivant les éthiques institutionnelles de l'expérimentation animale.

4.2. Protocole expérimental

Trente cinq souris ont été divisés en 5 groupes de poids homogène (figure 11). La lectine lyophilisée LDL a été solubilisée dans l'eau physiologique stérile avec des doses de 5, 10, 15 et 30 mg/kg successivement correspondent à chaque groupe traité par la LDL (G2, G3, G4, G5) et un groupe témoin (G1) recevant l'eau physiologique par l'injection d'un volume par poids corporel de 0,1 mL/10 g par voie intrapéritonéale (I.P).

Après 48h, chaque groupe reçoit une injection de la solution aqueuse d'encre de chine préparée et filtrée dans une solution transport (3 mL ancre de chine /4 mL eau physiologique/4 mL gélatine 4%) par la voie intraveineuse I.V après la stérilisation par l'éthanol chirurgical de la queue de la souris. Deux prélèvements sanguins ont été collectés à 5 min et à 15 min après injection d'encre dans des tubes secs ou des eppendorfs stériles à partir de la veine rétro orbitale par les tubes capillaires à hématocrite (Joan Laboratoire Équipement /Micro Hématocrite Heparined Tube Capillaire). Un volume de 30 µL du sang prélevé sera mixé avec 4 mL de solution de carbonate de sodium NaCO₃ 0,1% (la solution de lyse) (Biozzi G., *et al.*, 1953).

La lecture des DO a été réalisée au spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-Visible à $\lambda=675$ nm (Singh *et al.*, 2012 ; Sahu M.S., *et al.*, 2010). Les animaux ont été sacrifiés et les organes actifs (foie et rate) ont été prélevés de chaque souris puis lavés à l'eau physiologique et pesés. L'activité phagocytaire du RES a été mesurée par le calcul de trois paramètres K, α et $t_{1/2}$ (Fateh M., *et al.*, 2015 ; Biozzi G., *et al.*, 1953 ; 1970).

L'indice phagocytaire K correspond à la vitesse d'épuration du sang des animaux effectué par l'ensemble des cellules réticulo-endothéliales entrant en contact avec les particules de carbone circulant dans le sang, l'activité phagocytaire corrigée (α) représente l'activité des organes actifs (foie et rate) par unité de poids corporel, le temps de clairance est exprimé par le temps de demi vie des particules de carbone ($t_{1/2}$, min).

$$K = \frac{\ln DO_1 - \ln DO_2}{t_2 - t_1} ; \alpha = \sqrt[3]{k} \times \frac{\text{Poids}}{\text{Poids (foie + rate)}} ; t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

Avec : DO1 et DO2 les densités optiques lues aux temps t_1 : 5 et t_2 : 15 min respectivement.

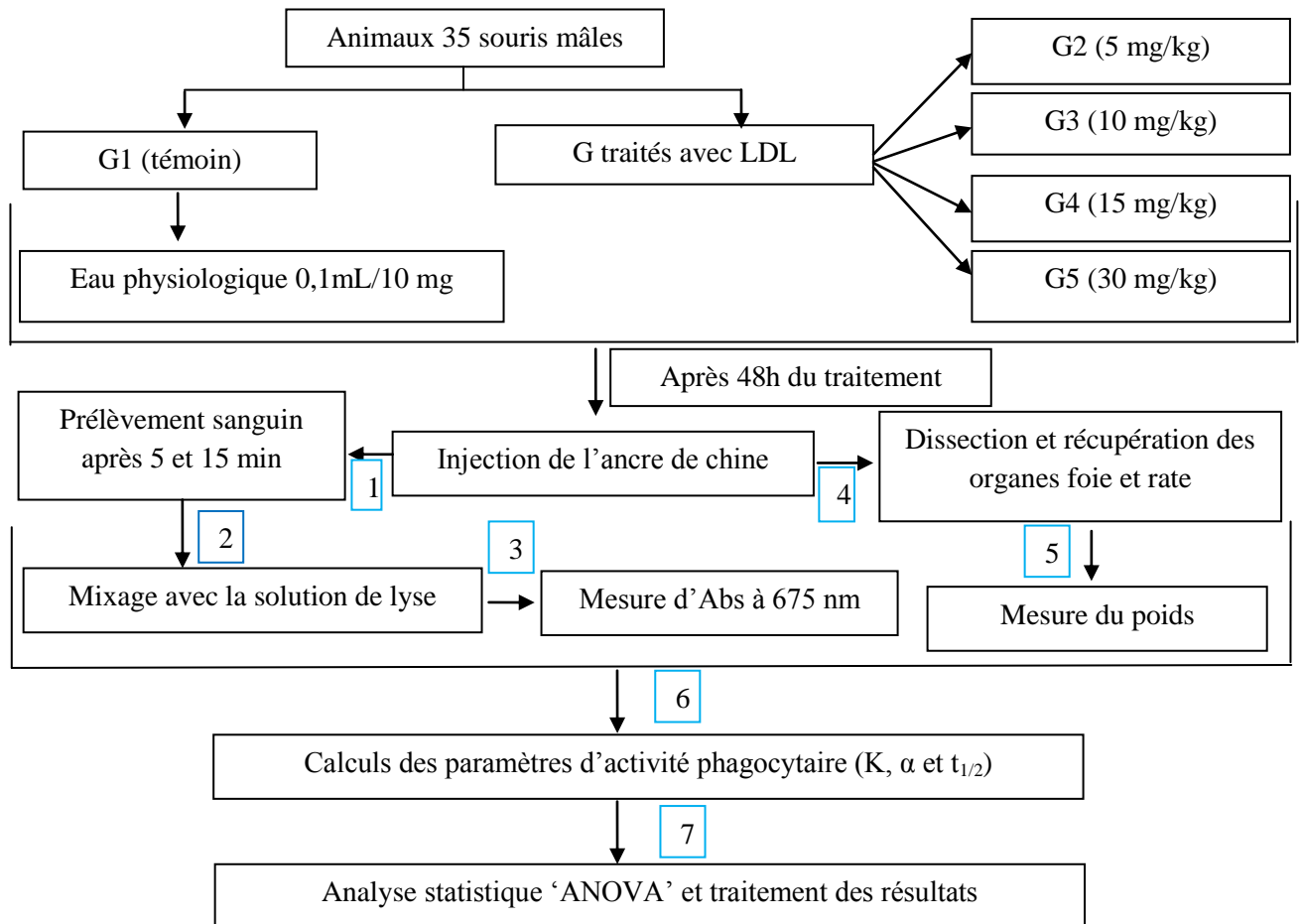


Figure 11: Plan expérimental suivi dans l'évaluation du potentiel immunomodulateur de la lectine LDL *in vivo*.

5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en effectuant une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivi d'un test post-hoc de Dunnett avec le logiciel GraphPad Prism v.7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) installé sous système Windows 8.1 Professional. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type, avec un seuil de signification statistique fixé à $p < 0,05$.

1. Collecte et identification moléculaire de *Laetiporus sulphureus*

Laetiporus sulphureus (figure 12) a été collectée (en décembre 2018), et identifiée par les mêmes procédures suivies que pour *Lactarius deliciosus*. Nous avons séquencé 2 parties d'ADNr en l'occurrence, l'ITS et le LSU. Les séquences obtenues ont été alignées par le BLASTn et attribuée dans la banque de données GenBank avec les codes d'accès suivants: MT550648, MT552980 pour chacune (annexe 1), l'espèce est dénommée *L. sulphureus* souche TMES43.



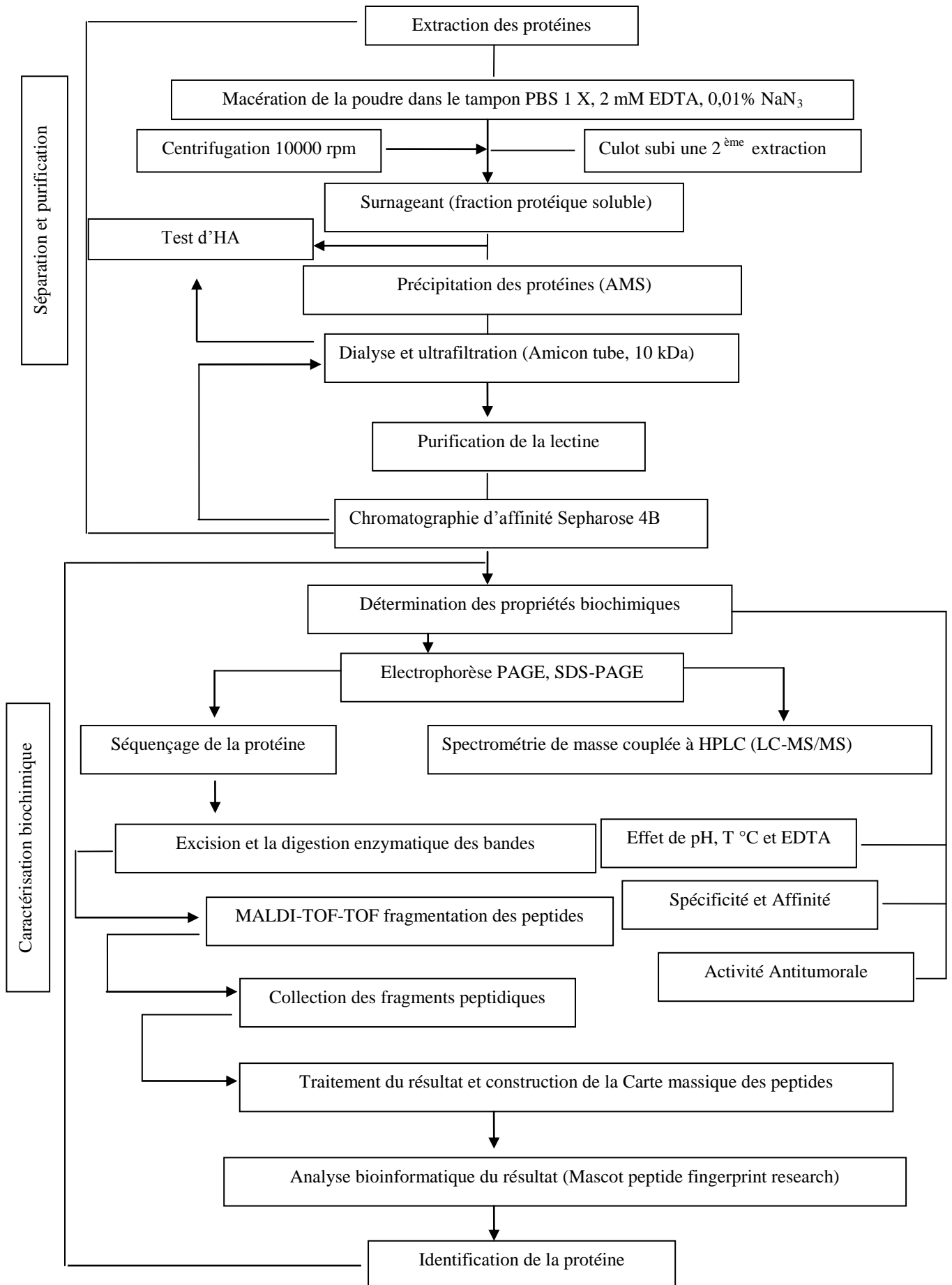
Figure 12: *Laetiporus sulphureus* attachée au tronc d'*Eucalyptus*. (Photo personnelle prise le 12/2018 avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).

2. Extraction et caractérisation de la lectine du champignon *L. sulphureus*

Afin de purifier et de caractériser la lectine du champignon *L. sulphureus* sous forme native pour l'utiliser dans l'essai d'inhibition des cellules tumorales, nous avons suivi les étapes présentées dans l'organigramme au dessous (p 65).

2.1. Extraction et fractionnement des protéines totales

L'extraction des protéines a été réalisée de façon similaire à celle utilisée de *Lactarius deliciosus*, sauf que nous avons utilisé la poudre fongique séchée et un tampon modifié PBS 10mM pH 7,4 contenant d'EDTA 10 mM et Mg^{2+} 10mM (annexe 2), suivie par une précipitation totale de 80% de saturation en AMS. Ensuite, une dialyse et ultracentrifugation de la fraction 80% ont été appliquées, suivies par une chromatographie d'affinité sur une colonne à base de Sepharose 4B.



2.2. Chromatographie liquide protéique FPLC

Un volume de 9 mL du dialysat a injecté dans une colonne (20×1,6 cm) contient du Sepharose 4B (4B200 Sigma Aldrich, 45 à 165 µm du diamètre). Pré-équilibrée par le PBSE (pH 8,4, contenant MgCl₂ 10 mM), et connectée à un système ÄKTA prime plus (FPLC GE Healthcare) équipé par un détecteur UV. Après un lavage par le tampon d'équilibration, l'élution aura réalisé par le même tampon additionné de 0,4 M lactose. La collecte des fractions a été effectuée à un débit de 2 mL/min.

La lecture des Abs a été effectuée à 280 nm sur le spectrophotomètre de type UNICAM UV/Vis. Seules les fractions éluées dont l'Abs < 0,100 ont été collectées et concentrées après la dialyse à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration Vivaspin (coupure de 10 kDa; GE Healthcare) et conservées à 4 °C. Un test d'HA a été appliqué dans chaque étape de purification pour mesurer le titre d'HA, SAc et le rendement.

2.3. Quantification des protéines et sucres totaux

Le dosage des protéines a été réalisé à l'aide du NanoDrop (Thermo-Fisher). On utilisant la méthode de Warburg et Christian (1942) basée sur le calcul du rapport entre les Abs à 280 et 260 nm. La concentration a été calculée par l'équation suivante:

$$\text{Concentration (mg/mL)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

1,55 le coefficient d'extinction moléculaire des protéines à λ 280 nm, et 0,76 représente le coefficient d'extinction moléculaire des acides nucléiques à λ 260 nm.

L'analyse de présence des sucres est l'une des méthodes appliquées sur les lectines, pour déterminer si elles seront des glycoprotéines ou non. Dont l'objectif est de comprendre s'il existe une relation entre les glycanes portés sur leurs chaînes polypeptidiques et leurs fonctions biologiques.

Pour cette raison, nous avons appliqué la méthode de Dubois., *et al.* (1956), dite la méthode phénol-acide sulfurique, en présence d'une solution standard du glucose (à une concentration 1 mg/mL), les densités optiques ont été mesurées à λ 490 nm dans le spectrophotomètre UNICAM UV/Vis (annexe 4).

2.4. Détermination de la spécificité saccharidique

La détermination de la spécificité protéique a été réalisée en suivant la méthode de Sano K et Ogawa H. (2014) par de différents sucres et des glycoprotéines (N, O glycosylées, annexe 4).

2.5. Influence de la variation de température, pH, EDTA et cations sur la l'HA

La variation des conditions physico-chimiques du milieu influence l'HA et les propriétés structurales de la lectine. Les mêmes traitements appliqués sur LDL ont été suivis.

2.6. Détermination du poids moléculaire

Afin de déterminer le PM de la lectine (PSLec), deux techniques ont été utilisées, l'électrophorèse protéique et la spectrométrie de masse (MS-MALDI).

2.6.1. Electrophorèse PAGE et SDS-PAGE

L'estimation du PM a été effectuée selon la méthode de Laemmli U.K. (1970). On utilisant un gel PAGE de 5 à 10% et 5 à 12% pour SDS-PAGE (annexe 3).

2.6.2. Spectrométrie de masse

La lectine (PSLec) a été analysée par un système nano HPLC couplé à un spectromètre de masse de type Bruker Daltonics UltrafleXtreme MS-MALDI-TOF. Où initialement, la PSLec (précipitée par l'acétone) a été ionisée par la source d'ionisation Désorption-Ionisation Laser assistée par Matrice (MALDI), et transportée vers un analyseur Quadripôle-TOF qui sépare les fragments ioniques en fonction de leurs temps du vol (TOF) et les organise selon leurs rapports masse/charge (m/z).

3. Etude protéomique

3.1. Préparation et la digestion enzymatique des bandes protéiques

A fin de déduire la séquence protéique, les bandes sont coupées et récupérées du gel SDS-PAGE, puis hydrolysées par la trypsine selon la méthode de Shevchenko A., *et al.* (1996) :

Avant la digestion, un lavage des bandes a été effectué avec la MilliQ, puis par une solution de carbonate d'ammonium 50 mM /acétonitrile ($\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$) (v/v) pendant 15 min. Les bandes ont été incubées avec l'ACN et séchées, ensuite réhydratées 5 min par NH_4HCO_3 50 mM puis d'ACN. Après l'élimination de tous liquides par l'incubation 15 min dans l'étuve, les bandes ont été suspendues de nouveau dans l'ACN et séchées à l'aide du speedvac (centrifugation à vide).

L'étape suivante consiste à réaliser la réduction et l'alkylation des acides aminés par une solution de dithiotriéthol 10 mM (DTT)/ NH_4HCO_3 50 mM, suivie par une incubation 45 min dans une étuve à 56 °C. L'excès de volume est éliminé et remplacé par un volume équivalent d'une solution fraîche d'iodoacétamide 55 mM préparée dans NH_4HCO_3 50 mM. Ensuite l'épendorf sera parvenu à l'obscurité 30 min dans l'étuve. Après l'élimination d'iodoacétamide, un lavage par NH_4HCO_3 50 mM /ACN (v/v) de 15 min a été appliqué 2 fois. À la fin, l'opération a été terminée par un dernier lavage par l'ACN et un séchage dans le speedvac.

Les fragments obtenus ont été traités par la trypsine (12.5 ng/ μL préparée dans NH_4HCO_3 50 mM) pendant 30 min à 37 °C. Après, la partie liquide a été éliminée. Les peptides de la lectine ont été immergés dans 3 μL de NH_4HCO_3 25 mM et conservés une nuit à 37 °C.

3.2. Fragmentation LC-MS/MS MALDI-TOF/TOF à tandem

Les fractions peptidiques ont été collectées après une extraction et une ultrasonification par un tampon composé de MilliQ/acide trifluoroacétique (TFA) (de 100/0 jusqu'à 50/50 (v/v)), et de 0,1% ACN pendant 30 min. Les fractions ont été purifiées et concentrées par un concentrateur C4 zip-tip. Un volume de 0,5 μL des fractions a été déposé et repéré en triple sur Anchor chip MALDI plaque cible (Bruker Daltonics), qui permet de sécher l'échantillon, les spectres massiques ont été recueillis à un intervalle de m/z 500 à 4000 en mode positif linéaire.

L'étalonnage massique de l'appareil est réalisé par un mélange standard des peptides, les ions peptidiques ont été séparés en fonction du TOF et le rapport (m/z) pour la construction de la carte peptidique.

3.3. Traitement bioinformatique (Mascot peptide fingerprint research)

Dans l'objectif d'identifier la séquence protéique, nous avons comparé les peptides massiques fragmentés expérimentalement de la lectine purifiée avec d'autres peptides des protéines (fragmentées théoriquement) attribuées dans la base de données protéiques Swiss-prot, en utilisant le programme bioinformatique Mascot. Où nous choisissons l'option recherche de l'empreinte peptidique (Mascot peptide fingerprint research).

C'est une approche bioinformatique que nous permet à faire de calculer le score d'identité (S), qui se base sur l'implémentation probabiliste de l'algorithme MOWSE (Probability based matching) développée par Perkins D.N., *et al.* (1999), après l'application de l'équation suivante:

$$S = -10 \text{ LOG } (P)$$

Où P représente la probabilité absolue qu'une identification fournie est un événement dû au hasard, soit un score de 60, celui-ci signifie une probabilité d'avoir une identité de 1/100000.

Cette recherche repose essentiellement sur la comparaison de la masse peptidique expérimentale obtenue avec des masses théoriques de peptides des protéines connues pour savoir le rapprochement entre les masses et la similarité de la lectine PSLec avec les protéines fongiques introduites dans Swiss-prot. En utilisant les paramètres suivants: une tolérance de masse peptidique de ± 1 Da, un seul clivage enzymatique (trypsine) et un seuil d'erreur $p < 0,05$.

4. Evaluation du potentiel antiprolifératif

À fin d'étudier le potentiel antitumoral de la lectine PSLec, nous avons utilisé des cellules souches du cancer de la peau A375 (human skin melanoma cells, Sigma-88113005) et des cellules normales NHEM (Normal Human Epidermal Melanocytes, Sigma-104-05N).

4.1. Culture cellulaire

Après l'étape de décongélation, les souches cellulaires ont cultivé dans des flasques stériles dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, supplémenté avec 10% du sérum bovin fœtal (FBS), 1% glutamine, les antibiotiques composés de 1% pénicilline, et

1% streptomycine), puis elles ont été incubées dans une atmosphère contient 5% du CO₂ à une température 37 °C une semaine avant le traitement.

Après, le milieu sera changé une autre fois et les cellules seront incubées à une température de 37 °C dans un incubateur Thermo à un flux de CO₂ de 5% pendant 2 à 3 jours avec un changement journalier du milieu. Après une centrifugation de 5 min à 1000 g, un passage vers la culture sur plaque a été effectué. Le culot cellulaire obtenu sera utilisé pour préparer la dilution cellulaire nécessaire pour le test, qu'elle est 8×10⁵ cellules/puits (NHEM) et 6×10⁵ cellules/puits (A375), le comptage cellulaire s'effectue à l'aide d'un compteur automatisé Invitrogen™ AMQAX1000.

4.2. Principe du test de la viabilité cellulaire (MTT)

Afin d'étudier l'influence de différentes concentrations de PSLeC sur la viabilité cellulaire, nous avons suivi la technique d'Ally M.C., *et al.* (1988), dite test colorimétrique MTT (le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, Sigma Aldrich-M2128) qui évalue la croissance globale d'une ligne cellulaire donnée, cette dernière réduit le MTT (de coloration jaunâtre) en cristaux de formazan (bleu-violacé) fortement pigmenté par la succinate déshydrogénase de la membrane mitochondriale interne.

Après la solubilisation des cristaux par le diméthylsulfoxyde DMSO, les Abs ont été mesurées par le spectrophotomètre, où l'intensité de la coloration du formazan est proportionnelle avec le nombre des cellules vivantes (figure 13). Elle permet donc d'évaluer les effets des traitements sur la prolifération globale, et nous aide de déterminer la concentration de la lectine qui inhibe 50% de la croissance cellulaire (IC₅₀).

Dans chaque plaque (24 puits), un volume de 180 µL de chaque dilution cellulaire des cellules A375 et NHEM a été déposé dans les puits et incubé pendant 48h dans l'incubateur à 5% CO₂ et une température de 37 °C avec un volume de 180 µL de PSLeC (1 mg/mL) pour atteindre les concentrations suivantes: 5, 10, 15, 20 et 0 µg/mL préparées dans le PBS, stérilisées et filtrées par une membrane de 0,22 µL dans chaque puits.

Après le traitement, les cellules ont été mélangées avec un volume de 200 µL du réactif MTT (5 mg/mL dans le PBS stérile), et incubé 3h à l'obscurité. À la fin, la fraction liquide sera éliminée et les plaques seront séchées pendant 1h, les cristaux du formazan ont été solubilisés par l'ajout de 200 µL du DMSO (Sigma Aldrich, D8418-50 mL), après la solubilisation totale, l'Abs se mesura à l'aide du lecteur TECAN INFINITE M PLEX à 570 nm.

L'expérience sera répétée trois fois, la détermination d'IC₅₀ de la croissance cellulaire a été obtenue par le calcul du pourcentage d'inhibition correspondant à chaque concentration selon les équations suivantes:

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \left[\frac{1 - (\text{Abs control} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs control}} \right] * 100\%$$

$$\% \text{ d'inhibition} = 100\% - \% \text{ de viabilité cellulaire}$$

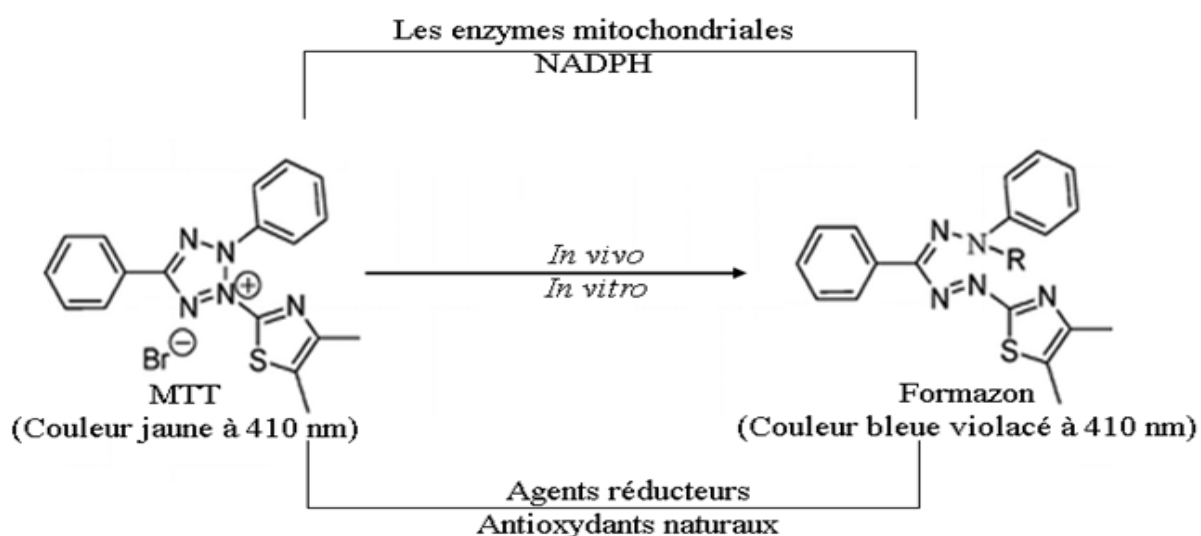


Figure 13: La réaction de réduction du réactif MTT de coloration jaune vers le formazan de coloration violette soit par des enzymes mitochondriales ou des agents réducteurs (Ally M.C., *et al.* 1988).

5. Analyse statistique

La corrélation linéaire et le calcul des paramètres étudiés ont été réalisés par le logiciel GraphPad Prism v.7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) installé sous système Windows 8.1 Professional, avec un seuil fixé de signification statistique à $p < 0,05$, les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type.

Résultats

1. Purification de la lectine

Le profil de la chromatographie échangeuse d'anion sur la colonne DEAE-Sephacyl (figure 14, a) de la fraction de titre d'HA élevé de saturation 30-80% avec AMS après le lavage et l'éluion par différentes concentrations de NaCl successivement 0,5, 1 et 2 M dans le PBS pH 8,4 indique 4 pics (un pour les fractions non adsorbées, et trois pour les fractions éluées). Le test d'HA des fractions collectées montre que les fractions du pic P2 présentent une activité HA importante (figure 14, b, figure 15). Les différentes étapes de la purification sont décrites dans le tableau 7. L'activité hémagglutinante de chaque fraction est mentionnée avec l'indice de purification.

L'extrait brut a une activité spécifique (SAC) de 216,165 UH/mg. Elle a augmenté après la précipitation au AMS jusqu'à 303,677 UH/mg. Après l'éluion avec une concentration de 0,5M de NaCl dans le PBS 10 mM pH 8,4 elle a donné une SAC de 1723,905 UH/mg de protéines avec un indice de purification de 5,67 et un rendement de 44,44%.

Tableau 7: Purification de la lectine à partir *Lactarius deliciosus*.

Fraction	Protéines (mg)	UHA ^a	SAC (UHA/mg) ^b	Indice de purification ^c	Rendement (%) ^d
Extrait brut	532,926	115200	216,165	1	100
AMS (30-80%)	337,2	102400	303,677	1,404	91,02
Pic 0,5M NaCl	2,97	51200	1723,905	5,67	44,44

^(a) Activité hémagglutinante totale représentant le titre multiplié par le volume de la fraction.

^(b) L'activité spécifique (SAC) correspondant à l'activité HA totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines (mg). ^(c) L'index de purification est défini comme étant le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines. ^(d) le rendement ou le % de l'activité HA totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.

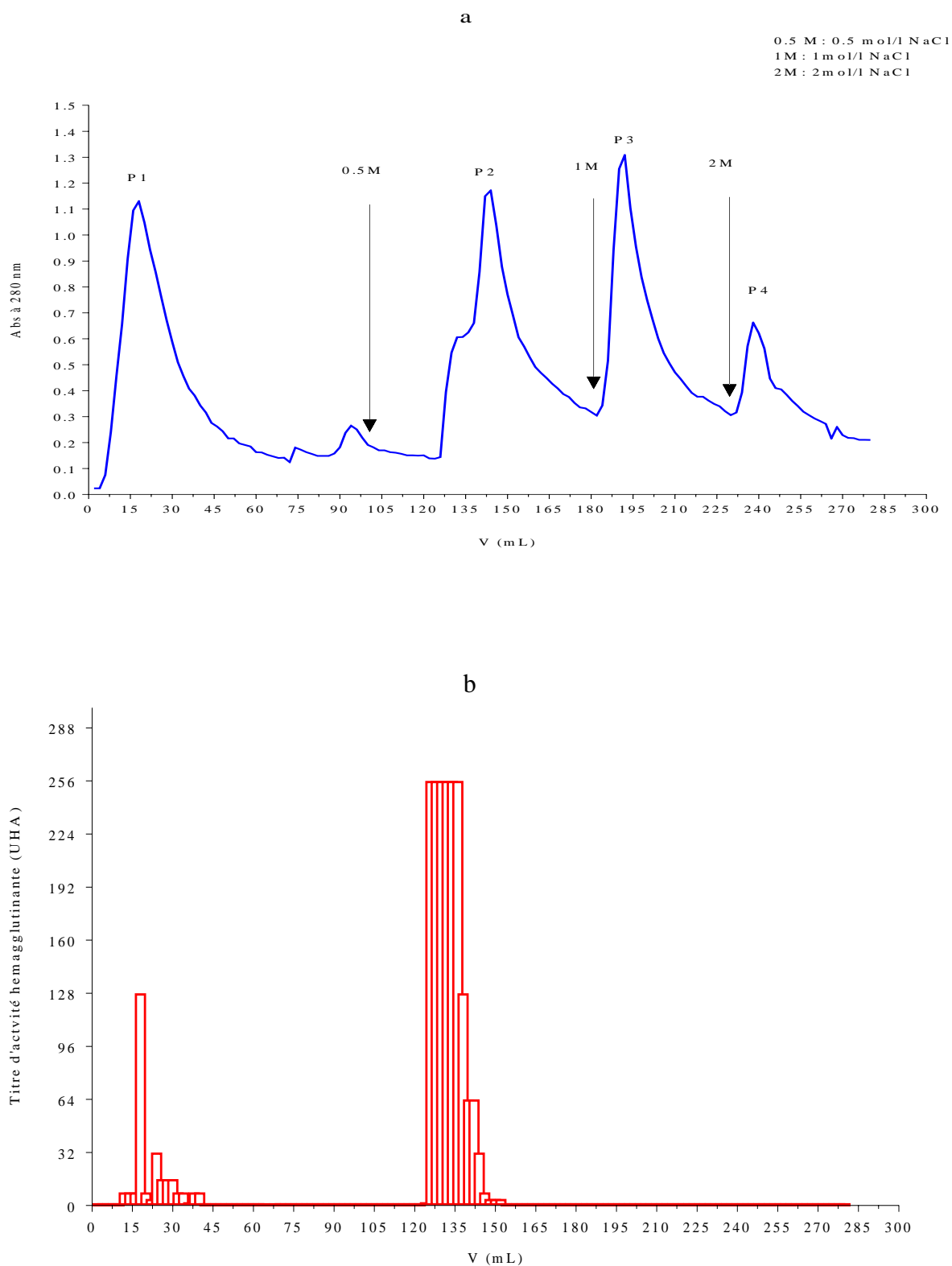


Figure 14: a- Profil chromatographique de la séparation des protéines contenues dans la fraction 30-80% de saturation en AMS sur colonne DEAE-Sephacyl ; b- Evaluation de l'activité hémagglutinante des fractions récupérées.

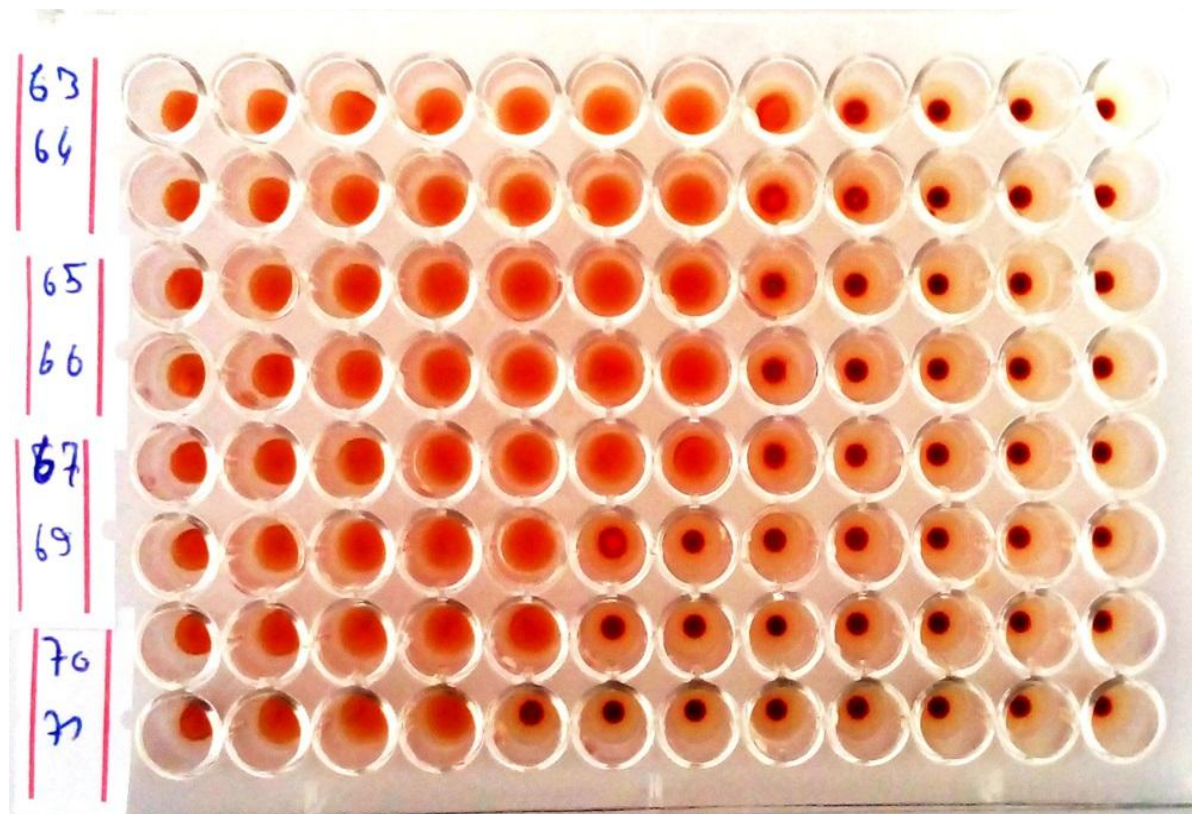


Figure 15: Test d'HA des fractions du pic P2.

2. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée

2.3. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et PAGE

L'analyse électrophorétique de la lectine (fraction active) purifiée dans les conditions de dénaturation révèle qu'elle possède une structure dimérique par l'association de ponts disulfure de deux S/U de poids moléculaire 18 et 19 kDa successivement (figure 16, a) et un poids moléculaire totale de 37 kDa révélé par PAGE (figure 16, b).

2.4. Inhibition de l'activité hémagglutinante

Les résultats obtenus montrent que l'inhibition d'HA a été effectuée soit par des sucres ou des glycoprotéines (tableaux 8 et 9, figure 17) et que la lectine LDL a une affinité pour le lactose affichant une concentration minimale inhibitrice (MIC) d'environ 0,039 mM/mL et une faible affinité pour le Méthyl- β -D-galactopyranoside 2,5 mM/mL et le Gal 5 mM/mL. Concernant les glycoprotéines, seules deux ont exercé une inhibition à savoir la fétuine et la mucine du porc avec une MIC de 0,000048 et 0,00019 μ g/mL respectivement. Les autres sucres et glycoprotéines testés n'ont pas inhibé l'HA.

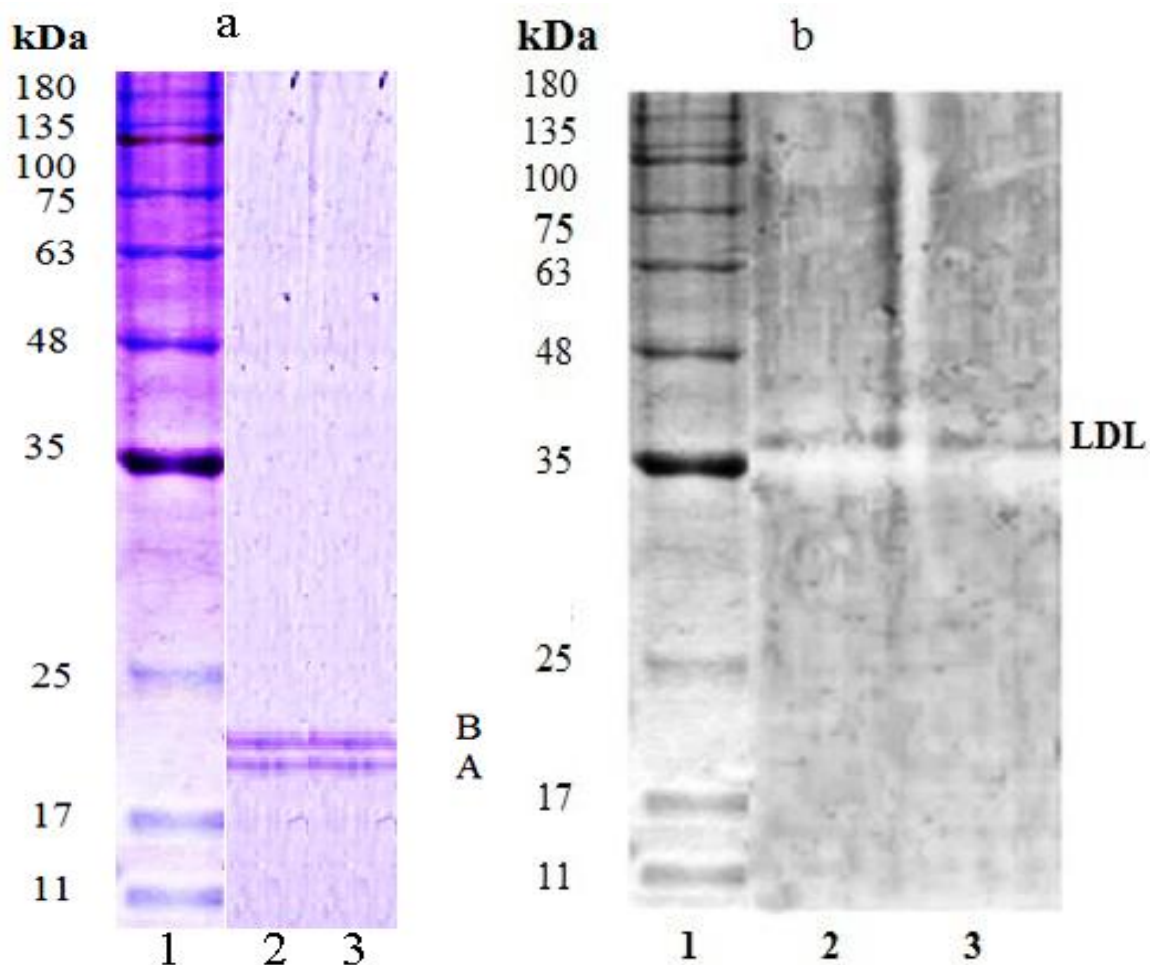


Figure 16: Résultats d'électrophorèse de la fraction active récupérée après purification par échangeuse d'anions DEAE-Sephacyl (a- SDS-PAGE, b- PAGE). Ligne 1 représente les protéines de poids moléculaire connu du marqueur Prestained BlueRay PS-103 ; les lignes 2 et 3 représentent la lectine de *L. deliciosus* et les sous unités de la lectine (A et B).

2.5. Effet de la variation de la température et le pH sur l'activité protéique

La lectine LDL a été incubée dans différentes conditions de pH (2-10), de température (30-10 °C) et d'EDTA (10-40 mM). Nous observons une stabilité de l'activité agglutinante de la protéine qui reste maximale dans le milieu à un pH neutre 7, mais au delà de cette valeur de pH, elle diminue pour s'annuler dans les milieux fortement basiques ou acides (tableau 10). Cependant, l'activité HA reste stable dans l'intervalle de température entre 30 et 70 °C ; elle atteint un titre maximal de 1024 UHA après incubation de la protéine à une température de 60 °C. En dehors de cet intervalle, l'activité s'est annulée (figure 18). En fin, les traitements par les différentes concentrations d'EDTA disodique (tableau 13) et les métaux cationiques n'ont montré aucune influence sur l'HA.

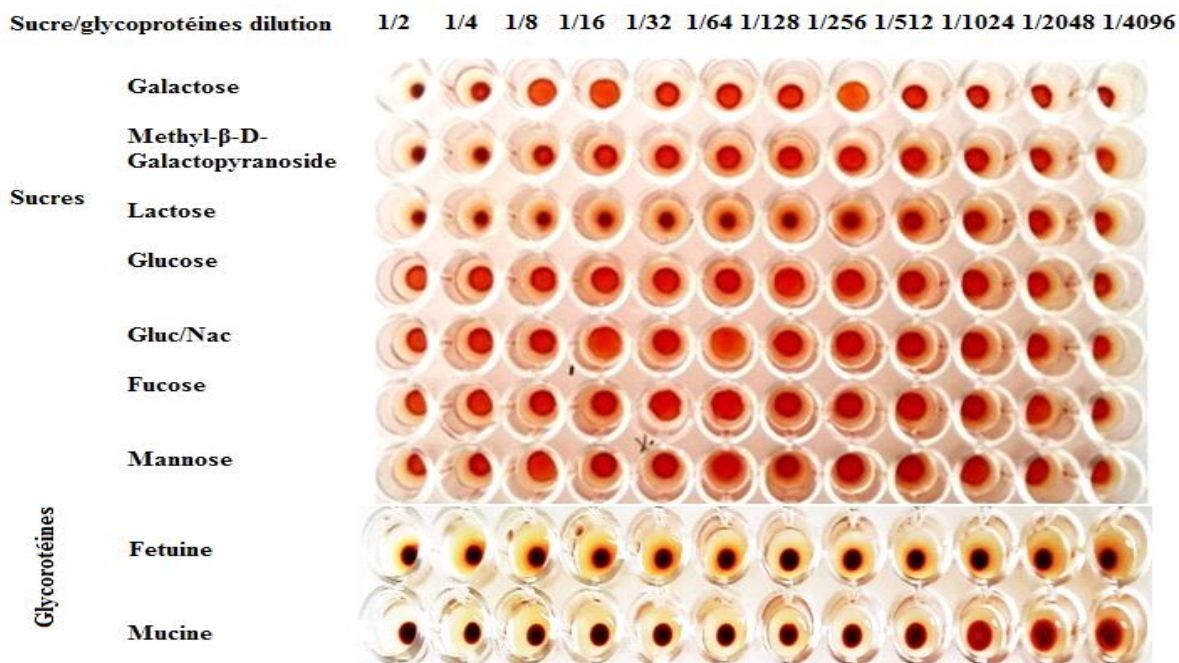


Figure 17: Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante par les sucres et les glycoprotéines (photo personnelle prise avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).

Tableau 8: Résultats de test d'inhibition d'HA par les sucres.

Sucre	Inhibition	MIC (mM)	Sucre	Inhibition	MIC (mM)
Arabinose	N	/	Lactose	I	0,039
Cellulose			Maltose	N	/
Fructose			Melibiose		
Fucose			Mannose		
Galactose	I	5	Sorbitol	N	/
GlcNac	N	/	Sorbose		
GlcN-HCl			Xylitol		
Glucose			Xylose		
Inuline			Rhamnose		
Méthyl-β-D galactopyranoside	I	2,5	Saccharose		

I: présence d'inhibition d'HA; N, absence d'inhibition d'HA

Tableau 9: Résultats de l'évaluation de l'inhibition par les glycoprotéines.

Glycoprotéines	Inhibition	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
BSA	N	/
Casein	N	/
Fetaine	I	0,000048
Mucine	I	0,00019
OVB	N	/

I: présence d'inhibition d'HA; N, absence d'inhibition d'HA

Tableau 10: Effet de la variation de pH du milieu sur le titre d'hémagglutination (UHA).

pH	2	4	6	7	8	10
UHA	0	16	128	512	32	0

Tableau 11: Effet de traitement par l'EDTA sur le titre d'HA de LDL

EDTA (mM)	10	20	30	40
UHA	512	512	512	512

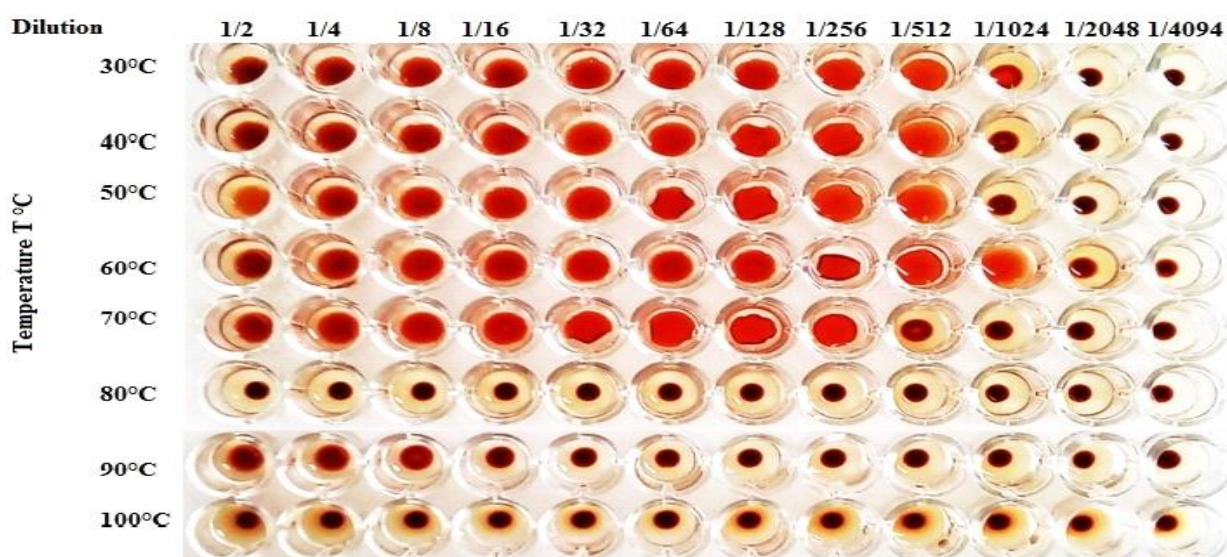


Figure 18: Effet de la variation de température sur la stabilité de la protéine. (Photo personnelle prise avec une camera Sony Cyber-shot 16.1 Méga pixel).

3. Activité immunomodulatrice

La détermination de l'activité phagocytaire exprimée par l'indice K s'effectue par la mesure de particules de carbone dans la circulation sanguine pendant un intervalle de temps donné (tableau 12, annexe 5).

Les résultats montrent que l'administration de la LDL avec des doses croissantes 5, 10, 15 et 30 mg/kg induit une augmentation significative de l'activité phagocytaire chez les groupes des souris G 02, G 03, G 04 et G 05 comparée de celle du groupe Témoin qui a reçu uniquement de l'eau physiologique avec $p < 0,0001$. L'activité phagocytaire atteint un niveau important après injection d'une dose de 10 mg/kg chez les souris du G 03 avec $K = 0,0708 \pm 0,0314$ comparée avec le groupe témoin ($K = 0,0120 \pm 0,0017$) et les autres groupes (tableau 14). Cette augmentation est accompagnée d'une diminution de temps de demi-vie des particules de carbone distribuées au niveau sanguin (figure 19).

En plus de l'indice k, l'activité phagocytaire corrigée α exprimée par le poids des organes effecteurs (actifs: foie et rate) confirme l'activation de l'ensemble de système réticulo-endothélial par LDL (figure 20). Après comparaison avec le groupe témoin, nous avons observé une augmentation significative chez les groupes traités ($p < 0,0001$). Une augmentation fortement significative a été observée chez le groupe traité (G 03) par une dose de 10 mg/kg ($\alpha = 8,58857 \pm 1,6361$). Nous remarquons que l'activité phagocytaire corrigée dépend du fonctionnement du foie et de la rate dans l'élimination et la neutralisation du sang et de la variation de l'activité phagocytaire.

L'augmentation de l'activité phagocytaire, de l'activité phagocytaire corrigée et la diminution de temps de demi-vie de particules de carbone dans la voie systémique des souris (annexe 6) résultent de la capacité de la LDL (à une dose optimale de 10 mg/kg) à induire une stimulation du système phagocytaire par activation des macrophages et des neutrophiles se situant au niveau du RES du foie et de la rate (figure 21).

Tableau 12: Effet du prétraitement avec LDL sur l'activité phagocytaire, le taux de clairance, et la demi-vie du colloïde de carbone *in vivo*.

Groupe	Activité phagocytaire (K)	Activité phagocytaire corrigée (α)	T _{1/2} (min)
G 01	0,0120±0,0017	3,673±0,6871	59,0028±8,2365
G 02	0,0308±0,0067 ns	5,01857±1,6145 ns	23,4428±5,3080**
G 03	0,0708±0,0314***	8,58857±1,6361***	11,5785±5,3080***
G 04	0,0270±0,0102 ns	5,31543±0,8857 ns	26,3685±11,5713**
G 05	0,0413±0,0170*	5,26171±0,9216 ns	19,5857±8,2409**

Toutes les valeurs sont des moyennes ± SEM, n = 7, *P<0,05, ***P<0,0001 par rapport au groupe contrôle (G 01), ANOVA à un facteur et test de comparaison multiple de Dunnett's.

Ns : non significative.

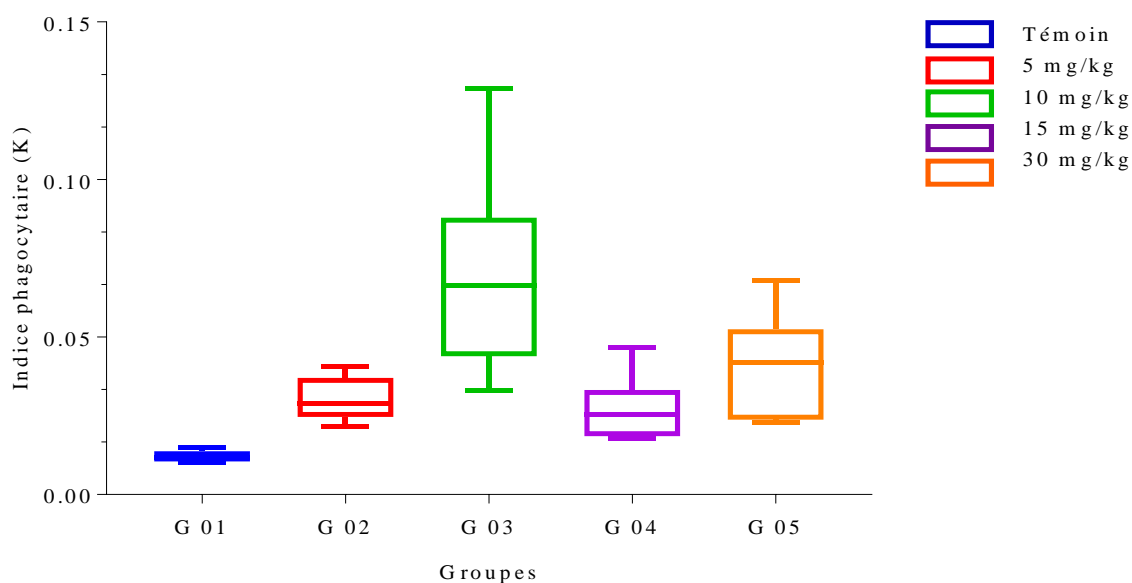


Figure 19: Activité phagocytaire K chez les différents groupes : la boîte à moustache de la variation moyenne ± SD de l'indice phagocytaire (k comme activité phagocytaire) comparée au groupe Témoin.

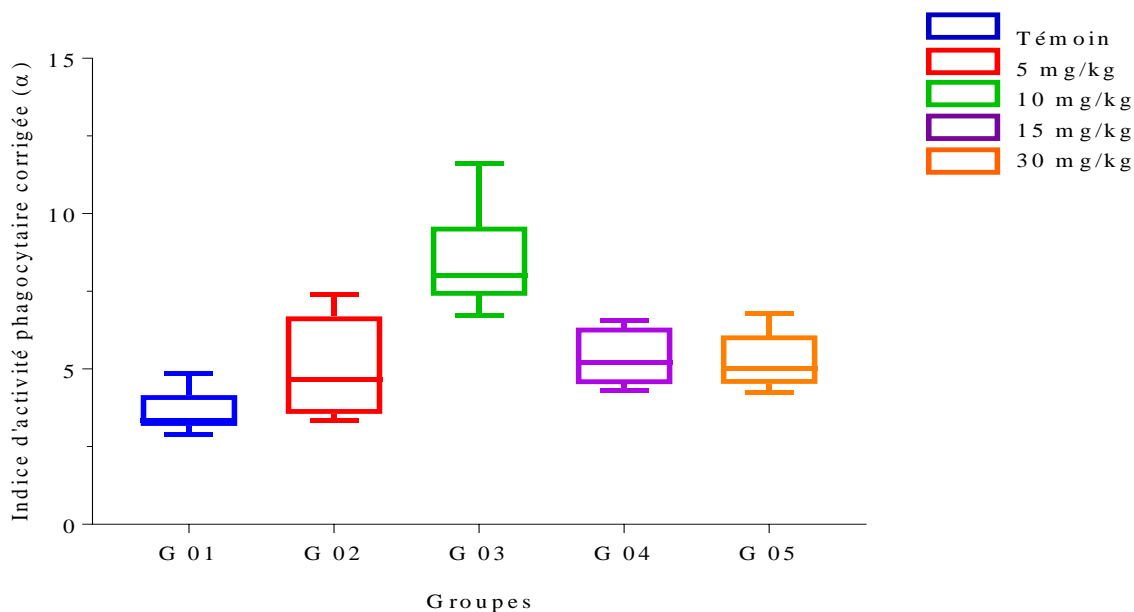


Figure 20 : Effet de LDL sur l'indice phagocytaire corrigé. La boîte à moustache de la variation moyenne \pm SD de l'activité phagocytaire corrigée α en fonction des différentes doses de lectine par rapport au groupe Témoin.

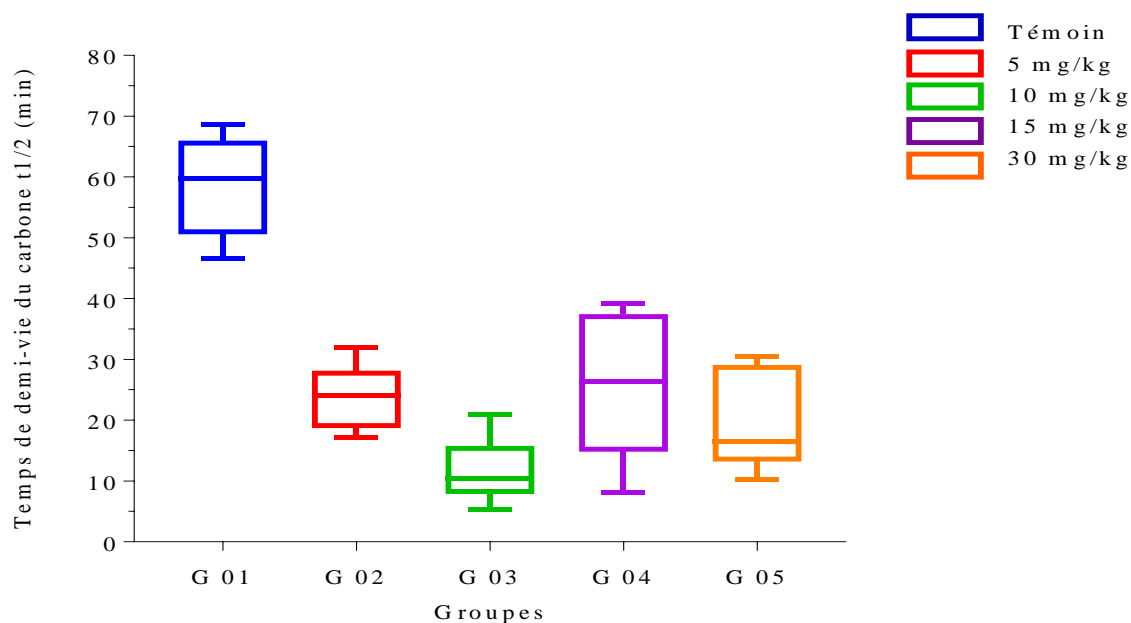


Figure 21 : Effet du LDL purifiée sur le temps de clairance du carbone: la boîte à moustache de la variation moyenne \pm SD de la variation de $t_{1/2}$ par rapport au groupe Témoin.

1. Caractérisation de la lectine (PSLec) de *L. sulphureus*

1.1. Purification de la lectine

Le test d'HA et le dosage des protéines de l'extrait protéique de *L. sulphureus* TMES43 montrent qu'il a induit une activité à un titre de 14400 UHA et une teneur protéique de 4166,1 mg. Après la précipitation par AMS, l'HA reste conservée à un titre de 10240 UHA, nous avons observé une augmentation de SAc 24,760 UHA/mg et un indice de purification de 7,17 fois supérieur à celui de l'extrait brut. Ces mesures ont augmenté supérieurement après la chromatographie d'affinité, où l'SAc atteint 1204,7 UHA/mg, un degré de pureté de 48,56 ; mais le rendement a diminué. Les étapes de purification ont été présentées dans le tableau 13, et le profil de purification par la FPLC a été présenté dans la figure 22 et l'annexe 5.

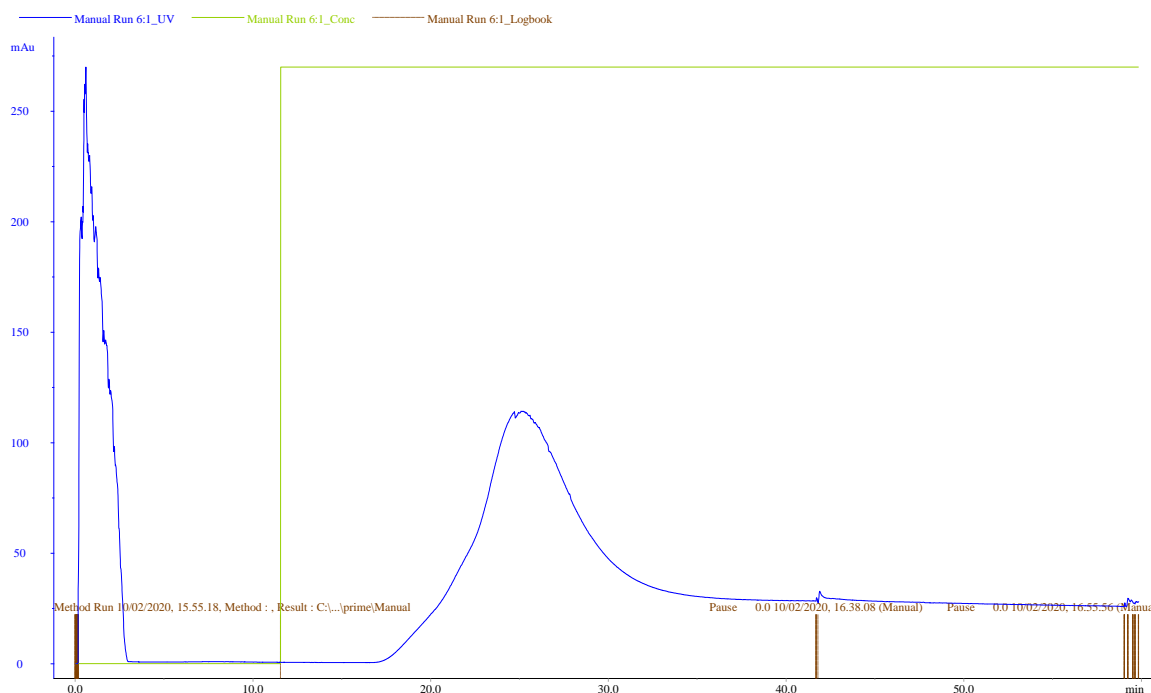
Tableau 13: Etapes de purification de la lectine PSLec à partir la poudre de *L. sulphureus*

Fraction	Protéines (mg)	Titre d'agglutination (UHA)	SAc (UHA/mg)	Rendement (%)	Indice de purification
Extrait brut	4166,1	14400	3,45	100	1
AMS fraction 80%	413,56	10240	24,760	71,11	7,17
Sepharose 4B	4,25	5120	1204,7	35,55	48,65

1.2. Electrophorèse et MS-MALDI

Les analyses de la fraction active par l'électrophorèse montrent que la lectine (PSLec) obtenue possède une structure homo-tétramérique avec un PM total de 140 kDa (figure 23, a), et deux bandes de PM 18 kDa et 36 kDa successivement ont été observées après la dénaturation sur gel SDS-PAGE (figure 23, b), l'analyse MS-MALDI de la lectine dénaturée par l'acétone montre qu'elle possède un seul pic moléculaire correspond à un PM exact de 35,904 kDa (figure 24).

a



b

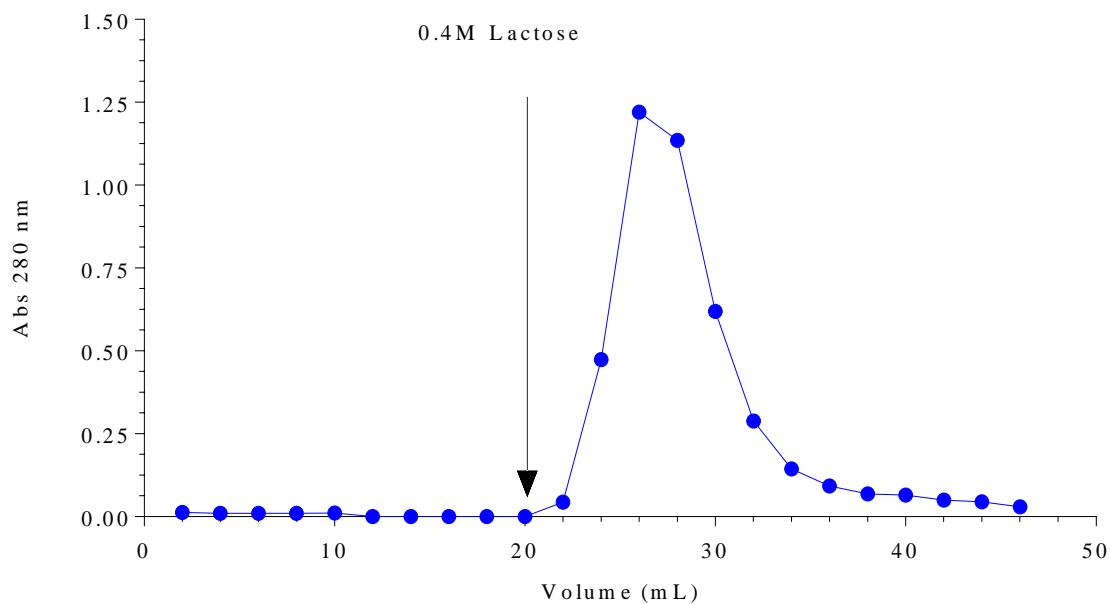


Figure 22: Le profil chromatographique de la fraction 80% de saturation en AMS: **a-** le spectre d'absorption UV des fractions séparées sur le Sepharose 4B obtenu par l'FPLC ; **b-** le spectre des fractions éluées par le lactose 0.4 M, après la mesure des densités optiques.

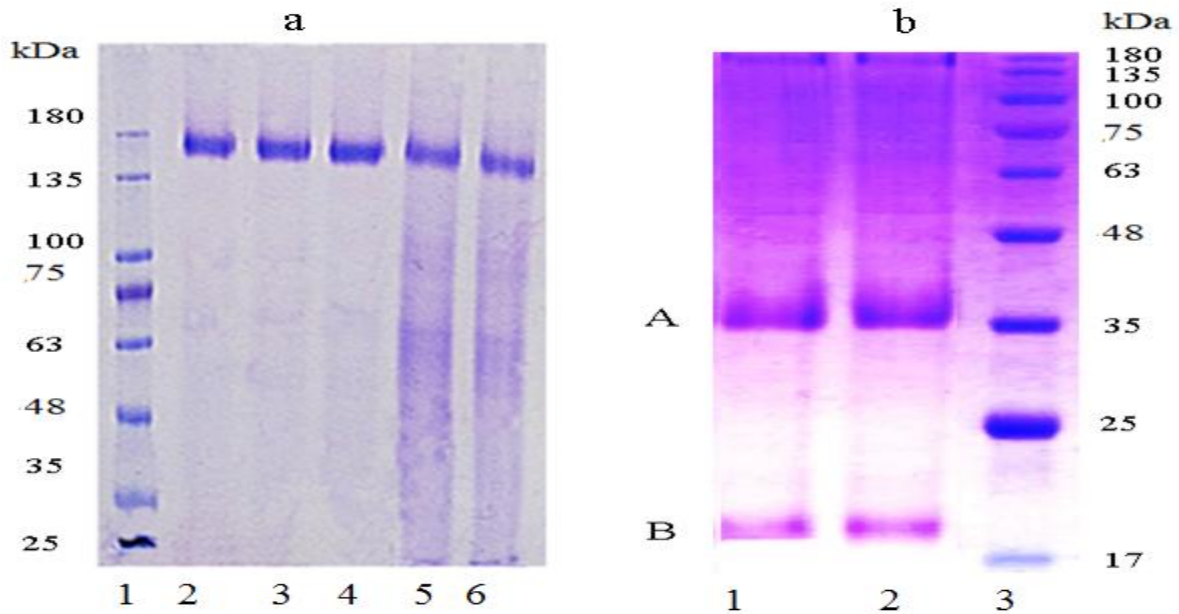


Figure 23: Résultats du poids moléculaire de la lectine PS-Lec: a- Electrophorèse PAGE, le puits 1: le marqueur de taille protéique PS-103, les puits 2 jusqu'à 6 représentent la bande protéique de la lectine PS-Lec après la concentration par l'acétone ; b- Electrophorèse SDS-PAGE, les puits 1 et 2 représentent les deux bandes obtenues après la dénaturation de la lectine PS-Lec (A et B) de PM approximative 36 et 18 kDa respectivement, le puits 3 correspond au marqueur PS-103.

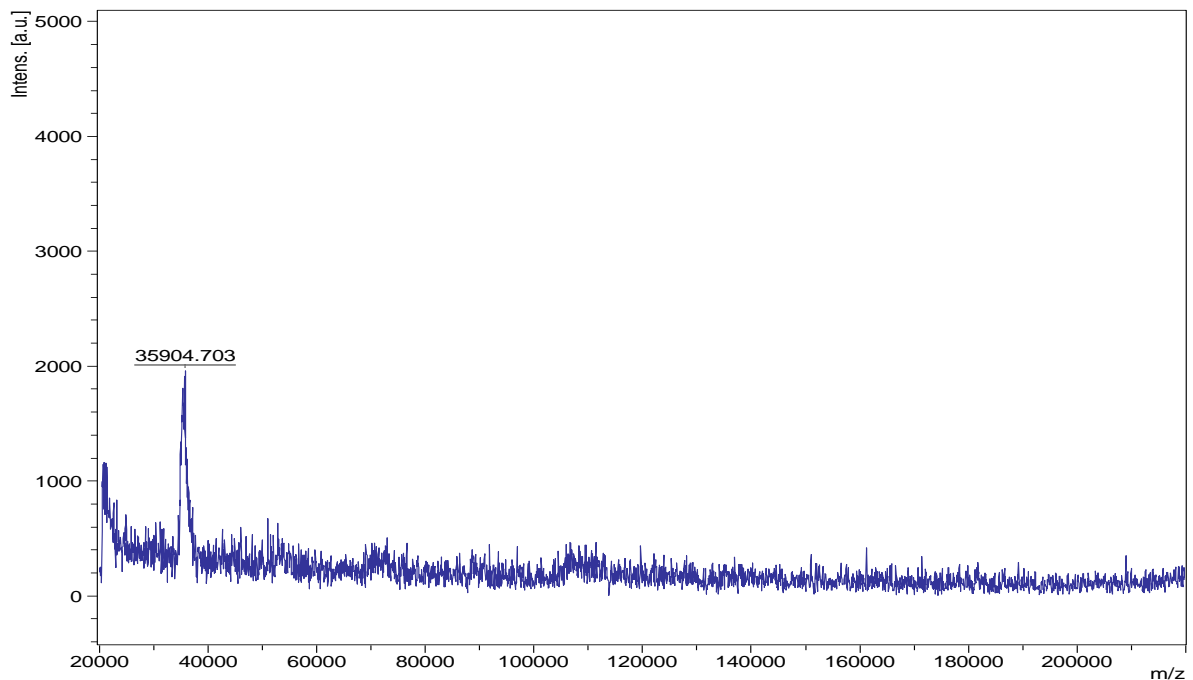


Figure 24: Détermination du PM de la lectine par MALDI-MS, le spectre exprimé avec le rapport masse/charge (m/z).

1.3. Les propriétés biochimiques

Les résultats du test d'inhibition d'HA ont montré qu'elle a inhibé par le Lac à une MIC de 5 mM, une faible inhibition a été observée avec le galactose (tableau 14, figure 25).

Les résultats de la variation d'activité HA sous l'influence de différents tampons à pH gradués ont montré qu'elle soit restée stable dans les pH basique (pH [7, 9]), où son pourcentage d'activité est de 100%, une forte diminution a été observée lors de la transformation du tampon par un autre acide à pH 4. Où la lectine a perdu sa fonction adhésive et caractérisé par un faible pourcentage de 6,25%, et une absence totale d'activité a été observée à pH 2 (figure 26, a).

Complètement à ces résultats, la variation de température induit une instabilité et une dénaturation totale de la protéine lorsqu'elle atteindra 100 °C, une réduction de 50% de l'activité initiale a été observée dans l'intervalle de température [50- 60 °C], une activité HA a été exercée dans les basses températures (figure 26, b).

Le traitement par l'agent chélateur EDTA disodique 10 mM préparé dans le PBS pH 7,4 a entraîné une diminution de 40% de l'activité HA initiale de la lectine PSLec. Elle retournera sous la présence des cations métalliques: CaCl₂, MgCl₂ et ZnCl₂, nous avons observé que les trois cations utilisés entraînent une influence de même titre UHA (tableau 15, figure 27).

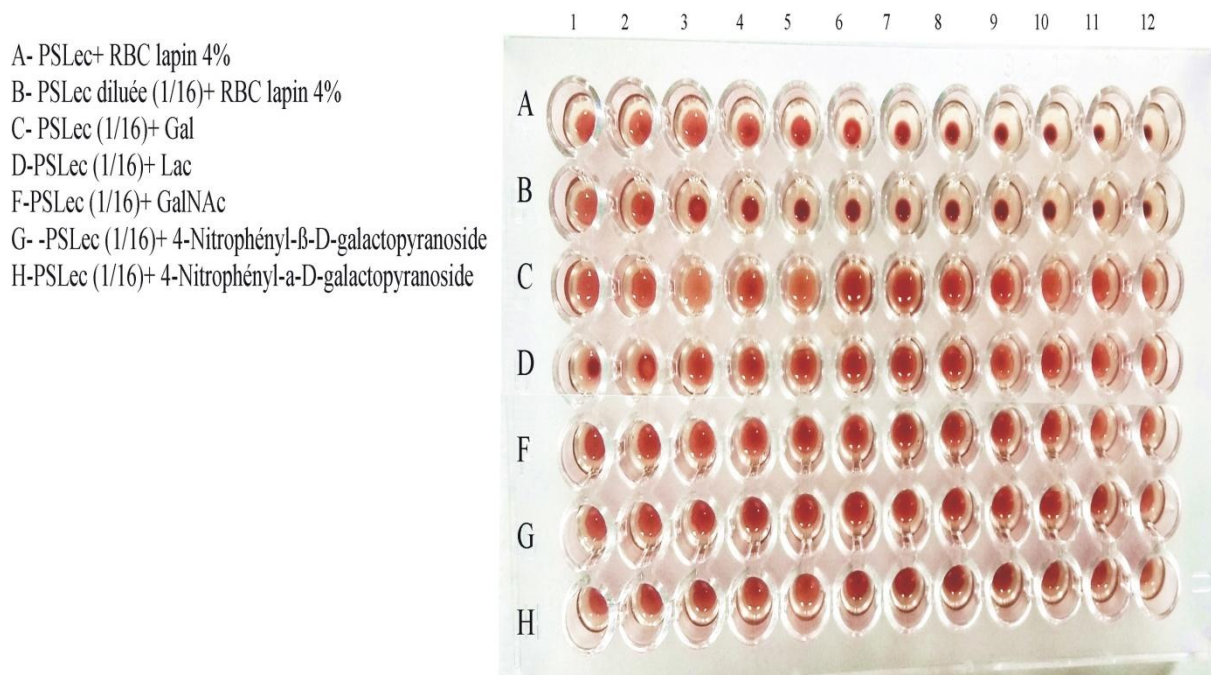


Figure 25: Résultats du test d'inhibition par les sucres de PSLec.

Tableau 14: Effet de différents sucres et les glycoprotéines sur l'activité HA de PS Lec.

Sucre/ Glycoprotéine	Inhibition	MIC	Sucre/ Glycoprotéine	Inhibition	MIC
Arabinose	N	/	Lactose	I	5 mM
Cellobiose			Mannitol	N	/
4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside			Mannose		
4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside			Melibiose		
D (+)-Galactose			L-Rhamnose		
D (+)-Glucose			Saccharose		
Glucosamine HCl			Xylitol		
Albumine			Mannose		
Fetuline			Ovalbumine		
Mucine			/		

I: présence d'inhibition d'HA; N, absence d'inhibition d'HA

Tableau 15: Résultats de l'effet de traitement par l'EDTA et les métaux sur l'activité HA.

Traitement	native PS Lec	Treated PS Lec	CaCl ₂	MgCl ₂	MnCl ₂
UHA	128	32	++++	++++	++++

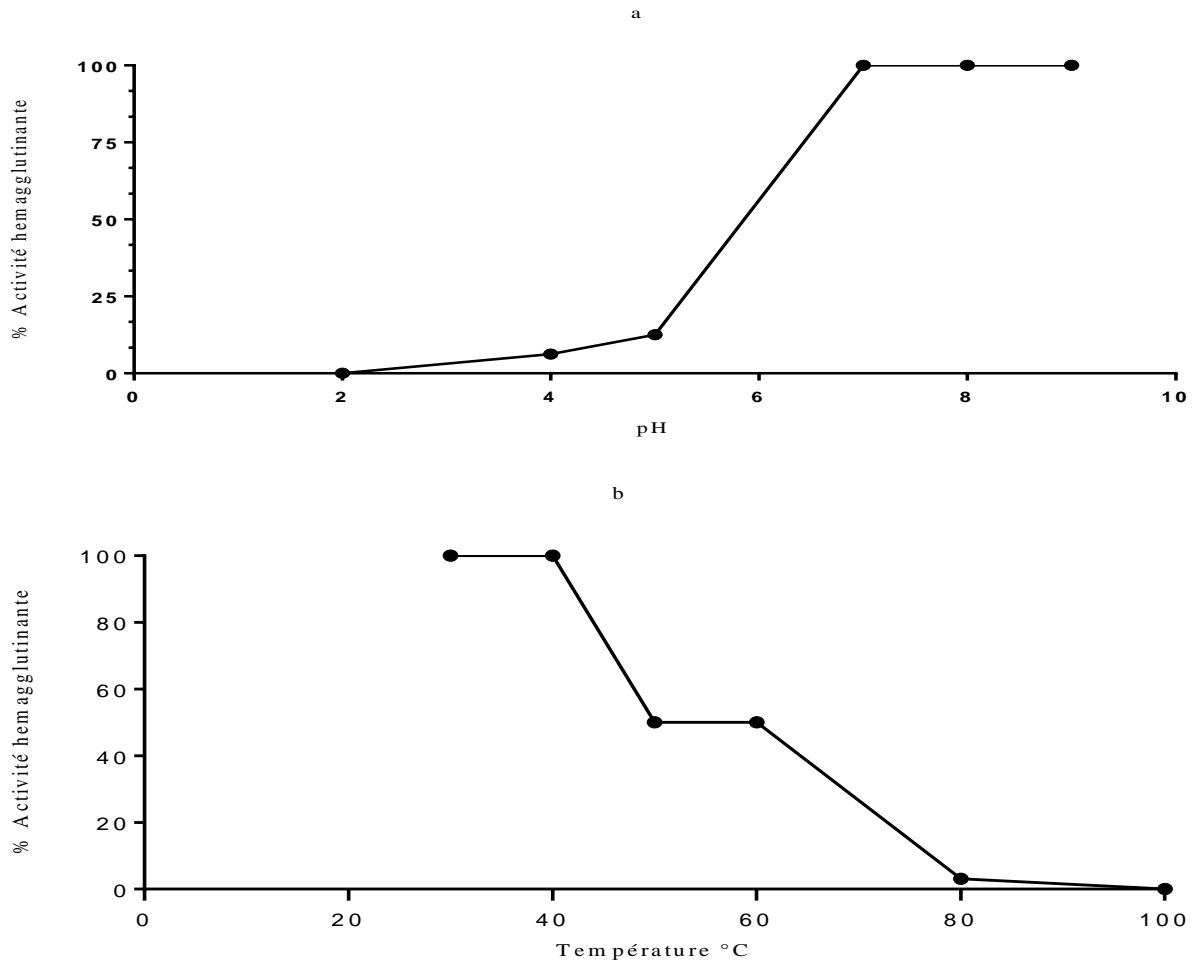


Figure 26: Influence de la variation du pH (a) et la température (b) sur l'activité hémagglutinante (HA) de PSLec.

A- PSLec native+ RBC lapin 4%

B- PSLec+EDTA

C- PSLec traitée EDTA+chlorure de calcium

D-PSLec traitée EDTA+chlorure de magnésium

E-PSLec traitée EDTA+ chlorure de manganèse

F- Cations +RBC lapin 4%

1-3: chlorure de calcium; 4-6: chlorure de magnésium

7-9: chlorure de manganèse; 10-12: PBS+RBC lapin 4%

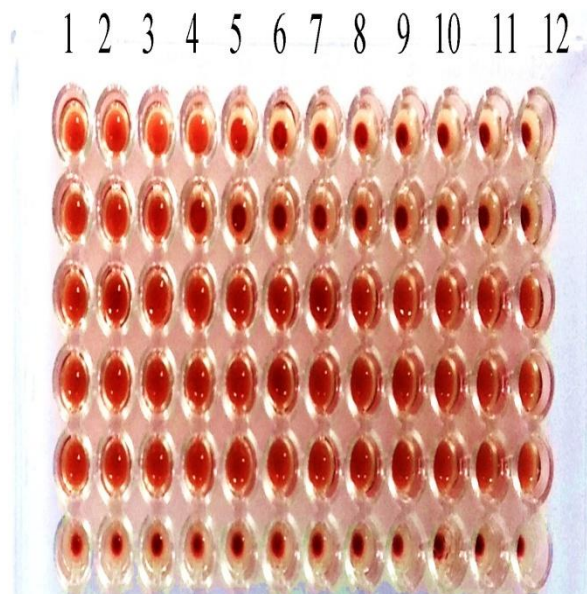


Figure 27: Effet du traitement par l'EDTA disodique et différents métaux sur l'activité HA de la PS Lec.

2. L'analyse protéomique

Les résultats de la comparaison par Mascot ont expliqué dans le tableau 16. Les peptidiques massiques de la PSLec ont un score maximal d'identité égale à 43 avec ceux de la protéine 'Autophagy-related protein 16' de l'espèce fongique *Meyerozyma guilliermondii*, qu'elle a de 19475 Da de PM, une valeur d'attente (Expectation value/Expect) de 1,8 et un nombre de peptides fortement identiques (matches) de 5.

Selon les résultats, la lectine purifiée PSLec n'a aucune ressemblance de composition en aa avec les autres lectines fongiques précédemment purifiées. Les fragments ioniques analysés par le MS- MALDI-TOF/TOF de la bande protéique de 36 kDa ont présenté dans la figure 28.

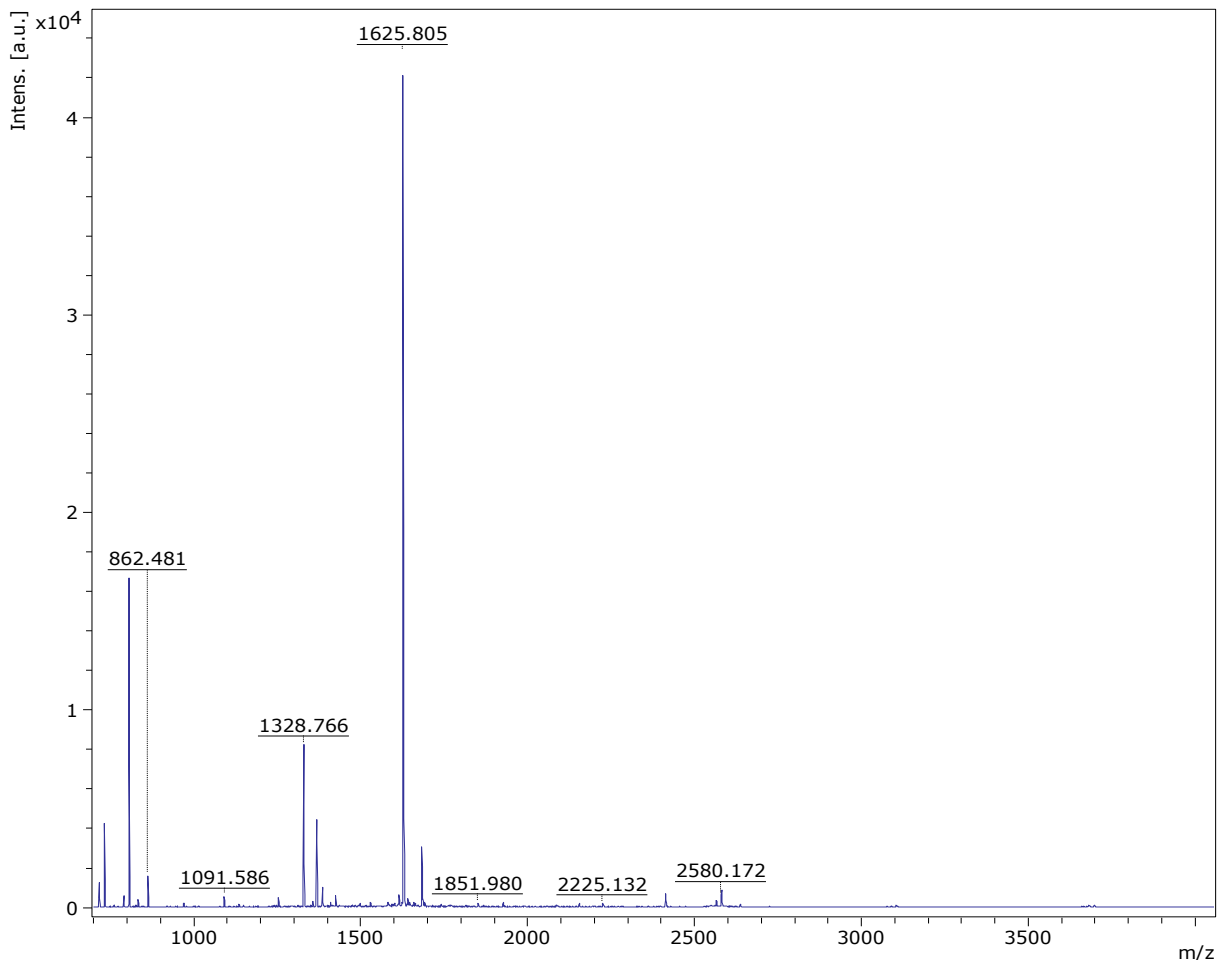


Figure 28: Spectre de la Fragmentation Tandem MALDI-TOF/TOF, les ions massiques des peptides ont indiqué selon le rapport m/z et l'intensité d'occurrence.

Tableau 16: Résultats de la recherche de l'empreinte peptidique (Mascot peptide fingerprint research).

Expasy Id	Protéine	Espèce	PM ^a	Score ^b	P ^c	Matches ^d
ATG16_PICGU	Autophagy-related protein 16	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	19475	43	1,8	5
RM23_SCHPO	54S ribosomal protein L23, mitochondrial	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	17871	34	14	3
YE137_YEAST	Putative uncharacterized protein YER137W-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11916	33	17	4
UTP6_YEAST	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6	<i>S. cerevisiae</i>	52670	32	21	7
CIN8_ASHGO	Kinesin-like protein CIN8	<i>Ashbya gossypii</i>	107408	32	22	9
VPS52_SCHPO	Vacuolar protein sorting-associated protein 52	<i>S. pombe</i>	58576	31	27	8
DTD_KLULA	D-aminoacyl-tRNA deacylase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	16514	24	1,4e ²	3
ICT1_YEAST	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ICT1	<i>S. cerevisiae</i>	45397	30	32	6
BLI1_CANGA	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit BLI1	<i>Candida glabrata</i>	12323	29	42	3
SLX4_ZYGRC	Structure-specific endonuclease subunit SLX4	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (strain ATCC 2623/ CBS 732/ NBRC 1130/ NCYC 568/..)	61615	29	42	5

S : *Saccharomyces* ; S : *Schizosaccharomyces*.

Tableau 16: Suite.

Expsy Id	Protéine	Espèce	PM ^a	Score _b	P ^c	Matches ^d
YA38_SCHPO	Uncharacterized protein	<i>S. pombe</i> (strain 972/ ATCC 24843)	10345	23	1,6e ²	2
YGBA_SCHPO	Universal stress protein A family protein C25B2.10	<i>S. pombe</i> (strain 972/ ATCC 24843)	34232	29	45	7
BUR1_EMENI	Serine/threonine-protein kinase bur1	<i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4/ ATCC 38163/CBS 112.46/ NRRL 194)	61207	28	47	6
MCES_ASPOR	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	<i>Aspergillus oryzae</i> (strain ATCC 42149/ RIB 40)	57220	27	71	7
OBP1_SCHPO	Oxysterol-binding protein-like protein 1	<i>S. pombe</i> (strain 972/ ATCC 24843)	59169	27	74	6
PAM17_NEUCR	Presequence translocated- associated motor subunit pam17, mitochondrial	<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698/ 74-OR23-1A/ CBS 708.71)	28703	26	79	3
SWC4_ASPFU	SWR1-complex protein 4	<i>Neosartorya fumigata</i> (strain ATCC MYA- 4609/ Af293/ CBS 101355/ FGSC A1100)	65970	26	87	8
SGN1_YEAST	RNA-binding protein SGN1	<i>S. cerevisiae</i> (strain ATCC 204508/ S288c)	28993	26	87	8
AMYG_ARTBC	Glucoamylase ARB_02327-1	<i>Arthroderma</i> <i>benhamiae</i>	68070	26	95	5

A- Le poids moléculaire calculé théoriquement de la protéine après l'ionisation monoisotopique par l'analyte $[MH]^+$. B- Le score représente le résultat de l'analyse contre les protéines incluses dans Swiss-Prot (Plus le score est élevé, plus l'identification est fiable). C- P ou Expect (Expectation value): la probabilité pour avoir le bon score par hasard. D- Le nombre de peptides ou matches théoriquement fragmentés ont une forte identité avec les peptides expérimentalement obtenus de la molécule purifiée de la digestion par la trypsine.

3. Activité cytotoxique

Les résultats préliminaires du test de la viabilité cellulaire ont exprimé dans la figure 29 et ils ont montré que la PSLeC a un pouvoir cytotoxique pour les deux lignes cellulaires utilisées A375 et NHEM. Toutes les doses testées induisent une lyse cellulaire des cellules normales. Chez les cellules malignes A375, l'inhibition de 50% de la croissance a été correspondue à une concentration de 11,599 $\mu\text{g/mL}$ de PSLeC. À cause de sa toxicité sur les cellules normales NHEM, on ne peut pas considérer PSLeC comme une molécule antitumorale.

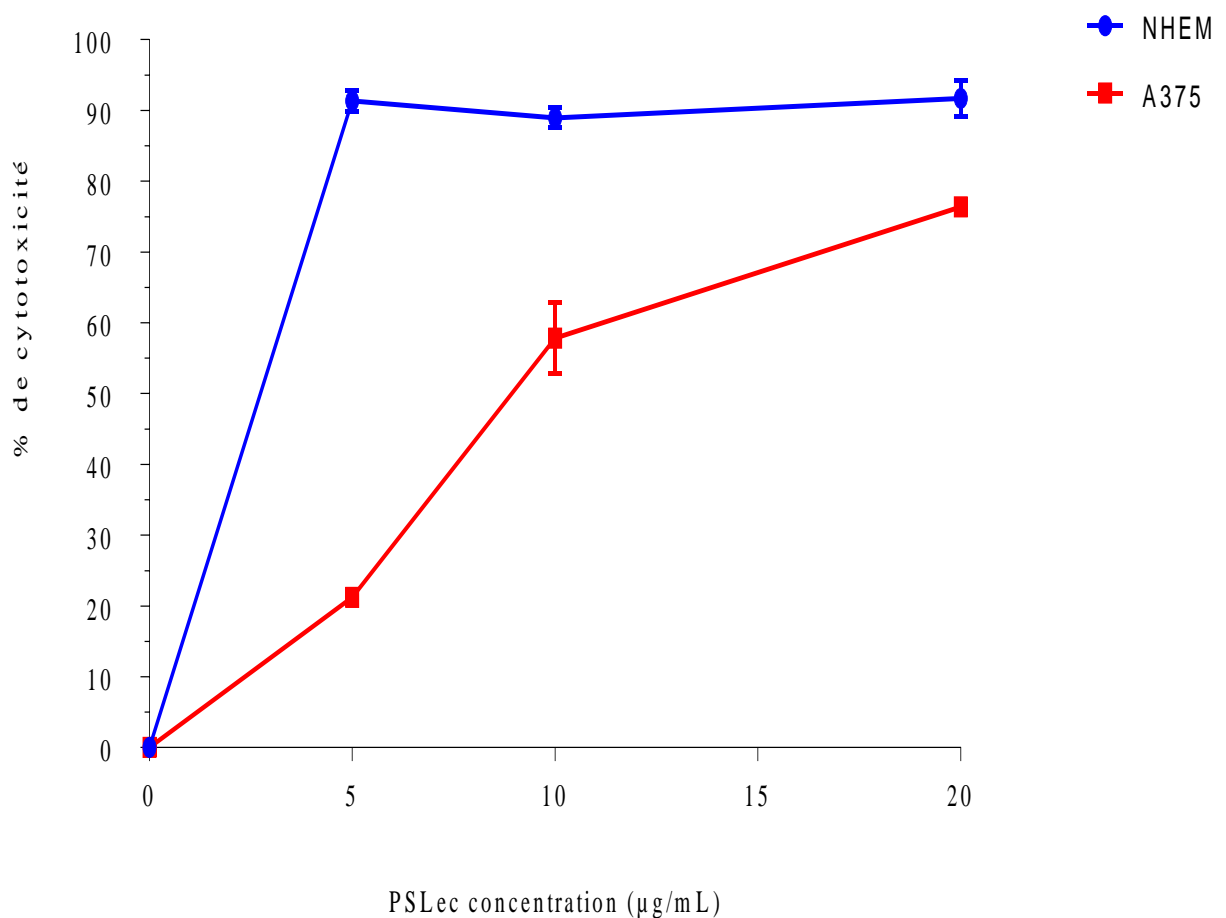


Figure 29: Effet du traitement par des concentrations de PSLeC sur la croissance des cellules malignes A375 et des cellules normales NHEM, les résultats ont exprimé en $\text{Moyen} \pm \text{SD}$, avec les équations et les coefficients de corrélation correspondantes $Y = 3,658X + 35,98, 0,4746$; $Y = 3,894X + 4,786, 0,9243$ pour les cellules NHEM et A375 respectivement.

Discussion

1. Purification de la lectine

Les lectines représentent une famille protéique essentielle pour l'homme grâce à leurs propriétés biochimiques et leurs activités potentielles exercées. L'Homme les utilise dans les domaines immunologiques (le diagnostic de certaines pathologies comme cancer, typage de groupes sanguins), le traitement médical l'immunostimulation, la lutte contre les inflammations (Alencar N.M.N., *et al.*, 2010), en biotechnologie: l'intégration dans les kits de diagnostic, la purification de glycoprotéines et des biopesticides (Sun H., *et al.*, 2003). Mais le problème qui s'apparait dans l'obtention de ces lectine en haute pureté.

Il n'existe pas de méthode adéquate pour la purification excepté la chromatographie d'affinité utilisant des gels spécifiques de Dextrane et Sepharose couplée avec des sucres ou des glycoprotéines (Nakamura-Tsuruta S., *et al.*, 2008) qui reste couteuse, et dans certains cas, la rupture de l'interaction lectine-sucre après l'élution peut influencer les propriétés et la stabilité structurales de la protéine (Nascimento K.S., *et al.*, 2012 ; Podgorsky V., *et al.*, 2014). Cependant, dans certaines purifications à base d'affinité, l'inclusion directe de l'extrait brut dans la colonne peut contaminer la résine par les pigments, les polyphénols considérés comme molécules puissantes pour induire une HA des érythrocytes (Cortés-Giraldo I., *et al.*, 2012) ; ce qui crée un problème dans la détermination de la nature d'agglutination. L'élaboration d'un protocole de purification commencera par la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium suivie par une chromatographie de différents principes.

Dans le présent travail, la lectine a été purifiée à partir du champignon *Lactarius deliciosus* par une méthode conventionnelle basée sur la précipitation des protéines par le AMS en deux fractions 0-30 et 30-80%, dans le but de voir la fraction protéique la plus concentrée en lectine car la précipitation avec l'AMS augmentera le titre d'HA due à l'élévation de la concentration protéique ce qui augmentera le nombre de site de liaison CDR avec les glycanes membranaires des hématies. Cette méthode n'influence pas l'activité de la lectine ou sa stabilité structurale contrairement à d'autre sels ou solvants organiques qui induisent la dénaturation ou la diminution de l'activité protéique (Nascimento K.S., *et al.*, 2012).

La purification de la lectine a été effectuée par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne DEAE-Sephacyl (tableau 7). La fraction de 30-80% de saturation a une SAc de 303,677 UHA/mg de protéines comparée à celle de l'extrait brut, SAc : 216,165 UHA/mg. L'élution de la lectine contenue dans cette fraction par un gradient discontinu de NaCl 0,5, 1 et 2 M dans le tampon phosphate, les tests d'hémostase des fractions issues de chaque pic montrent que les fractions du pic P2 éluées par 0,5 M possèdent une SAc de 1723,905 UHA/mg et un indice de purification égal à 5,67.

Plusieurs lectines des basidiomycètes subissent les mêmes étapes de séparation avec l'addition d'une chromatographie échangeuse de cations et une exclusion moléculaire comme la lectine de l'espèce *Paxillus involutus* (Wang S.X., *et al.*, 2013), *Hericium erinaceum* (Li Y., *et al.*, 2010); la lectine de l'*Agrocybe aegerita* (AAL) séparée par l'échangeuse d'ions et gel filtration (Jiang S., *et al.*, 2012), la BEL purifiée par Perduca M., *et al.* (2011) de *Boletus edulis* avec deux différentes méthodes basées sur la charge et l'affinité.

Les résultats de la purification obtenus durant notre travail sont similaires à ceux de Jean G., *et al.* (1991), qui ont purifié une lectine de la même espèce par une chromatographie d'affinité avec les membranes de stroma de globules rouges de type O, mais dans cette chromatographie, ils se sont confrontés à un problème de séparation du lactose par la dialyse à cause de la forte interaction biochimique, puis ils ont changé totalement la méthode par deux chromatographies successives se basent sur les interactions hydrophobes et l'exclusion moléculaire. La lectine a été alors obtenue avec un rendement d'activité égal à 96,5%, un indice de purification de 4,8 fois élevé de lui d'extrait brut et une SAc de 1762 UHA/mg de protéines.

Cette purification restera partielle et nécessite une chromatographie d'exclusion moléculaire afin d'éliminer le maximum des impuretés possibles dans la fraction obtenue par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-Sephacyl. L'obtention d'une lectine pure nécessite l'utilisation des techniques se basant sur la spécificité et le colonage moléculaire du gène codant pour cette dernière.

L'affinité moléculaire de la lectine aux sucres et glycoprotéines est l'une de méthodes de la séparation de cette classe protéique. Parfois, l'interaction de la lectine par le ligand est forte après l'élution ; ce qui crée un problème pour l'obtention d'une protéine pure, la raison pour

laquelle nous avons choisi la chromatographie échangeuse d'ions, le même problème a été déjà proposé par le chercheur Jean G et ces collaborateurs en 1991.

2. SDS-PAGE et PAGE

L'analyse par électrophorèse sur gel de 12 à 5% de polyacrylamide de la fraction agglutinante du P2 sous l'influence du détergent SDS et le β -mercaptoéthanol (figure 16, b) révèle que la lectine purifiée a une structure dimérique formée de deux unités hétérogènes de 18 et 19 kDa qui seraient liées par des liaisons non covalentes et de poids moléculaire total d'environ 37 kDa obtenu par la migration sur gel PAGE sans l'influence des détergents et agent réducteur (figure 16, a). Nos résultats sont similaires à ceux de Jean G., *et al.* (1991) qui ont purifié un lectine dimérique (A1B1) du même champignon avec une affinité pour le GalNAc et un même PM des deux unités liées par des liaisons non covalentes.

Plusieurs lectines fongiques à spécificité GalNAc possèdent une structure dimérique ou tétramérique dont les sous unités sont identiques ou hétérogènes. La lectine de *Polyporus adusta* est constituée de 2 sous unités de PM identique 12 kDa (Wang H., *et al.*, 2003) ; une autre molécule possède un PM de 31,6 kDa est constituée de deux sous unités hétérogènes a été caractérisée par Sun H., *et al.*, (2003) à partir des fruits d'*Agrocybe aegerita* après une purification sur une colonne chargée avec DEAE-sepharose suivie par une autre chromatographie d'exclusion moléculaire sur une colonne de Séphacryl-200.

3. Test d'HA et d'inhibition

L'hémagglutination des érythrocytes sanguins par les lectines est le caractère majeur de ces protéines. Grâce à lui, la détection de la présence dans les extraits protéiques de ces molécules est éventuellement possible et facile (Sharon N. et Lis H., 1998), mais ce test n'est pas toujours fiable pour la détection des lectines (Wang X., *et al.*, 2013) ; ce qui nécessitera d'autres tests se basant sur la spécificité biochimique des lectines tel que le test d'inhibition d'HA par les sucres (soit mono ou oligo ou polysaccharides) et les glycoprotéines qui est le plus fréquemment effectué pour confirmer la nature d'agglutination et l'affinité protéique et la technique basée sur l'interaction spécifique entre les lectines avec les puce à glycane (glycane- array).

Le résultat du test d'HA montre que la lectine purifiée du champignon *L. deliciosus* exerce une HA avec les RBC du lapin avec un titre élevé (tableau 7). De plus, nous avons observé que l'HA entre LDL et les différents groupes sanguins, est de titre faible et sans sélectivité vers un groupe sanguin spécifique ; ce qui indique que la protéine a une affinité avec les récepteurs membranaires des globules rouges du lapin élevée.

Les mêmes observations sont décrites par Jean G et ses collaborateurs (1991) sur le même champignon de la France, une étude sur la lectine du champignon *Polyporus squamosus* de structure dimérique montre qu'elle a interagit d'une manière non sélective avec les différents groupes sanguins: A, B, O et les RBC du lapin (Kobayashi Y., *et al.*, 2012). Dans des études précédentes, les lectines n'ont pas toujours une spécificité avec le sang humain que pour l'animal ceci est due à la différence de structure membranaire des globules rouges et l'expression des glycanes et sucres (Drickamer K., 1995) et la sélectivité de la lectine des glycanes membranaires (Mo H., *et al.*, 2000).

L'hémagglutination avec le sang humain n'augmentera que dans des cas exceptionnels notamment dans les changements des types de glycanes exprimés au niveau de la membrane plasmique du système ABO comme les leucémies, cancer du sang, cancer de la moelle osseuse. Dans d'autres expériences, le traitement des érythrocytes par une hydrolase (la trypsine ou la pronase et la neuramidase) augmentera l'hémagglutination grâce à la rupture de la liaison chimique (covalente) entre l'Ac Si et les glycanes de la membrane plasmique pour contribuer à la libération des fonctions hydroxyles et les groupements réduites de sucres portés sur ces glycoconjugués (Sharon N., 2007).

L'inhibition de HA par les trois sucres D (+) Gal, Méthyl- β -D-galactopyranoside et Lac montre que LDL possède une affinité pour le disaccharide D-lactose, car il a exercé une forte inhibition de l'HA à une MIC de 0,039 mM inférieure à celles du Gal et Méthyl- β -D-galactopyranoside: 5 et 2,5 mM respectivement (tableaux 8 et 9). L'inhibition par le Gal et son dérivé Méthyl- β -D-galactopyranoside et l'absence d'inhibition avec le Glc signifie que la LDL interagit avec le Gal et ces dérivés sélectivement qu'avec le Glc mais la stabilité de l'interaction augmente lorsque le Gal et Glc sont rassemblés pour former le lactose et que la conformation spatiale du complexe lectine-lactose possède probablement des liens plus stables que pour un monosaccharide.

L'absence d'inhibition avec les autres sucres testés s'interprète par l'absence d'affinité. Nos résultats sont similaires à ceux de Jean G., *et al*, (1991), à l'exception de l'inhibition par le D (+) Gal et N-Gal/HCl. En général, les lectines fongiques purifiées ont une spécificité pour les résidus Gal ou ces dérivés présentées dans l'antigène de Thomson Friedrich fortement exprimé dans certains cancers et anomalies cellulaires, comme l'ABL, BEL, PSL; ainsi que d'autres molécules de la famille des Galec, R-Type, Jacalin et Monocot Related (Kobayashi Y. et Kawagishi H., 2014).

L'inhibition d'HA avec les glycoprotéines (la fétuine (Fet) et la mucine porcine (PSM)) résulte de la présence de résidus de galactose à savoir le GalNAc et le lactose dans ces deux glycoprotéines qui sont fortement glycolysées et riches en N- et O- glycanes. Dans notre cas, l'inhibition avec ces deux glycoprotéines est plus forte que celle des sucres simples.

Sharon N. et Lis H. (1998) ont indiqué que l'inhibition avec les chaînes oligosaccharidiques libres ou combinées avec les protéines est de l'ordre de μM pour le coefficient d'association K_a comparé à celui de l'inhibition avec les monosaccharides ou disaccharides avec un ordre de mM. L'interaction protéine-ligand dépend des paramètres thermodynamiques de la protéine (l'énergie libre ΔG_0 , l'enthalpie et l'entropie), de la concentration des ligands spécifiques de la lectine dans ces glycoprotéines, de la structure 3D avec le domaine de reconnaissance CDR et de la mutarotation du groupe hydroxyle du sucre spécifique de la fonction réductrice portés sur la partie glycane.

3. Influence des facteurs physico-chimiques sur la stabilité protéique

La stabilité de l'activité des lectines sous l'influence de la salinité ou l'acidité du milieu et la variation de la température durant la saison de croissance des champignons dépend de leurs stabilités structurales. Le maintien de l'interaction (assurée grâce à la 3D) avec les glucides (libres ou combinés sur les glycoprotéines) favorise la communication entre le champignon et les bactéries symbiotiques ou les plantes. La déstabilisation ou la rupture de ces liens influence les propriétés physiques et les fonctions biologiques des lectines. Quiococho F.A. (1986) ; Gabius H.J., *et al*. (2011) ont constaté que la majorité des liaisons chimiques dominantes et responsables de l'homéostasie de l'interaction lectine-sucre sont les forces de van der Waals et les liaisons hydrogène.

La présence de groupements chimiques (COOH, OH, NH₂, etc....) dans les aa ionisables (positivement ou négativement) du CDR, plus fréquemment l'hydroxyle, a été associé à la variation du pH car chaque changement du pH du milieu induit l'ionisation de ces groupements puis la variation de la charge ionique de la lectine pour enfin influencer la force de l'interaction avec le ligand (Adenike K. et Eretan O.B., 2004). Cela contribuera à l'augmentation ou la diminution de l'activité de lectine (Utarabhand P. et Akkayanont P., 1995).

L'activité hémagglutinante de la LDL s'observe dans un intervalle de pH de 4 à 8 avec une diminution par rapport à l'activité initiale à pH 7,4. Au delà de cet intervalle, la protéine perd son activité. Durant la variation de la température entre 30-70 °C, l'activité reste conservée et disparaît à une température plus élevée (>70 °C).

Le traitement par l'agent chélateur EDTA 10 mM n'entraîne aucune influence sur cette activité ainsi que les cations testés. Notre lectine est similaire à certaines lectines fongiques qui exercent leurs activités aux pH de 4,5 jusqu'à 8,0 comme dans le cas de la lectine de *Pleurocybella porrigens* (Suzuki T., *et al.*, 2009) et dans des milieux à faible molarité de NaOH et HCl comme dans le cas de la lectine *Pholiota adiposa* (Zhang G.O., *et al.*, 2009).

L'ascomycète *Cordyceps militaris* produit une lectine avec une activité stable à pH 6 à 9 (Jung E.C., *et al.*, 2007). Cette stabilité dépend de la composition en aa et des conditions environnementales qui permettent aux champignons de se développer dans des milieux acides et basiques par la création des relations symbiotiques avec les plantes ou les bactéries du sol (Kaneko T., *et al.*, 1993 ; Jean G., *et al.*, 1997). Similaire à certaines lectines fongiques comme celle de *Polyporus adusta*, le titre d'HA est resté stable à 16 U dans l'intervalle thermique de 10 -70 °C et s'annule à des températures supérieures à 80 °C (Wang H., *et al.*, 2003). L'espèce *Russula delica* produit une lectine fonctionnelle à basse température 10-70 °C (Zhao S., *et al.*, 2010).

Des études menées sur la lectine d'*Agaricus bisporus* ont montré qu'elle est active même après un autoclavage de 15 min à 121 °C et induisent une immunomodulation par la régénération des ions nitrite et la production de marqueur d'inflammation TNF- α par les cellules immunitaires (Chang H.H., *et al.*, 2007).

L'absence d'effet du traitement par le sel d'EDTA et les cations sur l'activité HA signifie que la lectine LDL n'a aucun site de fixation pour les ions cationiques, donc elle n'est pas métalloprotéique. En adéquation avec les résultats de Jean G., *et al.* (1997), les espèces *L. deliciosus* et *L. determinus* produisent deux lectines ayant un PM de 37 kDa avec une spécificité pour NAcLac (Jean G., *et al.*, 1991; 1993), elles ne sont pas influencées par l'EDTA. La lectine isolée à partir des fruits du champignon *Polyporus adusta* agglutine les érythrocytes sans l'intervention des métaux dans le tampon et restera stable après l'incubation avec l'EDTA (Wang H., *et al.*, 2003).

Au contraire, notre lectine n'est pas activée ou inhibée par les métaux. L'ajout de métaux n'induit pas la diminution ou l'augmentation de l'activité hémagglutinante comme chez certaines lectines qui sont influencées par les cations. Ces derniers peuvent inhiber l'HA comme dans la lectine purifiée par Zhao S., *et al.* (2010) à partir de l'espèce *Russula delica* de PM 30 kDa et de spécificité pour l'inuline et l'O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. Son hémagglutination a été inhibée par les trois cations Al^{3+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} et réactivée par Mn^{2+} et Mg^{2+} .

La lectine de *Boletus edulis* purifiée par trois types différents chromatographiques exerce une hémagglutination en présence d' $AlCl_3$ et de $FeCl_3$ avec une concentration variant entre 1 et 10 mM. Les mêmes résultats obtenus par Zhang W., *et al.* (2014) sur l'influence du sel EDTA sur la lectine de *Stropharia rugosoannulata*, l'incubation de cations avec cette protéine pendant 60 min ; l'activité de la lectine reste stable après le traitement avec un titre de 64 U, à l'addition les métaux induisent une réduction de l'activité avec des concentrations de 1,25-10 mM par deux cations divalents Cd^{2+} et Hg^{2+} , les autres cations induisent une faible diminution d'HA à une dose de 10 mM, cette diminution est réversible avec la diminution de la concentration des cations divalents et trivalents.

Généralement, la résistance contre la salinité ou l'acidité, la thermostabilité de LDL peuvent jouer des rôles importants dans le cycle de vie durant la variation des conditions climatiques, la composition de la zone de croissance ; ce qui signifie l'appariation et la résistance du champignon dans un écosystème à humidité tolérée, une température moyenne et à un terrain sablonneux proche de la mer.

4. Activité immunomodulatrice

La stimulation ou la suppression des cellules du système immunitaire est l'une des activités les plus effectuées par les lectines. Plusieurs études et recherches approfondies ont été réalisées sur les mécanismes et les interactions probables avec les récepteurs cellulaires responsables de la réponse immunitaire par ces biomolécules (Van Kooyk Y. et Rabinovich G.A., 2008). Les différents résultats obtenus indiquent que l'interaction des lectines avec les épitopes glycosylés des récepteurs portés sur les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques ainsi les autres types cellulaires du système immunitaire régule ou active une série de signalisation (ou plusieurs) intra et intercellulaire (Cui B., *et al.*, 2017).

Dans notre étude, nous avons évalué le potentiel de la lectine de *Lactarius deliciosus* à induire une réponse immunitaire via l'activation de la phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial chez des souris Albinos Wistar blanches. La phagocytose est un mécanisme biologique qui agit pour éliminer les pathogènes et les composés nocifs de l'organisme ainsi que les cellules anormales. Ce processus fonctionne lorsque les cellules détectent des particules pathogènes (Stuart L.M. et Ezekowitz R.A.B., 2005). La réalisation de cette procédure immunologique est associée aux cellules phagocytaires appelées «professionnelles» vis-à-vis du développement de la machinerie effectrice et moléculaire (Nakanishi Y., *et al.*, 2011) ayant un rôle dans la neutralisation des cellules mortes et les cellules infectées.

Chez les organismes supérieurs, la machinerie phagocytaire professionnelle comprend deux catégories cellulaires effectrices de la phagocytose: les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et le système monocyte phagocytaire MPS constitué de macrophages, des éosinophiles, des ostéoclastes et de cellules dendritiques (Rabinovitch M., 1995). Toutes ces cellules ont été stimulées par de nombreuses molécules via des voies de signalisation. L'activation de ces cellules contribue à la production de réponse immunologique contre le corps pathogène (Siamon Gordon S., 2016).

La mesure de l'activité phagocytaire chez les animaux du laboratoire est l'une des méthodes appliquées dans l'évaluation des drogues immunomodulatrices. Ces dernières ciblent les macrophages directement et l'activation des macrophages et des autres cellules phagocytaires permet de filtrer les particules exogènes et endogènes ayant un potentiel pathogène à partir de la circulation sanguine ; ainsi s'initie une réponse immunitaire innée, et

développe une réponse adaptative chez les animaux (Normann S.J. et Benditt E.P., 1965 ; Nakanishi Y., *et al.*, 2011).

Le test de clairance de carbone est plus utile *in vivo* pour mesurer l'activité phagocytaire du système RE par la cinétique de la vitesse d'élimination des particules du carbone colloïdal circulant au niveau systémique. La neutralisation de ces particules s'effectue sous l'intervention des composants du système RES principalement la rate (sinus splénique 'les cellules du spleen'), le foie (les phagocytes ou les cellules de kuppfer), les monocytes du sang, les macrophages, les organes lymphocytaires secondaires, les os, la moelle osseuse, les poumons, les glandes surrénales et l'hypophyse. Ce système représente la première barrière de défense immunologique (Normann S.J. et Benditt E.P., 1965 ; Moreland L.W., 2004).

Une diminution de concentration des particules de carbone suivie par une augmentation de l'indice phagocytaire indique une sensibilisation du système phagocytaire ou du SRE principalement les macrophages et les cellules d'immunité non spécifique. Lors d'une administration des particules de carbone (l'ancre de chine) par injection directe dans la circulation sanguine par voie IV, la vitesse d'élimination ou la clairance de ces particules par les macrophages est exponentielle (Biozzi G., *et al.* 1953, 1970). Le recrutement et l'induction des macrophages pour digérer les particules de carbone colloïdal ou particules inertes sont renforcés par les immunoglobulines et la fraction fixée du complément C3b qui favorisent l'opsonisation de ces substances (Jaffe C.J., *et al.*, 1978 ; Benmebarek A., *et al.*, 2013).

La rate et le foie jouent un rôle crucial dans le contrôle et la détection du changement dans la concentration sanguine de certains composants biochimiques et la régulation du cycle de vie des cellules sanguines. Ils neutralisent des particules toxiques qui circulent dans le sang et d'autres agents pathogènes avec leur RES. Ces organes ont une capacité de forcer le système immunitaire et de protéger le corps. Le RES de ces tissus contient un complexe cellulaire: les leucocytes polymorphonucléaires et les phagocytes mononucléaires. En cas d'induction de ces cellules par la lectine et d'autres agents immunomodulateurs, des particules colloïdales de carbone dans le sang sont détectées par ce système après le contrôle du sang par le foie et la rate.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de l'indice phagocytaire K et l'activité phagocytaire corrigée α est corrélée avec l'augmentation de la dose de LDL injectée chez les souris $p < 0,0001$. Cet effet immunomodulateur atteint un niveau maximal chez le groupe traité par une dose de 10 mg/kg comparé avec le groupe témoin et les autres groupes traités par la LDL $p < 0,0001$ (tableau 12). Au delà de cette dose, l'activité phagocytaire a diminué. L'augmentation de l'activité phagocytaire n'est pas associée à l'augmentation du poids corporel mais probablement à l'augmentation de l'activité tissulaire du système réticulo-endothélial, essentiellement le foie et la rate.

Ces résultats ont suggéré que la lectine purifiée active l'immunité innée par la stimulation des macrophages, et l'activité des neutrophiles dans la rate et le foie pour éliminer le carbone colloïdal dans le sang par la pinocytose et l'opsonisation de cet antigène. Cette capacité peut réduire leur fonction d'adhérence (l'agglutination), la structure biochimique et l'affinité d'interagir avec le récepteur cellulaire dans les macrophages et les neutrophiles du SRE de la rate et des tissus hépatiques. L'interaction entre le CDR de LDL avec le galactose et ses dérivés exposés sur le récepteur membranaire des macrophages et des neutrophiles induisent leur recrutement et activation pour éliminer les particules colloïdales de carbone.

Il a été précédemment rapporté que certaines familles de lectines comme les galectines induisent un effet immunomodulateur dans les cellules humaines et animales par leur interaction avec le galactose et ses dérivés dans la partie glycoconjuguée des récepteurs membranaires des cellules immunitaires et des voies de signalisation activées.

Liu F., *et al.* (2005) ont constaté que la lectine extraite de *Tricholoma mongolicum* administrée par voie intrapéritonéale chez la souris, induit la modulation des cytokines et la régulation de l'expression des gènes dans les macrophages et les splénocytes. Ces effets sont assurés par l'interaction de lectine avec les récepteurs de cellules et le contrôle des voies de signalisation. Dans une semblable étude, Ditamo Y. *et al.* (2015) ont montré que la lectine d'*Agaricus bisporus* a des spécificités pour les dérivés du Gal portés par l'antigène de Thomsen-Friedenreich (GalNAc α Ser/Thr), et le GlcNAc. Ils ont également montré que l'effet immunomodulateur résulte de l'activation des macrophages, et des lymphocytes via leurs interactions avec ses glycoprotéines membranaires.

Dans d'autres expériences, Ma L.B., *et al.* (2017) ont montré que la lectine recombinante d'*Agrocybe aegerita* possède un effet immunomodulateur lorsqu'elle est utilisée comme adjuvant injecté chez des souris contre le virus de la grippe aviaire H9N2 par la régulation des gènes participant à l'adhérence cellulaire, l'activation des lymphocytes de la rate et la migration transmembrane des tissus systémiques et infectés. L'effet immunomodulateur d'AAL sur le système immunitaire est assuré par la chimiotaxie et l'activité phagocytaire des neutrophiles, des leucocytes et des macrophages pour améliorer l'immunité innée et la présentation d'antigène.

1. Caractérisation de la lectine du champignon *L. sulphureus*

1.1. Purification de PSLec

La PSLec purifiée à partir de *L. sulphureus* souche TMES43 caractérise par une SAc et un indice de purification fortement élevés comparé à ceux de l'extrait brut indiqués dans le tableau 16. En se base sur la spécificité et les propriétés physico-chimiques des lectines (pH, l'influence des cations sur l'interaction protéine-ligand), ces étapes de séparation suivies ont donné des résultats similaire avec celles expliquées dans les études de Tateno H., *et al.*, (2003) ; Kanska G., *et al.*, (1994), qu'ils ont trouvé chez la même espèce deux lectines de structures différentes, elles ont été purifiées par la même chromatographie.

De plus, le test d'inhibition d'HA (tableau 13) nous a donné une inhibition initiale sur l'extrait brut et une autre finale par le Lac après la chromatographie d'affinité. Nous avons observé que le galactose peut servir dans l'élution de PSLec. La raison pour notre choix de ce Sepharose 4B a été déterminée grâce à cette inhibition, aussi l'utilisation de ce gel pour purifier de plusieurs lectines spécifiques pour le Lac et ces dérivés, grâce à leurs interactions avec l'enchaînement saccharidique suivant «Gal β 1,4 [3,6]-anhydro-L-galactose» présenté dans ce gel. Récemment, une nouvelle lectine a été purifiée par Wang Y., *et al.* (2018) sur la même résine à partir le même champignon *L. sulphureus*, spécifique pour les anomères α et β du Lac et un PM de 52,0 kDa).

1.2. Détermination du poids moléculaire, MALDI- MS et la spécificité saccharidique

La lectine PSLec constitue deux monomères de PM supérieur à 35 kDa et une autre 18 kDa comme l'électrophorèse SDS-PAGE nous indique (figure 23, a), une seule bande de PM de 140 kDa a été observé dans les conditions natives PAGE (figure 23, b). PSLec purifiée possède un PM similaire de celle isolée par Tateno H., *et al.* (2003), mais avec une précision du PM et une structure homo-tétramérique ont été confirmées par le MS-MALDI.

Ces résultats ont été confirmés par la spectrométrie de masse ; mais cette dernière révèle un seul pic de PM 35,904 kDa (figure 24), ce qu'elle nous a donné une information globale sur la structure protéique et interprète la présence de la petite sous unité 18 KDa qui due probablement à la dénaturation de la grande sous unité. Dans une autre expérimentation, où la température d'ébullition et le temps d'incubation (> 10 min) ont augmenté dans la

dénaturation de la lectine, nous avons remarqué la dégradation totale de la grande sous unité, et elle a donné la bande de 18 kDa.

Des études précédentes sur la dénaturation des protéines ont observé que l'augmentation de la température plus le temps d'incubation influencent la dénaturation, et elles donnent des bandes différentes d'une protéine soient dimérique ou multimérique cas de la BSA (Aoki K., *et al*, 1969). Ce qu'elles expliquent la cause d'apparition de la petite bande 18 KDa dans l'électrophorèse SDS-PAGE et une seule bande 180 KDa en gel PAGE, et montrent la structure tétramérique de PSLec obtenue.

En accordance avec ces résultats, le test d'inhibition avec les sucres et les glycoprotéines (tableau 17, figure 25) montre une similarité avec les résultats fournis par les trois études scientifiques cités précédemment, car seul le lactose qu'il est capable de réduire l'activité HA de notre molécule avec les érythrocytes du lapin. Suite à ces données, nous concluons que ce champignon produit des lectines spécifiques pour le lactose ou ses dérivés et pas une autre spécificité saccharidique.

Les études structurales fournies par Tateno H., *et al*. (2003) ; Angulo I., *et al*. (2011) montrent que l'interaction avec le lactose plus ces dérivés sera assurée par le domaine β présenté dans l'extrémité N-terminale, où il existe une séquence consensus (QXW)₃-like motif, elle ressemble avec celle présenté dans la famille lectines végétales ribosome inactivating protéine II RIP-II et les toxines bactériennes, ce motif à la fonction d'interagir avec les chaînes β -linked galactose, similairement avec les résultats publiés par Kanska G., *et al*, 1994, la première lectine purifiée de cette espèce exerce une hémagglutination et une hémolyse des hématies ces deux fonctions ont été inhibées par le lactose et l'antigène de Thomsen-Friedenreich (Anti-T).

1.3. Stabilité de l'activité protéique

La stabilité de PSLec dans les différents pH et les températures sont moyennes à faible degré (figure 26), ont été réduites à la composition des acides aminés, à la structure 3D et à l'influence des conditions environnementales dans l'expression des gènes protéiques. Ils ont été signalés que ce champignon saprobie pousse en saison froide par le parasitisme sur les arbres (Khatua S., *et al*, 2017).

Comme nous avons discuté dans le chapitre précédent, la présence des groupements chimiques dans les acides aminés du CDR potentiellement ionisables positivement ou négativement, fréquemment le groupement hydroxyle responsable à l'interaction aux liaisons N- ou O- osidiques avec le sucre sera influencé par la variation du pH, chaque changement du pH du milieu (l'acidité ou la salinité) induit l'ionisation de ces groupements puis la variation de la charge ionique de la lectine et influencera la force de l'interaction avec le ligand (Adenike K., et Eretan O.B., 2004).

Les résultats du tableau 15 et la figure 27 montrent que le traitement par l'EDTA démunie l'activité HA, il signifie que la PSLec est sensible aux agents chélateurs et qu'elle contient un site de fixation des ions métalliques, ce qu'il interprète l'augmentation d'HA après l'incubation aux différents cations Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} de PSLec traitée par l'EDTA. Selon les résultats obtenus, nous suggérons que la souche *L. sulphureus* TMES43 synthétise une lectine métallo-dépendante à une spécificité au Lac comme la lectine POL spécifique pour le Me- α -GalNAc du champignon *Pleurotus ostreatus* (Kawagishi H., *et al*, 2000).

Par contre, certaines lectines fongiques ont une sensibilité contre les ions métalliques, le cas de la lectine de *Pleurotus adusta* qu'elle a été stimulée par 10 mM de Fe^{3+} et non pour les autres ions ; les cations ZnCl_2 et MnCl_2 réduisent l'activité HA de la lectine de *T. mongolicum* (Wang H.X., *et al*, 1995). Dans d'autres cas, Les cations CaCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 et MgCl_2 n'ont pas affecté l'activité hémagglutinante d'*Amanita pantherina* (Zhuang C., *et al*, 1996), *G. frondosa* (Kawagishi H., *et al*, 1990) et *H. erinaceum* (Li Y., *et al*, 2010).

2. Etude protéomique

Les résultats de la recherche de l'empreinte peptidique (peptid fingerprint research, tableau 16) par Mascote améliorent le fait que PSLec purifiée n'a aucune similitude avec les autres lectines et spécialement les lectines fongiques, la recherche sur les empreintes digitales peptidique par Mascote a montré une forte similitude des fragments peptidiques de PSLec avec score de 43 avec ceux de la protéine liée à l'autophagie 16 de *Meyerozyma guilliermondii* à 19475 kDa du PM.

Cette empreinte sert à déterminer la séquence protéique et à la recherche des protéines homologues avec notre PSLec basée sur le rapprochement moléculaire notamment le PM et le site de digestion des chaînes peptidiques obtenues expérimentalement avec ceux enregistrés précédemment dans la base de données Swiss-Prot fragmentés théoriquement, la fiabilité des

calculs est reliée avec la qualité du score obtenu à $p < 0,05$ (où le score calculé est correspondu à une probabilité de 95% pour que la protéine identifiée ne soit pas matchée aléatoirement) (Perkins N.D., *et al.*, 1999). Ces études ont confirmé que la lectine purifiée PSLec est une nouvelle molécule de composition différente de celles des lectines fongiques.

3. Activité cytotoxique

La présente étude a montré que PSLec induit une activité cytotoxique élevée observée dans l'essai de viabilité de cellules de MTT (figure 29). Elle peut jouer aussi un rôle important dans la réaction parasitaire des champignons pour assurer sa prédominance dans leurs écosystèmes. Selon les résultats de Kanska G., *et al.*, 1994 et Tateno H., *et al.*, 2003 et Mancheño J.M., *et al.*, 2005, les lectines isolées de *L. sulphureus* exècrent une activité hémolytique mettant en jeu leurs domaines toxiques similaires aux toxines bactériennes de type aérolysine et le domaine Ricin β Like de certaines lectines végétales toxiques.

Ils ont été prouvés que le PLS et le LSL induisent l'hémagglutination et l'effet hémolytique en même temps, où la lyse des cellules a résulté de la fonction du module β -trèfle de LSLa responsable à la formation des pores membranaires (PFM), qui contient deux domaines structuraux et fonctionnels. L'un possède une séquence consensus semblable avec de certaines lectines végétales précisément la famille ribosome inactivating protéine II (RIP-II), qui assure l'adhésion cellulaire et le blocage de la synthèse des protéines par l'inhibition de l'activité ribosomale, le second induit la formation de pores membranaires et l'osmose similairement à la famille aérolysine des toxines bactériennes de structure tertiaire de forme β -baril (Mancheño J.M., *et al.*, 2005, Angulo I., *et al.*, 2011).

Le mécanisme de la cytotoxicité résulte de la translocation membranaire de la première chaîne peptidique comprend le domaine RIP-II, mais après la formation des pores membranaires par le domaine β -trèfle (PFM), qu'il contient un motif peptidique $(QXW)_3$ responsable à l'adhésion avec les chaînes saccharidiques β -galactosylés exprimées dans le récepteur de type glycosyl phosphatidylinositol (GPI-anchored protein) situées dans les membranes des cellules animales et humaines, et la fixation de la cellule bactérienne ou fongique dans notre cas (Mancheño J.M., *et al.*, 2005, Angulo I., *et al.*, 2011).

Cette adhérence permet à la création des pores dans la membrane suivie par la translocation du domaine RIP-II (Iacovache I., *et al.*, 2011), ce dernier exerce une fonction catalytique 'enzymatique' permet de dégrader ou bloquer la fonction ribosomique (la machinerie traductrice des ARNm, l'arrêt de la synthèse protéique) dans les cellules hôtes, et initie ensuite la lyse cellulaire. Mais le mécanisme n'a pas bien déterminé jusqu'à présent (Podobnik M., *et al.* 2017).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons étudié les lectines d'origine fongique, en particulier, les basidiomycètes de la flore algérienne en raison de leur richesse et de l'absence des travaux sur ces lectines au niveau algérien. Deux lectines ont été isolées et caractérisées par différentes techniques utilisées dans les études biochimiques et protéomiques.

L'une possède une structure dimérique avec un poids moléculaire de 37 kDa et présente une spécificité pour le Gal ou ses dérivés, une affinité pour le lactose et pour deux glycoprotéines N et O glycosylées : la fétuine et la mucine. Cette lectine est dénommée LDL et est purifiée à partir de *Lactarius deliciosus* souche TMES25 (récoltée au niveau du Park national El- Kala, Wilaya de Taref) par une chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sephacyl.

Le test de la clairance de carbone a montré que cette LDL induit une réponse immunostimulante des macrophages et des neutrophiles du système réticulo-endothélial au niveau des organes périphériques tels que le foie et la rate par l'augmentation de leurs activités phagocytaires chez les souris Swiss Albinos Wistar après leur exposition aux particules de carbone colloïdal par voie intraveineuse avec des doses ne dépassent pas 10 mg/kg.

La deuxième lectine PSLeC a été obtenue après purification de la fraction protéique de l'extrait liquide du champignon *Laetiporus sulphureus* souche TMES25 (signalé être rare en Afrique). En utilisant la chromatographie d'affinité sur le Sepharose®4B, assisté par FPLC. L'électrophorèse PAGE a révélé que son poids moléculaire approximatif était de 140 kDa, et l' SDS-PAGE a montré qu'elle était constituée de quatre monomères de 36 kDa et un poids précis pour chacune d'elles de 35904,703 Da selon le MALDI-MS.

Cette lectine exerce une activité hémagglutinante et une autre hémolytique inhibées par le lactose. Elle a une stabilité à pH alcalin et aux basses températures. C'est une métallo-dépendante qui nécessite la présence des cations métalliques CaCl_2 , MgCl_2 et ZnCl_2 . Sa composition en acides aminés est proche de celle de la protéine liée à l'autophagie 16 de *Meyerozyma guilliermondii* qui a un PM de 19475 Da analysée par l'outil bioinformatique Mascot peptid fingerprint research.

Selon les résultats obtenus, la lectine PSLeC n'a aucune similarité avec les autres lectines fongiques ; ce qui indique qu'elle pourra être probablement une nouvelle lectine. À l'examen préliminaire, sur son influence sur la croissance des lignes cellulaires tumorales et normales par le test de viabilité cellulaire, la lectine PSLeC induit une cytotoxicité pour les lignées cellulaires utilisées A375 et NHEM qui pourra intervenir dans la protection du champignon ou la production des biopesticides contre les agents mycopathogènes

Perspectives

Les mécanismes d'action des deux lectines LDL et PSLeC n'ont pas été complètement bien défini, nous espérons de mettre des nouvelles études explicatives sur :

- La structure 3D et les séquences protéiques.
- La détermination des acides aminés du domaine de reconnaissance saccharidique CDR.
- L'utilisation de lectines purifiées dans les domaines médicaux : le groupage sanguin, le suivi des infections et maladies cancéreuses.
- L'évaluation de leurs potentiels antiviraux contre le VIH, les virus phytopathogènes.

Références bibliographiques

A

Adenike, K., & Eretan, O. B. (2004). Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **37**(2): 229-233.

Ahmed, H., & PhD, H. A. (2005). *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization* (p. 19). New York: CRC press.

Akkouh, O., Ng, T. B., Singh, S. S., Yin, C., Dan, X., Chan, Y. S., ... & Cheung, R. C. F. (2015). Lectins with anti-HIV activity: a review. *Molecules*, **20**(1): 648-668.

Alencar, N. M. N., Oliveira, R. S. B., Figueiredo, J. G., Cavalcante, I. J. M., Matos, M. P. V., Cunha, F. Q., ... & Ramos, M. V. (2010). An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflammation research*, **59**(4): 245-254.

Alley, M.C, Scudiero D.A, Monks, A., Hursey, M.L, Czerwinski, M.J, Fin,e D.L, ... & Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*, **48**(3): 589-601.

André S., Kaltner H., Manning J. C., Murphy V. P., and Gabius H. J. (2015). Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules*, **20**: 1788-1823.

Angulo, I., Acebrón, I., de Las Rivas, B., Muñoz, R., Rodríguez-Crespo, I., Menéndez, M., ... & Mancheño, J.M. (2011). High- resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile β -trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Glycobiology*, **21**(10): 1349-1361.

Aoki, K., Hiramatsu, K., Kimura, K., Kaneshina, S., Yoshitoyo, N., & Sato, K. (1969). Heat denaturation of bovine serum albumin. I: Analysis by acrylamide-gel electrophoresis (commemoration issue dedicated to professor Rempei Gotoh on the occasion of his retirement).

B

Bâ, A., Duponnois, R., Diabaté, M., & Dreyfus, B. (2011). *Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l'Ouest: méthodes d'étude, diversité, écologie, utilisation en foresterie et comestibilité*. IRD Editions.

Bahi, A., Necib, Y., Merouane, F., Bouadi, H., & Boulahrouf, K. (2016). Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial Properties of new lectins purified from roots of Algerian Plants: *Morusnigra*, *Rutagraveolens*, *Cyperusrotundus* and *Pistacialentiscus*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 39-53.

Benkeblia, N. (2015). Ganoderma lucidum polysaccharides and Terpenoids: profile and health benefits. *J Food Nutr Diet*, 1: 1-6.

Berbee, M. L., & Taylor, J. W. (2001). Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In *Systematics and evolution* (pp: 229-245). Springer.

Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Decreusefond, C., Corradetti, A., Verolini, F.,... & Ventura, A. (1970). Effect of vaccination with irradiated Plasmodium berghi on the phagocytic activity of the reticulo endothelial system during plasmodium infection of the rat. *Bulletin of the World Health Organization*, 42(1): 163-168.

Bon, M. (2004). *Champignons de France et d'Europe occidentale*. Flammarion.

Bovi, M., Carrizo, M. E., Capaldi, S., Perduca, M., Chiarelli, L. R., Galliano, M., & Monaco, H. L. (2011). Structure of a lectin with antitumoral properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*, 21(8): 1000-1009.

Bovi, M., Cenci, L., Perduca, M., Capaldi, S., Carrizo, M. E., Civiero, L.,... & Monaco, H. L. (2013). BEL β -trefoil: A novel lectin with antineoplastic properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*, 23(5): 578-592.

Bozdoğan, A., Ulukanlı, Z., Bozok, F., Eker, T., Doğan, H. H., & Büyükalaca, S. (2018). Antioxidant potential of *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus* from Amanos Mountains.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**(1-2): 248-254.

Bronte, V., Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, **39**(5): 806-818.

C

Caron, M., Sève, A. P. (Eds.). (2003). *Lectins and pathology*. CRC Press.

Chaboud, A. (2013). Impact de l'approche moléculaire sur la classification systématique des Agaricomycetidae. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier.

Chang, H. H., Chien, P. J., Tong, M. H., & Sheu, F. (2007). Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability. *Food chemistry*, **105**(2): 597-605.

Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The plant cell*, **3**(1): 1-9

Christian, O. W. W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Enolase. *Biochem. Zeit*, **310**: 384-396.

Ciollant, M., Cuillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., & Didier, E. (1993). Characterization of a Lectin from *Lactarius deterrimus*. *Plant Physiol*, **101**: 513-522.

Cornelissen, L. A., & Van Vliet, S. J. (2016). A bitter sweet symphony: immune responses to altered O-glycan epitopes in cancer. *Biomolecules*, **6**(2): 26.

Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., & Megías, C. (2012). Hemagglutinating activity of polyphenols extracts from six grain legumes. *Food and chemical toxicology*, **50**(6): 1951-1954.

Cubeta, M. A., Echandi, E., Abernethy, T., & Vilgalys, R. (1991). Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology*, **81**(11):1395-1400.

Cui, B., Li, L., Zeng, Q., Lin, F., Yin, L., Liao, L.,... & Wang, J. (2017). A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *Journal of natural medicines*, **71**(2): 409-421.

Dan, X., Liu, W., & Ng, T. B. (2016). Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. *Medicinal research reviews*, **36**(2): 221-247.

D

Davoli, P., Mucci, A., Schenetti, L., & Weber, R. W. (2005). Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Phytochemistry*, **66**(7): 817-823.

Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., & Jones, K. M. (2002). *Data for biochemical research*, **3**. Clarendon Press.

De Schutter, K., Van Damme, E.J. (2015). Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. *Molecules*, **20**(5):9029-53.

Ditamo, Y., Rupil, L. L., Sendra, V. G., Nores, G. A., Roth, G. A., & Irazoqui, F. J. (2016). In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Food & function*, **7**(1): 262-269.

Drickamer, K. & Taylor, M. E. (1993) Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell Biol.* **9**: 237-264.

Drickamer, K. (1995). Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Nature structural biology*, **2**(6): 437-439.

Dubois, M., Gill, K.A., Hamilton J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1958). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *J. Anal. Chem.*, **28**: 350-356.

E

Easton, R., Leader, T. (2011). Glycosylation of proteins—structure, function and analysis. *Life Sci Tech Bull*, **60**: 1-5.

Esko, J. D., Sharon, N. (2009). Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. In *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

F

Feng, K., Liu, Q. H., Ng, T. B., Liu, H. Z., Li, J. Q., Chen, G., ... & Wang, H. X. (2006). Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteovirens*. *Biochemical and biophysical research communications*, **345**(4): 1573-78.

Franco, A.R., Oliveira, R.S. and Castro, P.M.L. (2013). *Lactarius deliciosus* isolate Ldel 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF482484>.

Freeze, H. H., & Elbein, A. D. (2009). Glycosylation precursors. In *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Fujimoto, Z., Tateno, H., & Hirabayashi, J. (2014). Lectin structures: classification based on the 3-D structures. In *Lectins* (pp. 579-606). Humana Press, New York, NY.

G

Gabius H. J., André S., Jiménez-Barbero J., Romero A and Solís D. (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Cell pres*, **36**(6): 298-313.

Gabius, H. J., & Gabius, S. (Eds.). (2012). *Lectins and glycobiology*. Springer Science & Business Media.

Gardes, M., Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, **2**(2): 113-118.

Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current opinion in biotechnology*, **26**: 162-173.

Gokhale, A. B., Damre, A. S., & Saraf, M. N. (2003). Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyrea speciosa*. *Journal of ethnopharmacology*, **84**(1): 109-114.

Goldstein, I. I., & Poretz, R. D. (2012). Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of Iectins. *The lectins. Properties, functions, and applications in biology and medicine*, p: 233-247.

Gorelik, E., Galili, U., and Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **20**: 245-277.

Guillot, J., & Konska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**(3): 203-230.

Guillot, J., Giollant, M., Damez, M., & Dusser, M. (1991). Isolation and characterization of a lectin from the mushroom, *Lactarius deliciosus*. *The Journal of Biochemistry*, **109**(6): 840-845.

Guillot, J., Guerry, M., Konska, G., Caldefie-Chezet, F., de Latour, M., & Penault-Llorca, F. (2004). Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bulletin du cancer*, **91**(2): 141-158.

H

Halpern, B. N., Benacerraf, B., & Biozzi, G. (1953). Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system: I: the effect of the ingredients present in India ink and of substances affecting blood clotting in vivo on the fate of carbon particles administered intravenously in rats, mice and rabbits. *British journal of experimental pathology*, **34**(4): 426.

Hamid, R., Masood, A., Wani, I. H., & Rafiq, S. (2013). Lectins: proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3**(4): S93-S103.

Han, C.H., Liu, Q.H., Ng, T.B., Wang, H.X. (2005). A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **336**: 252–257.

Hassan, M.A.A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T. W., & Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International journal of molecular sciences*, **16**(4): 7802-7838.

He, M., Su, D., Liu, Q., Gao, W., & Kang, Y. (2017). Mushroom lectin overcomes hepatitis B virus tolerance via TLR6 signaling. *Scientific reports*, **7**(1): 1-11.

Hibbett, D. S. (1996). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Molecular Biology and Evolution*, **13**(7): 903-917.

Himansha, S., Sarathi, S. P. (2012). Insight of Lectins—A review. *Int'l J. Scientific and Eng. Research*, **3**(4): 1-9.

Ho, J.C.K., Sze, S.C.W., Shen, W.Z., & Liu, W.K. (2004). Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1671**(1-3): 9-17.

Hol, W. G., Sixma, T. K., & Merritt, E. A. (1995). Structure and function of *E. coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin B pentamer. *Bacterial toxins and virulence factors in disease. Marcel Dekker, Inc., New York, NY*: pp 185-223.

I

Iacovache, I., Degiacomi, M. T., Pernet, L., Ho, S., Schiltz, M., Dal Peraro, M., & van der Goot, F. G. (2011). Dual chaperone role of the C-terminal propeptide in folding and oligomerization of the pore-forming toxin aerolysin. *PLoS Pathog*, **7**(7): e1002135.

Imberty, A., Mitchell, E. P., & Wimmerová, M. (2005). Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current opinion in structural biology*, **15**(5): 525-534.

Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E. P., & Gilboa-Garber, N. (2004). Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infection*, **6**(2): 221-228.

Jaffe, C. J., Vierling, J. M., Jones, E. A., Lawley, T. J., & Frank, M. M. (1978). Receptor specific clearance by the reticuloendothelial system in chronic liver diseases: Demonstration of defective C3b-specific clearance in primary biliary cirrhosis. *The Journal of clinical investigation*, **62**(5): 1069-1077.

J

Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Pan, Y., Gu, B,... & Sun, H. (2012). A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochemical Journal*, **443**(2): 369-378.

Jung, E. C., Kim, K. D., Bae, C. H., Kim, J. C., Kim, D. K., & Kim, H. H. (2007). A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1770**(5): 833-838.

K

Kaneko, T., Oguri, S., Kato, S. I., & Nagata, Y. (1993). Developmental appearance of lectin during fruit body formation in *Pleurotus cornucopiae*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **39**(1): 83-90.

Kawagishi H., Suzuki H., Watanabe H., Nakamura H., Sekiguchi T., Murata T., et al. (2000). A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake- suppressing substance. *Biochim Biophys Acta*. **1474**(3):299-308.

Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A., & Chiba, S. (1990). Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1034**(3): 247-252.

Khaled, B., Fateh, M., Lamia A., Billel, M., Youcef, N., Abderrahmane, B. (2014). Immunomodulatory activity of intracellular crude, extracted from *Nocardopsis dassonvillei*. *Int J Pharm Sci Rev Res*, **24**(2):79-82

Khatua, S., Ghosh, S., & Acharya, K. (2017). *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. as food as medicine. *Pharmacognosy Journal*, **9**(6s).

Kobayashi, Y., & Kawagishi, H. (2014). Fungal lectins: a growing family. In *Lectins*. (pp. 15-38). Humana Press, New York, NY.

Kobayashi, Y., Tateno, H., Dohra, H. *et al.* (2012). A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J Biol Chem*, **287**:33973–33982.

Konska, G. (2006). Lectins of higher fungi (Macromycetes)-their occurrence, physiological role, and biological activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **8**(1).

Konska, G., Guillot, J., Dusser, M., Damez, M., & Botton, B. (1994). Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. *The Journal of Biochemistry*, **116**(3): 519-523.

Kumar, K. K., Chandra, K. L. P., Sumanthi, J., Reddy, G. S., Shekar, P. C., & Reddy, B. V. R. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of orofacial sciences*, **4**(1), 20.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259): 680-685.

Lai G., Chen D., Guo Y., Tang X. Shuai O., Yong T., ... & Yang B. B. (2019). Alcohol extracts from *Ganoderma lucidum* delay the progress of Alzheimer's disease by regulating DNA methylation in rodents. *Frontiers in Pharmacology*, **10**: 272.

Lam, S.K., Ng, & T.B. .2011. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 45–55.

Lee, R.T., & Lee, Y.C. (2000). Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate Journal*, **17**: 543-551.

Li, Y., Zhang, G., Ng, T. B., & Wang, H. (2010). A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Li, Y.R., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**: 51–57.

Lichtenstein, R. G., & Rabinovich, G. A. (2013). Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death & Differentiation*, **20**(8): 976-986.

Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews*, **98**(2): 637-674.

Liu, F., Ng, T.B., Wang, H., Fung, M.C., Ooi, V.E.C. (2005). Lectin from *Tricholoma mongolicum* S. Imai (Agaricomycetideae) mycelia stimulates gene expression of immunomodulating cytokines in mouse peritoneal macrophages and splenocytes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **7**(12): 243-48.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Protein glycosylation in the ER and Golgi complex. In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. WH Freeman.

Loizides, M.I.C.H.A.E.L. (2017). Diversity of wood-inhabiting aphylophoraceous basidiomycetes on the island of Cyprus. *Mycotaxon*, **132**: 985-986.

Lutsik-Kordovsky, M. D., Stasyk, T. V., & Stoika, R. S. (2001). Analysis of cytotoxicity of lectin and non-lectin proteins from Amanita mushrooms. *Exp Oncol*, **23**: 43-45.

M

Ma, L.B., Xu, B.Y., Huang, M., Sun, L.H., Yang, Q., Chen, Y.J., Yin, Y.L., He, Q.G., Sun, H. (2017). Adjuvant effects mediated by the carbohydrate recognition domain of *Agrocybe aegerita* lectin interacting with avian influenza H9N2 viral surface glycosylated proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*, **18**(8): 653-61.

Mancheño, J. M., Tateno, H., Goldstein, I. J., Martínez-Ripoll, M., & Hermoso, J. A. (2005). Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological chemistry*, **280**(17): 17251-17259.

Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2016). Impact of spent mushroom substrates on the fate of pesticides in soil, and their use for preventing and/or controlling soil and water contamination: a review. *Toxics*, **4**(3): 17.

Merritt, E. A., & Hol, W. G. (1995). AB5 toxins. *Current opinion in structural biology*, **5**(2): 165-171.

Merouane, F., Zerizer, H., Boulehrouf, Khaled., Necib, Y., & Boulehrouf, A. (2015). Immunostimulatory activity of intracellular lectin extract from actinomycete *Micromonospora aurantiaca*. *Int J Toxicol Pharmacol Res*, **7**(6): 264-8.

Mo, H., Winter, H. C., & Goldstein, I. J. (2000). Purification and characterization of a Neu5Aca₂-6Gal β 1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(14): 10623-10629.

Moothoo, D. N., Canan, B., Field, R. A., & Naismith, J. H. (1999). Man α 1-2 Man α -OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. *Glycobiology*, **9**(6): 539-545.

Moreland L.W. (Ed). (2004). Reticuloendothelial system. In *Rheumatology and Immunology Therapy*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Moremen, K. W., Tiemeyer, M., & Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, **13**(7): 448-462.

Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A..... & García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, **130**(2): 350-355.

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1989). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Recombinant DNA Methodology* (pp. 189-204). Academic Press.

Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, **8**(19): 4321-4326.

N

Nakamura-Tsuruta, S., Kishimoto, Y., Nishimura, T., & Suda, Y. (2008). One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nanoparticles. *Journal of biochemistry*, **143**(6): 833-839.

Nakanishi, Y., Nagaosa, K., & Shiratsuchi, A. (2011). Phagocytic removal of cells that have become unwanted: implications for animal development and tissue homeostasis. *Development, growth & differentiation*, **53**(2): 149-160.

Nascimento, K. S., Cunha, A. I., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2012). An overview of lectins purification strategies. *Journal of Molecular Recognition*, **25**(11): 527-541.

Necib, Y., Bahi, A., Merouane, F., Bouadi, H., & Boulahrouf, K. (2014). Comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*. *World journal of pharmaceutical research*, **4**(1), 1720-1733.

Nel, A.E. (2002). T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *Journal of allergy and clinical immunology*, **109**(5): 758-770.

Ng, K. K. S., Kolatkar, A. R., Park-Snyder, S., Feinberg, H., Clark, D. A., Drickamer, K., & Weis, W. I. (2002). Orientation of bound ligands in mannose-binding proteins: implications for multivalent ligand recognition. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(18): 16088-16095.

Ng, T. B., Ngai, P. H., & Xia, L. (2006). An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Mycologia*, **98**(2): 167-171.

Normann, S. J., & Benditt, E. P. (1965). Function of the reticuloendothelial system: II. Participation of a serum factor in carbon clearance. *The Journal of experimental medicine*, **122**(4): 709-719.

O

Oguri, S., Ando, A., & Nagata, Y. (1996). A novel developmental stage-specific lectin of the basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of bacteriology*, **178**(19): 5692-5698.

Opdenakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P., & Dwek, R. A. (1993). Concepts and principles of glycobiology. *The FASEB Journal*, **7**(14): 1330-1337.

P

Patrick H.K. Ngai and T.B. Ng. (2004). A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **314**: 988–993.

Perduca, M., Dalle Carbonare, L., Bovi, M., Innamorati, G., Cheri, S., Cavallini, C.,... & Valenti, M. T. (2017). Runx2 downregulation, migration and proliferation inhibition in melanoma cells treated with BEL β -trefoil. *Oncology reports*, **37**(4): 2209-2214.

Petrović, J., Glamočlija, J., Ilić-Tomić, T., Soković, M., Robajac, D., Nedić, O., & Pavić, A. (2020). Lectin from *Laetiporus sulphureus* effectively inhibits angiogenesis and tumor development in the zebrafish xenograft models of colorectal carcinoma and melanoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, **148**: 129-139.

Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, **109**(2): 347.

Podgorsky, V., Kovalenko, E., Karpova, I., Sashchuk, E., & Getman, E. (2014). New extracellular *Bacillus subtilis* lectins with sialic acid-specificity. *Journal of Agricultural Science and Technology*. **A**, **4**(6A).

Podobnik, M., Kisovec, M., & Anderluh, G. (2017). Molecular mechanism of pore formation by aerolysin-like proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **372**(1726): 20160209.

Pohleven, J., Obermajer, N., Sabotič, J., Anžlovar, S., Sepčić, K., Kos, J., ... & Brzin, J. (2009). Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1790**(3):173-181.

Q

Quioco, F.A. (1986). Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annual review of biochemistry*, **55**(1): 287-315.

R

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology*, **5**(3): 85–87.

Raz, A., Nakahara, S. (2008). Biological Modulation by Lectins and Their Ligands in Tumor Progression and Metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* **8**(1): 22-36.

Román, M. P. G., Mantilla, N. B., Flórez, S. A. C., De Mandal, S., Passari, A. K., Ruiz-Villáfan, B.,... & Sánchez, S. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Potential of Wild Edible Mushrooms. In *An Introduction to Mushroom*. IntechOpen.

Ruiqing, S., & Ji, H. (2006). Inhibitory effects of 8 toxic mushroom strains on growth and germination of *Alternaria alternata*. *J Agric Technol*, **2**: 39-48.

Russell, R. J., Gamblin, S. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., & Skehel, J. J. (2004). H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology*, **325**(2): 287-296.

S

Sahu, M. S., Mali, P. Y., Waikar, S. B., & Rangari, V. D. (2010). Evaluation of immunomodulatory potential of ethanolic extract of *Roscoea procera* rhizomes in mice. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **2**(4): 346-349

Saltarelli, R., Palma, F., Gioacchini, A. M., Calcabrini, C., Mancini, U., De Bellis, R., ... & Potenza, L. (2019). Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities and effects on nuclear DNA of ethanolic extract from an Italian mycelial isolate of *Ganoderma lucidum*. *Journal of ethnopharmacology*, **231**: 464-473.

Sano, K., Ogawa, H. (2014). Hemagglutination (inhibition) assay. In *Lectins* (pp: 47-52). Humana Press, New York, NY.

Santhiya, M., & Jansi, M. (2013). Screening of wild mushroom *Amanita* species for occurrence of lectins and their partial purification by RP-HPLC. *Middle East J. Sci. Res*, **14**: 456-460.

Santos, A.F., Da Silva, M.D.C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Correia, M. D. S., & Coelho, L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications.

Scopes, R. K. (2013). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.

Sharon N. (2007). Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**(5): 2753–2764.

Sharon, N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in biochemical sciences*, **18**(6): 221-226.

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

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

She, Q.B., Ng, T.B., Liu, W.K., 1998. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **247**: 106–111

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, **68**(5): 850-858.

Siamon Gordon, S. (2016). Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, **44**:463-75.

Singer, S.J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**(4023): 720-731.

Singh, R.S., Bhari, R., & Kaur, H. P. (2010). Mushroom lectins: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, **30**(2): 99-126.

Singh, S., Yadav, C. P. S., & Noolvi, M. N. (2012). Immunomodulatory activity of butanol fraction of *Gentiana olivieri* Griseb. on Balb/C mice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, **2**(6): 433-437.

Singh, S.S., Wang, H., Chan, Y. S., Pan, W., Dan, X., Yin, C. M., *et al.* (2015). Lectins from edible mushrooms. *Molecules*, **20**(1): 446-469.

Slifkin, M., & Doyle, R. J. (1990). Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, **3**(3): 197-218.

Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, **22**: 539–550.

Sun, H., Zhao, C. G., Tong, X., & Qi, Y. P. (2003). A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, **36**(2): 214-222.

Sun, J., Ng, T. B., Wang, H., & Zhang, G. (2014). A novel hemagglutinin with antiproliferative activity against tumor cells from the hallucinogenic mushroom *Boletus speciosus*. *BioMed research international*. **2014**: 1-7.

Suzuki, T., Amano, Y., Fujita, M., Kobayashi, Y., Dohra, H., Hirai, H.,... & Kawagishi, H. (2009). Purification, characterization, and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **73**(3): 702-709.

Suzuki, T., Sugiyama, K., Hirai, H., Ito, H., Morita, T., Dohra, H., ... & Kobayashi, Y. (2012). Mannose-specific lectin from the mushroom *Hygrophorus russula*. *Glycobiology*, **22**(5): 616-629.

Švajger, U., Pohleven, J., Kos, J., Štrukelj, B., & Jeras, M. (2011). CNL, a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis*, induces maturation and activation of dendritic cells via the toll-like receptor 4 pathway. *Immunology*, **134**(4): 409-418.

Sze, S. C. W., Ho, J. C. K., & Liu, W. K. (2004). *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *Journal of cellular biochemistry*, **92**(6): 1193-1202.

T

Tateno, H., Goldstein, I. J. (2003). Molecular cloning, expression, and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(42): 40455-40463.

Ticha, M., Dudova, V. and Kocourek, J. (1985). Studies on lectins LXII. A nonspecific erythroagglutinating lectin and a blood group A specific lectin in the mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing; *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. **4**: 505-514.

Toumi, M.E., Rebai, R., Kebaili, F.K., Merouane, F., Boulahrouf., K., Perduca, M., Necib, Y., Bahri, L. (2020). Immunomodulatory potential of partial purified lectin from *Lactarius delicious* mushroom. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **22**(11):1043–1055.

U

Utarabhand, P., Akkayanont, P. (1995). Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry*, **38**(2): 281-285.

V

Van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, **9**(6): 593.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., and Etzler, M. (2009). *Essentials of glycobiology*. (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2009, 784 p.

Vasconcelos-dos-Santos A., Oliveira, I. A., Lucena, M. C., Mantuano, N. R., Whelan, S. A., Dias, W. B., & Todeschini, A. R. (2015). Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. *Frontiers in oncology*, **5**: 138.

Vilgalys, R., Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology*, **172**(8): 4238-4246.

W

Wang H., Ng T. B., Ooi V. E. C. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycol. Res.* **102**: 897-906.

Wang, H. X., Ng, T. B., Ooi, V. E., Liu, W. K., & Chang, S. T. (1997). Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, splenocytes and life-span in sarcoma-bearing mice. *Anticancer research*, **17**(1A): 419-424.

Wang, H. X., Ooi, V. E. C., Ng, T. B., Chiu, K. W., & Chang, S. T. (1996). Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Pharmacology & toxicology*, **79**(6): 318-323.

Wang, H., Ng, T. B. (2005). First report of an arabinose-specific fungal lectin. *Biochemical and biophysical research communications*, **337**(2): 621-625.

Wang, H., Ng, T. B., & Liu, Q. (2002). Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sciences*, **70**(8): 877-885.

Wang, H., Ng, T. B., & Liu, Q. (2003). A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Biochemical and biophysical research communications*, **307**(3): 535-539.

Wang, H.X., Ng, T.B., Liu, W.K., Oou, V.E.C., & Chang, S.T. (1995). Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **46**(6): 508-513.

Wang, H.X.; Ng, T.B. (2001). Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. *Planta Med*, **67**: 669–672.

Wang, R., Guerin-Laguette, A., Huang, L. L., Wang, X. H., Butler, R., Wang, Y., & Yu, F. Q. (2019). Mycorrhizal syntheses between *Lactarius* spp. section *Deliciosi* and *Pinus* spp. and

the effects of grazing insects in Yunnan, China. *Canadian Journal of Forest Research*, **49**(6): 616-627.

Wang, S.X., Zhang, G.Q., Zhao, S., Xu, F., Zhou, Y., Li Geng, X.,... & Wang, H.X. (2013). Purification and characterization of a novel lectin with antiphytovirus activities from the wild mushroom *Paxillus involutus*. *Protein and peptide letters*, **20**(7):767-774.

Wang, X., Matei, E., Deng, L., Koharudin, L., Gronenborn, A. M., Ramström, O., & Yan, M. (2013). Sensing lectin–glycan interactions using lectin super-microarrays and glycans labeled with dye-doped silica nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, **47**: 258-264.

Wang, Y., Liu, Y., Wang, H., Li, C., Qi, P., & Bao, J. (2012). *Agaricus bisporus* lectins mediates islet β -cell proliferation through regulation of cell cycle proteins. *Experimental Biology and Medicine*, **237**(3): 287-296.

Wang, Y., Wu, B., Shao, J., Jia, J., Tian, Y., Shu, X.,... & Guan, Y. (2018). Extraction, purification and physicochemical properties of a novel lectin from *Laetiporus sulphureus* mushroom. *LWT - Food Science and Technology*, **91**: 151-159.

Warden, C. J. H., Waddell, L. A., (1884). Toxicity in *Abrus precatorius* seed extract.

Weng, C. J., & Yen, G. C. (2010). The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, **27**(5): 361-369.

White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., and Taylor J.W., in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J.Sninsky and T.J.White (Publisher Elsevier, Academic Press, New York, 1990), pp. 315–322.

Wong, J.H., Wang, H., Ng, T.B. (2009). A haemagglutinin from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biosci. Rep.* **29**: 321–327.

X

Xu, C. J., Wang, Y. X., Niu, B. N., Liu, B., Ying-Biao, L. I., Wang, X. M., & Lu, S. L. (2014). Isolation and characterization of a novel lectin with mitogenic activity from *Pleurotus ferulae*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **27**(4): 983-9.

Y

Yang, N., Li, D.F., Feng, L., Xiang, Y., Liu, W., Sun, H., Wang, D.C. (2009). Structural basis for the tumor cell apoptosis -inducing activity of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *J Journal of molecular biology*, **387**: 694–705.

Yau T, Dan X., Ng C.C.W., Ng T.B. (2015). Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*, **20**(3):3791-810

Younis, A. M., Yosri, M., & Stewart, J. K. (2019). In vitro evaluation of pleiotropic properties of wild mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Annals of Agricultural Sciences*, **64**(1): 79-87.

Yu L., Fernig D.G. Smith J. A., Milton JD., Rhodes JM. (1993). Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res*, **53**: 4627-4632.

Yu, S., Weaver, V., Martin, K., & Cantorna, M. T. (2009). The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC immunology*, **10**(1): 12.

Z

Zhang, G., Sun, J., Wang, H., & Ng, T. B. (2010). First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine*, **17**(10): 775-781.

Zhang, W., Tian, G., Geng, X., Zhao, Y., Ng, T. B., Zhao, L., & Wang, H. (2014). Isolation and characterization of a novel lectin from the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata*. *Molecules*, **19**(12): 19880-19891.

Zhao, C., Sun, H., Tong, X., & Qi, Y. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*, **374**(2): 321-327.

Zhao, J. K., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2009). Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon*, **53**(3): 360-366.

Zhao, S., Zhao, Y., Li, S., Zhao, J., Zhang, G., Wang, H., & Ng, T. B. (2010). A novel lectin with highly potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible wild mushroom *Russula delica*. *Glycoconjugate journal*, **27**(2): 259-265.

Zheng, S.; Li, C.; Ng, T.B.; Wang, H.X. (2007). A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochem*, **42**: 1620–1624.

Zhuang, C., Murata, T., Usui, T., Kawagishi, H., & Kobayashi, K. (1996). Purification and characterization of a lectin from the toxic mushroom *Amanita pantherina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1291**(1): 40-44.

Žurga, S., Pohleven, J., Renko, M., Bleuler-Martinez, S., Sosnowski, P., Turk, D., ... & Sabotič, J. (2014). A novel β -trefoil lectin from the parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) is nematotoxic. *The FEBS journal*, **281**(15): 3489-3506.

Annexes

Annexe 1

Indentification moleculaire des espèces étudiées

- Extraction d'ADN total du champignon

L'extraction d'ADN du champignon a été réalisée selon la méthode de Murray et Thomson (1980) avec une légère modification dans le tampon d'extraction (augmentation des concentrations des composants, sans ajout du β -mercaptoéthanol). La poudre séchée a été mélangée avec un micropestle dans 600 μ L un tampon d'extraction (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA pH 8,0 20 mM et Tris-HCl pH 8,0 100 mM). Le mélange a ensuite été incubé pendant 15 min à 65 °C. Un volume équivalent de chloroforme: alcool isoamylique (24:1) (v/v) a été ajouté et mélangé lentement avec les échantillons jusqu'à émulsion puis centrifugé pendant 10 min à 13000 g.

L'ADN contenu dans le surnageant est précipité par l'ajout d'un volume égal d'isopropanol. La pellette a été récupérée après centrifugation 13000 g pendant 15 min, puis lavée par de l'éthanol froid 70% et centrifugée de nouveau pendant 2 min et séchée après avoir été suspendue dans 200 μ L de ddH₂O.

- Réaction de polymérisation en chaine PCR

L'ADN matrice obtenu après extraction est utilisé dans l'amplification des régions spécifiques dans l'ADN ribosomal cités précédemment: ITS comprenant la région 5,8S; nuc-NUC-NUC-LSU et nuc-SSU de l'ADNr. La réaction d'amplification PCR est réalisée suivant la méthode de Mullis et Faloona (1989). Nous avons utilisé des amorces spécifiques pour chaque région complémentaires à celles des brins opposés limitant la zone cible à copier. Selon White., *et al.* (1990) et Gardes M. et Bruns T.D. (1993), l'amplification de la région ITS a été réalisée en présence des amorces ITS 1F et ITS 4.

En général, les ITS comprennent des parties plus ou moins conservées entre les différentes familles des basidiomycetes et sont considérées comme clés évolutives des champignons (Bâ A., *et al.*, 2001). Pour amplifier la région codante de nuc-LSU, nous avons utilisé les amorce LR0R5, LR5 (Vilgalys R. et Hester M., 1990; Gokhale A.B., *et al.*, 1991), et NS19 b, NS41 spécifiques pour la région codante de la petite sous unité du ribosome nuc-SSU (Hibbett. D.S., *et al.*, 1996).

- Préparation du milieu réactionnel et programme d'amplification

Dans un bain de glace, le mix doit être préparé de la manière suivante: 1-2 µL de l'ADN génomique ; 1x tampon ; 2 mM MgCl₂ ; 0,2 mM dNTP ; 0,5 µM de chaque amorce, 1U Taq polymérase (BioTaq). Le déroulement de PCR commence par une phase de dénaturation à 95°C pendant 5 min suivie par 35 cycles comprenant les étapes d'amplification (une dénaturation 45 s à 94 °C, une phase d'hybridation des amorces durant 30 s à 54 °C et une polymérisation de 45 s à 72 °C) finis par une élongation finale à 10 min à 72 °C. Les réactifs de PCR avec les amorces ont été fournis par la société Bioline, Espagne.

Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des régions d'ADNr.

Région	Amorce	Séquence (5'-3')	Tm	Référence
ITS +5,8s	ITS 1F _(S)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55	Gardes M. et Bruns T. D., 1993
	ITS 4 _(R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53	White <i>et al.</i> , 1990
nuc-LSU	LR0R _(S)	ACCCGCTGAACTTAAGC	55	Vilgalys et Hester., 1990; Gokhale A. B., <i>et al.</i> , 1991
	LR5 _(R)	TCCTGAGGGAACTTCG	60	
nuc-SSU	NS19 b _(S)	CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC	60	Hibbett D.S., 1996
	NS 41 _(R)	CCCGTGTGAGTCAAATTA	47	

Tm: molding temparture ou la température de fusion des amorces avec leurs parties complémentaire. (S) brin sens et (R) brin reverse.

- Séquençage des amplicons

Les amplicons ont été envoyés à la société STABVIDA (Portugal) pour réaliser le séquençage par la méthode de Sanger avec l'automate 3730xl DNA Analyzer, en utilisant les mêmes amorces de PCR. Les séquences obtenues (brins sens et reverse) ont été assemblées et vérifiées par le logiciel Bioedit v 5.15.0.0BT ou Chromatogram explorer lite v5.0.2. Ces logiciels peuvent faciliter la lecture d'un chromatogramme d'ADN et visualiser les pics obtenus après le séquençage après élimination des parties non lisibles et ayant un faible spectre.

- Analyse bioinformatique et soumission des séquences dans GenBank

Les séquences fournies par la société STAVIDA ont été converties au format FASTA et soumises dans GenBank sous les codes: MT262921, MT260877 et MT261201 pour chaque région d'ADNr séquencée. L'analyse bioinformatique contribue en grande partie dans l'identification moléculaire ou la taxonomie moderne par l'alignement des séquences biologiques, elle nous donne des informations complémentaires et plus adéquates sur les espèces semblables ou identiques.

Un programme informatique (BLAST : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.) a été utilisé pour la recherche de similarités et d'identités entre les séquences biologiques. Il permet la réalisation des alignements dans des parties spécifiques des séquences nucléiques à fin de déterminer les segments identiques ou similaires. Il donne les informations suivantes: le pourcentage d'identité, E value : valeur d'erreur d'alignement, le score et le pourcentage de la couverture de la séquence alignée. Les séquences obtenues converties au format FASTA ont été insérées et comparées avec les autres ITS, nuc-LSU et nuc-SSU des basidiomycètes de GenBank par le programme (BLASTn).

Résultats d'Identification moléculaire

Lactarius deliciosus souche TMES25

La recherche d'homologie ou l'analyse bioinformatique avec l'alignement par BLASTn avec les séquences ITS de GenBank montre que la séquence ITS (code Genbank : MT262921) de 713 pb (pair de bases) est identique à *L. deliciosus* du Portugal isolée par Franco A.R. *et al.* (2013) (KF482484) avec un pourcentage d'identité de 100%, un score maximale d'alignement de 1303 et une E-value (valeur d'erreur) égale à 0,00 et une couverture de 98%. Nous notons également un même pourcentage d'identité, une même E-value, un score global de 1284 et une couverture de 97% de la séquence d'ITS d'ADNr obtenue par extraction d'ADN à partir des spores de la même espèce fournie par Martins R., *et al.* (2018) (MG334288). Les autres séquences ITS confirment que l'espèce collectée appartient à la famille des lactaires et que l'espèce est *L. deliciosus*.

Le séquençage de gène d'ADNr qui code pour la grande sous unité du ribosome nuc-LSU (MT260877) est homologue à celle de *Lactarius deliciosus* voucher JN2001-046 de Belgique (KF133305) fournie par Verbeken A., *et al.* (2014) avec un pourcentage d'identité de 99,89%, un score global de 1696 caractérisé par une E-value de 0,00 et une couverture de la séquence dans l'alignement avec un pourcentage de 99%. Le résultat est résumé dans le tableau 8 pour le reste des séquences ayant révélé une homologie avec la séquence nuc-LSU.

Le résultat de recherche de l'homologie de la séquence partielle du gène qui code pour nuc-SSU (MT261201) est représenté dans le tableau 2. L'alignement multiple montre que cette séquence possède une identité avec *Lactarius deceptivus*, isolat AFTOL-ID 682 (AY707093), 1716 bp et avec *Russula exalbicans* (AY293156), 1774 bp avec %Id de 98,97 % et un score de 1387. Les séquences obtenues ont été converties en format FASTA.

Laetiporus sulphureus souche TMES43

Les résultats du blast des séquences obtenues ITS (MT550648) et LSU (MT552980) ont résumé dans le tableau 3 au dessous. L'alignement de la séquence ITS (MT550648) avec les autres séquences nucléiques a montré qu'elle a un %Id supérieur à 99% et un % couverture supérieure à 91% avec les autres séquences ITS de *L. sulphureus* de différents pays. La même chose a été obtenue pour LSU (MT552980), où %Id a estimé entre 98,39-98,48% avec les autres LSU, et % de couverture de 98%.

Annexes

Annexe 1 suite

Espèces avec des séquences ITS, nuc-LSU et nuc-SSU de forte homologie avec celles de *L. deliciosus*.

Gene	GenBank Id	Espèce	Taille (pb)	Score	%Id	couverture%
ITS	KF482484	<i>L. deliciosus</i>	755	1303	100	98
	MG334288		696	1284	100	97
	KY687508		750	1303	99,86	99
	KJ769672		745	1303	99,86	99
	KY661914		740	1293	99,86	98
	KY661913		721	1284	99,86	97
nuc-LSU	KF133305	<i>L. hutsudake</i>	960	1696	99,89	99
	KR364215		957	1677	99,57	99
	KX441381		978	1655	99,13	99
nuc-SSU	AY707093	<i>L. deceptivus</i>	1719	1387	98,97	100
	AY293156	<i>R. exalbicans</i>	1774	1387	98,97	100
	U59093	<i>R. compacta</i>	1776	1380	98,84	99

Genbank Id: code d'accèsion, Score: représente le résultat d'alignement nucléotidique entre les séquences, % Id: pourcentage d'identité de la séquence obtenue avec la séquence homologue de GenBank, pb: paire de bases.

Annexes

Annexe 1 suite

Résumé des résultats BLASTn des sequence ITS (MT550648) et LSU (MT552980) d'espèce étudiée avec celles de l'espèce *L. sulphureus* de différents pays.

Gene	Ac GenBank	Id %	% de couverture	Taille	Spécimen voucher/souche
ITS	AY835668	99,33	93	635	2089
	KX685448	99,17	93	573	Champ-103
	MF161254	99,16	92	611	BHI-F417
	MK934586	99,32	91	613	RGM-2720
	MT550648	/	/	642	TMES43
	KU255085	99,15	91	615	STE-U-7917
nuc-LSU	KY886757	98,36	98	1336	Cui 12372
	KY886759				He 2122
	KY886758				Cui 12368
	KY886756				He 2087
	KX354504			974	Cui 12370
	KY886745			1335	Dai 12826
	AY684162			1395	AFTOL-ID 769
	KR605762			1301	Dai 12826
	MT552980	/	/	799	TMES43

Annexes

Annexe 1 suite

Les séquences nucléiques des régions d'ADN ribosomal: ITS, LSU et SSU des espèces étudiées

Espèce	Région	Séquence	Taille	Genbank Id
<i>Lactarius deliciosus</i> strain TMES25	ITS	AGGTCAAGGGTTTCGTGGGGGTTGAGAGAGTCTCCCGAGAAGGGAGAC ACGCCCAAACGTTGTCTCGTCGAGACGGTTAGAAGCGGGTCCCAAAT GCAACAGAGCCAGAAACCAAGTCATGGAAACATCTTATCACATGTCA AGGATCGGCAAAGAGGACCCCGCTAATTCATTTAAGAGGAGCTGGGT CTAAGAGACGCCAGCAAAGGCCCTCCAATGTCCAAGCCTCCTTCGGTG TCCAGAAGAAAACCGAGAAGGTTGAGAATTTACGACACTCAAACGG GTGTGCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTC GATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCT GCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTG TATTGATTGCGTGTTCATCGCAAAATGGGGTCATTCTACACTTTTTAA AAGGGGTTTGTGTGAAAACGCAAGCCCCCTCCAGGATCGGTTTCGATC CCAAAAGGTGCCACGCGGTGGTGCACAAAAGGGTGAGATGGATTTT ATGCGAGAGGACGCGCTCCGGCGTGCACGACTTTTGCCTCAACAAAA AGTCAGCGACAGCCCTCGCACGCCCTCAACGCACGTTGTACGATAAT GATCCTCCGCAGGTTACCTACGAAACCTTGTTACGACTTTTACT TCCTCTAA	713	MT262921
	LSU	CGATTAGTCTTTTCGCCCTATAACCAAATTTGACGATCGATTTGCAC GTCAGAAATCGCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCCTCTGGCTTACCC TATTACAGGCATAGTTCCACATCTTTCCGGTCCCAACACGCACGCTCT ACCGCAGATCCGTCACAGAAGGTCTGGTCCGGGCGTCCGGTGCCTCC ACGACAGAGGTCCCAACTTTCACTTTTCATTGCGCGCACGGGTTTTCC ACCCGAACACTCGCGGGCGTGTGGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG ACGGGTCGTTTAAAGCCATTACGCCAGCATCCTAAGCGCGTGACGTG GGCCGAAGCCCCGACACCAAGGTGCGCGCTGAGTTCTCAATCCCAC CCCTCGCATGCGACAGGAGACTATAACACACCCGCGAAGGTGCCACC TTTCCCTTGCCATTATCCGAGGGGCAAAATTTGACGCTGACCCGTCGG GCCGAGAAGTACACCAAGCCAAGGCAAGGCTGAGTCTCGGTCGACGC GACTGACTTCAAGCGTTTCCCTTTCAACAATTTACGTAAGTTTCA CTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTGTTTCG CTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAGTTCACCACCC ATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAGAGCGCATCA CAGAAGCACAGGCATCCGTGCCAAAGACGGGATTCTACCCTCTATG ACGCTCCATTCCAGGAGACTTGTGCACGGCCCGGCGCGGAAGACGCT TCTCTAAATTACAACCTCGGACGGCCAGAGACCGCCAGATTTTAAATT TGAGCTTTTCCCGCTTCACTCGCAGTTACTAGGGGAATCCTTGTTAG TTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAGTTT	925	MT260877

Annexes

Annexe 1 suite

Espèce	Région	Séquence	Taille	Genbank Id
<i>Lactarius deliciosus</i> strain TMES25	SSU	CAGGCGCGCAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAA ATAACAATATAGGGCCCTTTCGGGTCTTATAATTGGAATGAGTACAA TTTAAATCCGTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCA GTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTCAGACCTGGCCGGGCGGTCCGCC TAACGGTGTGACTGTCTGGCTGGGCCTTACCTCTTGGTGAGCCGGC ATGCCCTTCACTGGGTGCGTCGGGGAACCAGGACCTTTACCTTGAGA AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCGAATACATTAGCATGG AATAATAAAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGAGTC GCCGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTTGTATTGCGTTGC TAGAGGTGAAATCTTGGATTTACGCAAGACAACTATTGCGAAAGC ATTTGCCAAGGATGTTTTTCAATTAATCAAGAACGAAGGTTAGGGGATC GAAAACGATCAGATACCCTTGTAGTCTTAACAGTAACTATGCCGAC TAGGGATCGGACGACCTCAATCTTATGCGTCGTTCCGGCACCTTACGA GAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGCTGAA ACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGG CTTAATTTGACTCCAACACGGG	744	MT261201
<i>Laeiropus sulphureus</i> strain TMES43	ITS	ACCTACCTGATTTTCGAAGTCAGAGGTCAGAGATGTTTCGTCGGAAGA CAAAGCTTGAACCGTTCAACGACGACCCCTTCAGTCGACGGTGACTT TCTATCACGTCCACTCGGTTCGGTCAGGTCCAAGCTTTACTATGCATT CAAGAGGAGCCGAACGCGCTCCGGCAACCTCCAAAATCCAACCGAC GCTCATCCGCAAAGATGGCAAGGGTTGAGAGTTTCATGACACTCAA CAGGCATGCTCCTCGAATGCCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGA TTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTC GCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAG TTATATTACGATGCGTTACAACGCGTAAGACATTCCGATATACATTC TGAAGTTTGTGTAAGAAAGCGAGGCTACGAATCCTGGGCGGTGCCCC ACCCACTCAACGAGCCGGGCCTTCGATGTGCACGGGGGTGTTTTGT GGACAAGGGGCGAGGCCCGTTGTTTCGTTAATGATCCTTCCGCATGT TCACCTACGGAACCTTGTACGACTTTTACTTCTCAATTGGACCA AGCATTTTACTTCTCTAATTGACCAAGAAA	642	MT550648
	LSU	AAGAAGGGTGAGATCCCCTCCATGACACGGACCGCCGGCGGTTTGTG ATGCGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGG GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCG AACAAGTACCGTGAGGGAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTT AAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGC GTCGGCCGGGGCTCAGCCTTGCATTTCGTTTGGCTCGGTTTACTTCCC GTCGACGGGCCAGCGTCGATTTTGACCGTCGGAAAAGGGTCAAGGGGA AAGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCTTTGGTTCGCATACGGCGGT TGGGATCGAGGAACGCAGCACGCCTTTATGGCCGGGGCCTTTGTGCC CAAGTACCGTGCTTAGGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCGT CTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACGTGCCTGCGAGTGTTTGGGT GGAAAACCCGAGCGCGCAATGAAAGTGAAGTGCAGATCTCTGTGAT GGAGACACCGACGCCCGGACCTGAGCTGCTTGCGAAGGATCTGCGG TAGAGCACGCACGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAATATGCCTGAAT AGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGA CGTGCAAATCGATCGTCGAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATC GAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAATTTCCCCTCAGGAAAAAC	799	MT552980

- L'activation de la membrane de dialyse

En général, les membranes de dialyse doivent être prétraitées avant utilisation pour une dialyse efficace. Vérifiez auprès du fabricant les protocoles spécifiques à cette membrane. Ci-dessous décrit une méthode générique pour préparer des membranes dont la plupart sont faites de cellulose.

Matériaux

-Membrane de dialyse de coupure moléculaire désirée 12 kDa

-Bicarbonate de sodium (NaCO_3) de 10 mM.

-Une solution de 10 mM d'EDTA disodique (Na_2EDTA), pH 8.0.

- Ethanol 20% à 50% (v/v).

1- Retirer la membrane du rouleau et couper en longueurs utilisables avec des gants pour manipuler la membrane de dialyse, car elle est sensible à un certain nombre de micro-organismes cellulolytiques. La membrane est disponible sous forme de feuilles ou de tubes préformés.

2- Mouiller la membrane et la faire bouillir pendant plusieurs minutes dans un grand excès de bicarbonate de sodium de 10 mM. (Recommandé de faire bouillir l'ébullition dans un placard à fumée en raison de l'odeur du bécher)

3- Faire bouillir plusieurs minutes en 10 mM Na_2EDTA . Répéter. (L'ébullition accélère le processus de traitement, mais n'est pas nécessaire. Un trempage de 30 minutes avec une certaine agitation peut remplacer l'étape d'ébullition).

4- Laver plusieurs fois dans de l'eau distillée.

5-Conserver à 4 °C dans 20% à 50% d'éthanol pour prévenir la croissance des micro-organismes cellulolytiques. Alternativement, des agents bactériostatiques (p. ex., azide de sodium ou cacodylate de sodium) peuvent être utilisés pour l'entreposage; cependant, l'éthanol est préféré pour la facilité et la commodité.

Annexes

Annexe 3

- Electrophorèse SDS-PAGE et PAGE

<p>-Laemmli buffer ou Tampon de dénaturation 4X</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 1M ou 0,5M pH 6,8: 500 µL - SDS 10%: 800 µL - Bleu de bromophenol 0.15% : 800 µL - B- mercaptoethanol : 200 µL - Glycérol 100% : 400 µL - MilliQ : 300 µL <p>-Tampon de migration Tris-Glycine 10 X pH 8,3 pour SDS-PAGE</p> <ul style="list-style-type: none"> - 25 mM Tris: 15,1 g - 250 mM Glycine: 94 g - SDS 0,1%: 5 g - MilliQ 1L <p>-La Solution de coloration 1L</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ethanol ou Méthanol: 250 mL - Bleu de coomassie R 250: 1,5 g - Acide acétique glacial 100 mL - MilliQ : 650 mL 	<p>-Tampon de Laemmli 4X pour électrophorèse PAGE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 1M ou 0,5M pH 6,8: 500 µL - B- mercaptoethanol: 200 µL - Glycérol 100%: 400 µL - MilliQ: 300 µL <p>-Tampon de migration Tris-Glycine 10 X pH 8.3 pour PAGE</p> <ul style="list-style-type: none"> - 25 mM Tris: 15,1 g - 250 mM Glycine: 94 g - MilliQ: 1L <p>La solution de décoloration:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ethanol ou Méthanol: 250 mL - Acide acétique glacial: 100 mL - MilliQ: 650 mL - TEMED: 5 µL
--	--

- La préparation des gels SDS-PAGE et PAGE

Composition chimique	SDS-PAGE		PAGE		
	Gel de stacking 5%	Gel de separation 12%	Gel de stacking 5%	Gel de separation 10%	Gel de separation 12%
MilliQ (mL)	1,4	1,6	1,4	1,9	1,6
Polyacrylamide 30% (mL)	0,330	2	0,330	1.3	2
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (mL)	/	1,3	/	1,3	1,3
Tris HCl 1M pH 6,8 (µL)	250	/	250	/	/
SDS 10% (µL)	20	50	/	/	/
APS 10% (µL)	20	50	40	90	90
TEMED (µL)	3	5	5	6	6
Volume final (mL)	2	5	2	5	5

Annexe 4

- Dosage des protéines ‘méthode du Bradford, 1976’

A- Préparation du réactif de Bradford :

- 1- Dissoudre 100 mg de Bleu de coomassie R-250 dans 50 mL d'éthanol 96 ° ou Absolu ensuite rajoute 100 mL d'acide ortho-phosphorique ou phosphorique 85%.
- 2- Mets sous agitation après complète avec de l'eau distillée jusqu'à ou le volume final à atteindre 1 L.
- 3- Après l'agitation, filtre le mélange 3 fois par papier Whatman N° 3 ou 1 pour éliminer les l'excès et les partis non solubiliser de bleu de coomassie.
- 4- Conserve le réactif dans le frigo sous obscurité à 4 °C.

B- Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA

On utilisant une solution mère de BSA (sigma) à une concentration de 1 mg/mL préparée dans le tampon PBS 10 mM pH 7,4.

Les dilutions : 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 100 µg/mL chaque dilution se répète trois fois

Dilution (µg/mL)	20	30	40	50	60	70	80	100
BSA (1 mg/mL) (µL)	20	30	40	50	60	70	80	100
E. Distillée (µL)	80	70	60	50	40	30	20	0
Réactif de Bradford (mL)	4							

Cent microlitre des échantillons doivent être traités avec un volume de 4 mL du réactif de Bradford selon l'indication du protocole. Après 5 -10 min d'incubation dans l'obscurité les tubes contenant les mélanges réactionnels ont lu avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-visible à λ 595 nm.

Annexe 4 suite

- Dosage des sucres 'méthode du Dubois, 1956'

Principe:

La mesure de la concentration des sucres dans les lectines purifiées est l'une des méthodes pour la nature de la molécule soit une protéine simple ou glycosylée (une glycoprotéine), la méthode du Dubois 1956 se base sur l'hydrolyse des liaisons N et O osidiques entre les acides aminés Asn-X-Ser/Thr dans le cas de N-glycosylation, et la sérine ou de la thréonine cas d'une O- glycosylation. L'hydrolyse s'effectue par l'acide sulfurique pur de 96 % et 36 N et en fonction de la présence du phénol les sucres hydrolysés s'interagissent avec le phénol qui à la suite induira le changement de la coloration dans l'intensité est proportionnelle avec la concentration des oligosaccharides cette coloration a mesuré par le spectrophotomètre à λ 490 nm.

Mode de travail:

La préparation d'une gamme d'étalonnage à partir d'une solution de stock du glucose dont la concentration 1 mg/mL préparée dans l'eau ultrapure, les dilutions utilisées sont les suivantes 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 et 0,5 mg/mL dans des tubes en verre (avec trois répétitions pour chaque dilution).

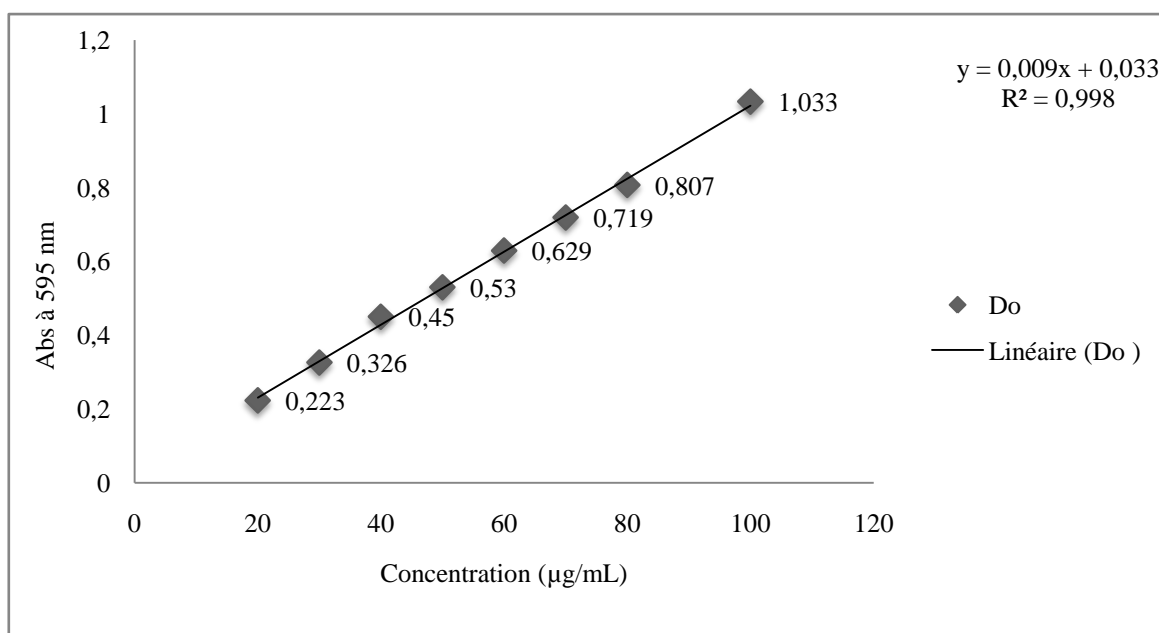
Dilution (mg/mL)	0,1	0,15	0,25	0,3	0,5	LSP (5 mg/mL)
Glucose (1 mg/mL)	0,100	0,150	0,250	0,300	0,500	/
E. Distillée (mL)	0,900	0,850	0,750	0,700	0,500	/
Volume finale (mL)	1					

Le traitement des dilutions et l'échantillon LSP se fait de la même manière, 0,4 ml de chaque dilution a été mélangé avec même volume du phénol, après 2 mL d'acide sulfurique a été ajouté dans chaque tube et couvert par papier d'aluminium pour éviter l'oxydation du phénol, ensuite les tubes ont transféré dans le bain marie pour favoriser la réaction d'hydrolyse à une température de 100 °C pendant 30 min d'incubation. Les tubes sont refroidis ensuite subit une lecture d'absorbance à une longueur d'onde 490 nm par le spectrophotomètre UNICAM UV/Vis, la courbe d'étalonnage a été exprimé en Moyenne \pm écart type des absorbances.

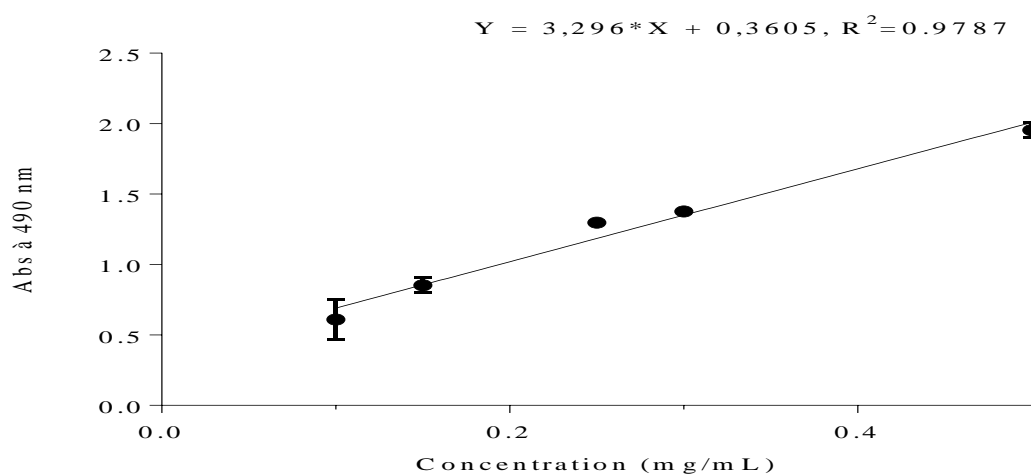
Annexes

Les densités optiques mesurées à 490 nm correspondent à chaque gamme

Dosage des sucres					
Glucose mg/mL	0,1	0,15	0,25	0,3	0,5
DO1	0,452	0,881	1,289	1,4	1,985
DO2	0,642	0,789	1,303	1,389	1,982
DO3	0,734	0,885	1,298	1,341	1,893
DO Moyenne	0,6093333333	0,8516666667	1,2966666667	1,3766666667	1,9533333333



La gamme d'étalonnage de BSA



La gamme d'étalonnage du glucose

Annexes

Annexe 5

- Les concentrations initiales préparées dans le PBS des sucres et glycoprotéines pour l'usage dans le test d'inhibition.

Sucre/ Glycoprotéine	Concentration (mM, mg/mL)	Sucre/ Glycoprotéine	Concentration (mM, mg/mL)
Arabinose	400	4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	200
Cellobiose		4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	
Cellobiose		4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	
D (+) -Galactose		4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	
D (+)-Glucose		Fétuine	1 mg/mL
Glucosamine HCl		Ovalbumine	
Mannitol		Mucine	
Mannose			
Melibiose			
Mannose			
L-Rhamnose monohydrate			
Lactose monohydraté			
Xylitol			

- Purification de la lectine PSLeC à partir du champignon *Laetiporus sulphureus* strain TMES43.
- Préparation des tampons utilisés dans la chromatographie d'affinité sur sepharose 4B

Composition	PM (g/mol)	mM	PBS 1X pH 8,4	PBS 1X pH 8,4 , 0.4 M Lactose
			Masse (g)	
Na ₂ HPO ₄	141,96	10	1,419	
KH ₂ PO ₄	136,086	2	0,27	
KCl	74,55	2,7	0,2	
NaCl	58,44	137	8	
Lactose -H ₂ O	360,31		/	28,8248
MilliQ	/	/	1000 mL	200 mL

mM : millimolaire

Annexes

Annexe 5 suite

- AKTA- Prime plus profils chromatographique

Etape	Fraction	Volume (mL)	Abs 280 nm
Fractions non adsorbées	1	2	0,013
	2	4	0,01
	3	6	0,01
	4	8	0,01
	5	10	0,011
	6	12	0,008
	7	14	0,008
	8	16	0,005
	9	18	0,005
	10	20	0,003
Fractions éluées par PBSE 1X (pH 8,4 0,4 M Lactose)	11	22	0,044
	12	24	0,474
	13	26	1,22
	14	28	1,135
	15	30	0,619
	16	32	0,289
	17	34	0,144
	18	36	0,093
	19	38	0,069
	20	40	0,065
	21	42	0,05
	22	44	0,045
	23	46	0,03

Annexes

Annexe 6

- Activité immunomodulatrice de LDL

Groupe		Dose	K	α	$t_{1/2}$ (min)
G 01 (Témoin)		0.5 mL	0,0114	3,320	64,78
			0,0149	2,900	46,51
			0,0101	3,170	68,61
			0,0137	4,870	50,58
			0,0105	4,160	66,00
			0,0122	3,950	56,80
			0,0116	3,340	59,74
Groupes traits par LDL	G 02	5 mg/kg	0,0405	7,400	17,11
			0,0370	6,690	18,70
			0,0287	5,720	24,14
			0,0246	3,760	28,17
			0,0346	4,670	20,02
			0,0288	3,330	24,06
			0,0217	3,560	31,90
	G 03	10 mg/kg	0,0330	7,40	21,00
			0,0730	6,690	9,49
			0,1290	5,720	5,37
			0,0664	3,760	10,43
			0,0624	4,670	11,10
			0,0879	3,330	7,88
			0,0439	3,560	15,78
	G 04	15 mg/kg	0,0185	6,332	37,45
			0,0250	6,574	8,14
			0,0467	4,687	26,34
			0,0177	5,556	14,83
			0,2750	4,517	39,15
			0,2070	5,222	25,20
			0,3320	4,320	33,47
	G 05	30 mg/kg	0,0525	5,023	37,45
			0,0679	6,799	8,14
			0,0287	4,522	26,34
			0,0419	5,493	14,83
			0,0517	6,086	39,15
			0,0227	4,239	25,20
			0,0238	4,670	33,47

Annexes

Annexe 6 (suite)

- Activité antiproliférative de PSLec (pourcentage de cytotoxicité)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	NHEM			A375		
0	0	0	0	0	0	0
5	89,687	91,7313	92,5785	21,1873	21,2499	21,2186
10	87,7593	88,5253	90,4935	52,8199	62,8944	57,8572
20	90,0725	94,6228	90,3769	77,4067	75,3259	76,3663

Présentée par:
TOUMI Mohammed Esseddik

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle LMD

EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

Thème: **Purification et caractérisation des lectines à partir des champignons : *Lactarius***

***deliciosus, Laetiporus sulphureus* avec des tests biologiques**

Résumé:

Dans cette étude, deux lectines fongiques à affinité pour le lactose ont été purifiées et caractérisées à partir *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 (dénommées respectivement LDL et PSLec) par différentes techniques chromatographiques et ses potentiels biologiques ont été évalués. La caractérisation de LDL a montré qu'elle est une hémagglutinine hétérodimérique (18 et 19 kDa du poids moléculaire pour chaque unité), spécifique pour le galactose et le méthyl- α -D-galactopyranoside, ainsi une affinité pour le lactose, la fétuine et la mucine. LDL induit une agglutination (HA) à des températures inférieures à 70 °C, dans pH optimal égale à 7. L'essai d'immunomodulation (test de clairance de carbone) par LDL *in vivo* a montré un effet hautement significatif de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial des souris à $p < 0,0001$. La PSLec a été caractérisée par une structure homo-tétramérique de 35904 kDa de poids moléculaire déterminé par LC-MS/MS-MALDI. Elle est une lectine métallo-dépendante, stable à pH alcalins. En outre, l'étude protéomique du Mascote de ces peptides fragmentés par la trypsine et MALDI-TOF/TOF nous a montré que PSLec a un score d'identité de 43 avec la protéine 16 liée à l'autophagie de *Meyerozyma guilliermondii* (souche ATCC 6260/ CBS 566/ DSM 6381/ JCM 1539/ NBRC 10279/ NRRL Y -324) (Expasy id: ATG16_PICGU). Le test préliminaire MTT a révélé que la PSLec est une lectine cytotoxique.

Mots-Clés: lectine, *Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus*, agglutination, affinité, spécifique, clairance, activité phagocytaire, MALDI-TOF/TOF, activité cytotoxique.

Devant le jury:

Président: HAMIDECHI M. A.

Directeur de thèse: NECIB Y.

Examineurs:

NOUADRI T.

ABDENNOUR C.

KHELILI K.

Soutenu le:

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

MCA Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Pr. Univ. Badji Mokhtar ANNABA

Pr. Univ. Badji Mokhtar ANNABA

Année universitaire: 2020/2021

Présentée par:
TOUMI Mohammed Esseddik

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle LMD

EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Thème: Purification et caractérisation des lectines à partir des champignons : *Lactarius deliciosus*,
Laetiporus sulphureus avec des tests biologiques**

Résumé:

Dans cette étude, deux lectines fongiques à affinité pour le lactose ont été purifiées et caractérisées à partir *Lactarius deliciosus* souche TMES25 et *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 (dénommées respectivement LDL et PSLec) par différentes techniques chromatographiques et ses potentiels biologiques ont été évalués. La caractérisation de LDL a montré qu'elle est une hémagglutinine hétérodimérique (18 et 19 kDa du poids moléculaire pour chaque unité), spécifique pour le galactose et le méthyl- α -D-galactopyranoside, ainsi une affinité pour le lactose, la fève et la mucine. LDL induit une agglutination (HA) à des températures inférieures à 70 °C, dans pH optimal égale à 7. L'essai d'immunomodulation (test de clairance de carbone) par LDL *in vivo* a montré un effet hautement significatif de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial des souris à $p < 0,0001$. La PSLec a été caractérisée par une structure homo-tétramérique de 35904 kDa de poids moléculaire déterminé par LC-MS/MS-MALDI. Elle est une lectine métallo-dépendante, stable à pH alcalins. En outre, l'étude protéomique du Mascote de ces peptides fragmentés par la trypsine et MALDI-TOF/TOF nous a montré que PSLec a un score d'identité de 43 avec la protéine 16 liée à l'autophagie de *Meyerozyma guilliermondii* (souche ATCC 6260/ CBS 566/ DSM 6381/ JCM 1539/ NBRC 10279/ NRRL Y -324) (Expasy id: ATG16_PICGU). Le test préliminaire MTT a révélé que la PSLec est une lectine cytotoxique.

Mots-Clés: lectine, *Lactarius deliciosus*, *Laetiporus sulphureus*, agglutination, affinité, spécifique, clairance, activité phagocytaire, MALDI-TOF/TOF, activité cytotoxique.

Devant le jury:

Président: HAMIDECHI M. A.

Directeur de thèse: NECIB Y.

Examineurs:

NOUADRI T.

ABDENNOUR C.

KHELILI K.

Soutenu le:

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Pr. Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

MCA Univ. Frères Mentouri- Constantine 1

Pr. Univ. Badji Mokhtar ANNABA

Pr. Univ. Badji Mokhtar ANNABA

Année universitaire: 2020/2021