



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI
CONSTANTINE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 24/D₃C/2016
N° de série : 01/MIB/2016

Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3^{ème} cycle LMD

En Biotechnologies Microbiennes, Génomes et Environnement

Par

MEROUANE Fateh

Thème :

**Extraction, purification et caractérisation des lectines
produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c,
et tests biologiques**

Soutenue le 26 Mai 2016

Membres du jury :

Président :	Mr. BOULAHROUF A.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. NECIB Y.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. ARHAB R.	Professeur	U. Larbi Ben M'hidi-OEB
Examineur :	Mr. ABDENNOUR C.	Professeur	U. Badji-Mokhtar-Annaba
Examineur :	Mr. KHELILI K.	Professeur	U. Badji-Mokhtar-Annaba

Année universitaire: 2015 - 2016

Remerciements

Je remercie en premier lieu Madame **ZERIZER H.** pour sa contribution scientifique et technique sans laquelle il n'aurait pas été possible d'atteindre les objectifs de cette thèse de manière satisfaisante.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Pr. **NECIB Y.** de l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de diriger ce travail, ainsi que pour tous ses précieux conseils, et ses encouragements, pour ses qualités humaines si précieuses, sa dévotion, et sa grande générosité, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier tout particulièrement, le responsable du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Monsieur Pr. **BOULAHROUF A.**, qui m'a formé au long de mon parcours universitaire, pour m'avoir prodigué, avec des qualités humaines et scientifiques exceptionnelles, des encouragements, des critiques constructives et surtout des conseils avisés. J'ai tout particulièrement apprécié son entière disponibilité, et la confiance qu'il a manifestée en me laissant une liberté d'initiative sur différents aspects au sein du laboratoire. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

Une bonne partie de ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UGSF (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille 1) dont je tiens à remercier tout le personnel, et tout particulièrement Madame Dr. **BOUCKAERT J.**, pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son équipe, et pour toute l'aide qu'elle m'a apporté. Sans oublier toute l'équipe du Pr. **DEVREESE B.** (Laboratoire de Biochimie des Protéines et d'Ingénierie Moléculaire, Ghent, Belgique).

Mes remerciements vont également à Messieurs Pr. **ARHAB R.**, Pr. **ABDENNOUR C.**, et Pr. **KHELILI K.** d'avoir accepté de participer à ce jury ainsi qu'à Monsieur Pr. **BOULAHROUF A.** d'avoir accepté de le présider.

Un grand merci à ma mère pour son soutien et son affection sans retenue au cours de mes longues années d'études.

Sans oublier l'ensemble des personnes que j'ai croisé au Biopole, mes collègues et amis, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
BSA	Bovine sérum albumine
Cas	Caséine
CH₃CN	Acétonitrile
COG	Clusters of Orthologous Groups
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
EB	Extrait brut
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ESI	Electrospray ionization (Ionisation par électronébuliseur)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétyl-Galactosamine
GF	Gastric fluid
GlcNAc	N-acétyl-Glucosamine
HA	Hémagglutination
HCD	Higher Energy Collision Dissociation
HCOOH	Acide formique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
HIV	Human Immunodeficiens Virus
HPLC	High-performance liquid chromatography
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
ISP₂	International <i>Streptomyces</i> Project
K	Indice phagocytaire
LC	Chormatographie liquide
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (désorption-ionisation laser assistée par matrice)
Man	Mannose

MET	Microscopie électronique a transmission
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NeuAc	Acide sialique
NH₄HCO₃	Bicarbonate d'ammonium
OMVs	Outer membrane vesicles
OppA	Oligopeptide-binding protein
Ova	Ovalbumine
PAMPs	motifs moléculaires associées aux pathogènes
PG	Peptidoglycane
pI	Point isoélectrique
PLGS	Protein Lynx Global Server
PM	Poids moléculaire
PMY	Polypeptone-Meat-Yeast agar
PQS	<i>Pseudomonas</i> quinolone signal
RES	Système réticulo-endothélial
SA	Sulfate d'ammonium
Sec	Secretory pathway
SHA	Activité hémagglutinante spécifique
SM	Segment transmembranaire
SPBs	Substrat Binding Protein
Tat	Twin Arginine Translocation
Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol
UH	Unité hémagglutinante
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
V₀	Volume mort
VMs	Vésicules membranaires

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs d'après (Bérdy, 2005)....	22
Tableau 2. Souches actinomycétales utilisées.....	38
Tableau 3. Activité hémagglutinante des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocytes utilisé.....	63
Tableau 4. Purification préliminaire des lectines à partir de la souche <i>M.aurantiaca</i> GF44c.	66
Tableau 5. Procédure de purification des lectines de la souche GF44c sur colonne Superose6.	66
Tableau 6. Effet des différents sucres, glycoprotéines et protéines sur l'activité hémagglutinante de la fraction P1 (test d'inhibition de l'hémagglutination).....	69
Tableau 7. Identification des protéines par spectrométrie de masse (bande protéique majoritaire sur gel d'électrophorese \approx 40kDa).....	72
Tableau 8. Identification des protéines vésiculaires (LC-MS/MS).....	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Rôle des lectines chez les microorganismes pathogènes pour reconnaître et adhérer aux glycoconjugués de la cellule hôte (Imberty and Varrot, 2008)......	5
Figure 2.	Exemple de structure quaternaire de lectines (Cioci, 2006).....	8
Figure 3.	Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie <i>Escherichia coli</i> (Lis and Sharon, 1998).....	16
Figure 4.	Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Prescott <i>et al.</i> , 2003).....	19
Figure 5.	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide (Prescott <i>et al.</i> , 2003).....	19
Figure 6.	Origine des produits microbiens bioactifs (Bérdy, 2005).....	22
Figure 7.	Répartition relative des souches productrices de biomolécules parmi les actinomycètes rares (selon la classification récente publiée dans l'Atlas des actinomycètes, Japon) (Lazzarini <i>et al.</i> , 2000; Tiwari and Gupta, 2012)......	24
Figure 8.	Structure de l'erythromycine produite par <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (Tiwari and Gupta, 2013)......	26
Figure 9.	Aspect morphologique des <i>Micromonospora</i>	31
Figure 10.	Le test d'hémagglutination sur microplaque de titration.....	40
Figure 11.	Représentation schématique des différentes étapes d'extraction, purification et caractérisation des lectines de la souche GF44c.....	43
Figure 12.	Identification protéique par spectrométrie de masse (Miguet, 2006).....	52
Figure 13.	Purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c sur colonne échangeuse d'ions (DEAE-cellulose).....	64
Figure 14.	Purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c sur colonne Sephadex G200	65
Figure 15.	Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel filtration Superose 6 (10/300GL) montrée sur système FPLC-AKTA explorer.....	67
Figure 16.	Test d'hémagglutination avec le sang de rat pour les différentes fractions obtenues après purification sur colonne Superose 6.....	67
Figure 17.	Test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction P1.....	68
Figure 18.	Effet de la température (A), et du pH (B) sur l'activité hémagglutinante de la fraction P1.....	70
Figure 19.	Effet de l'EDTA sur l'hémagglutination de fraction P1.....	70

Figure 20. Gel SDS-page (15%) de la fraction P1 après coloration au bleu de coomassie.	71
Figure 21. Micrographes des vésicules membranaires contenues dans la fraction P1.	74
Figure 22. Distribution de la taille (diamètre.nm) des vésicules contenues dans la fraction P1 en fonction du nombre (analyse DLS)	74
Figure 23. Distribution des protéines (vésicules/ protéome totale) en fonction de leur poids moléculaire et leur point isoélectrique (pI).	80
Figure 24. Localisations subcellulaires des différentes protéines vésiculaires identifiées par LC-MS/MS.	80
Figure 25. Classification fonctionnelle des protéines vésiculaires de la souche <i>M.aurantiaca</i> GF44c (A), et le protéome de <i>M.aurantiaca</i> ATCC 27029(B).	82
Figure 26. Test d'activité antimicrobienne de l'extrait vésiculaire de la souche GF44c.	84
Figure 27. Effet des vésicules membranaires de la souche <i>Micromonospora aurantiaca</i> GF44c sur l'activité phagocytaire.	86
Figure 28. Effet des vésicules membranaires sur la demi-vie des particules de carbone dans le sang des souris.	86
Figure 29. Effet des vésicules membranaires sur l'index phagocytaire corrigé.	87
Figure 30. Activité caséinolytique des vésicules membranaires.	87

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Les lectines

1. Généralités	3
2. Historique des lectines	4
3. Rôle des lectines	5
4. Spécificité et affinité	6
5. Multivalence	7
6. Sites de reconnaissance	8
7. Les activités biologiques des lectines	9
7.1. Activité agglutinante	9
7.2. Activité mitogène	10
7.3. Activité antivirale	10
7.4. Activité antifongique	11
7.5. Activité antibactérienne	12
7.6. Activité cytotoxique	12
7.7. Activité insecticide	13
8. Intérêt des lectines pour l'homme	13
9. Les lectines bactériennes	14
9.1. Les lectines solubles	15
9.2. Les toxines	15
9.3. Les adhésines	16

CHAPITRE II : Les Actinomycètes

1. Généralités et caractéristiques des actinomycètes	18
2. Les actinomycètes rares	23
2.1. Intérêt et caractéristiques des actinomycètes rares.....	23
2.2. Ecologie des actinomycètes rares.....	26
2.3. Isolement des actinomycètes rares.....	28
3. Le genre <i>Micromonospora</i>	30
3.1. Morphologie et structure cellulaire.....	31
3.2. Phylogénie.....	33
3.3. Conditions de croissance et physiologie.....	34
3.4. Ecologie.....	34
3.5. Métabolisme secondaire.....	36
3.6. Génomique et protéomique des <i>Micromonospora</i>	36

MATERIEL ET METHODES

1. Actinomycètes	38
2. Mise en évidence des lectines et sélection de la meilleure souche productrice	39
2.1. Fermentation.....	39
2.2. Extraction des lectines.....	39
2.2.1. Les lectines extracellulaires.....	39
2.2.2. Les lectines intracellulaires.....	40
2.3. Test d'héماغglutination et mise en évidence des lectines.....	40
2.4. Dosage des protéines (Bradford, 1976).....	41
3. Purification des lectines de la souche <i>M. aurantiaca</i> GF44c	42
3.1. Préparation de l'extrait brut.....	42
3.2. Purification préliminaire.....	42
3.2.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.....	42
3.2.2. Dialyse.....	44
3.2.3. Chromatographie.....	44
3.3. Purification sur système ÄKTA™ FPLC (gel filtration Superose 6).....	46

4. Caractérisation des lectines de la souche <i>M.aurantiaca</i> GF.44c	47
4.1. Test d'hémagglutination	47
4.2. Test d'inhibition de l'hémagglutination	48
4.3. Effet de la température, du pH , et de l'EDTA sur l'hémagglutination	48
4.4. Electrophorèse SDS-PAGE	49
4.5. Microscopie électronique à transmission (MET)	50
4.6. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	50
4.7. Spectrométrie de masse et étude protéomique	51
4.7.1. Identification des protéines sur gel d'électrophorèse	51
4.7.2. Identification protéomique totale	54
4.7.3. Analyse fonctionnelle des protéines identifiées	56
5. Activités biologiques	57
5.1. Test d'activité anti-microbien	57
5.1.1. Les souches tests	57
5.1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	58
5.1.3. Mise en évidence de l'activité antifongique	58
5.2. Test d'activité immunomodulatrice <i>in vivo</i>	59
5.2.1. Animaux	59
5.2.2. Indice phagocytaire	60
5.2.3. L'analyse statistique	61
5.3. Test d'Activité enzymatique	61

RESULTATS

1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante et sélection de la meilleure souche	62
2. Purification	62
2.1. Purification préliminaire	63
2.2. Purification FPLC (gel filtration-Superose 6 GL 10-30)	66
3. Caratérisation des molécules hémagglutinantes dans la fraction P1	68
3.1. Inhibition de l'hémagglutination	68
3.2. Effet de la Température, du pH et de l'EDTA sur l'hémagglutination	68
3.3. SDS-PAGE et spectromectrie de masse (Nano HPLC Q-Exactive plus)	71
4. Mise en évidence des vésicules membranaires (MET et DLS)	73

5. Etude protéomique des vésicules membranaires	75
5.1. Localisation protéines vésiculaires.....	75
5.2. Classification fonctionnelle des protéines vésiculaires.....	81
6. Activités biologiques	83
6.1. Activité antimicrobienne.....	83
6.2. Activité immunomodulatrice.....	85
6.3. Activité enzymatique.....	85
DISCUSSION GENERALE	88
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108
REFERENCES BIOBLOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des activités biologiques très importantes. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire des composés d'intérêt biologique est limitée à certains groupes de bactéries et de microorganismes eucaryotes. Les bactéries actinomycétales filamenteuses sont au premier rang. Ces bactéries ont une importance considérable dans les processus biotechnologiques grâce à leur capacité de produire un grand nombre d'antibiotiques et d'autres métabolites bioactifs (Zitouni *et al.*, 2005). Entre 1955 et 1980, près de 80% des antibiotiques découverts provenaient de la famille des actinomycètes, avec une large contribution du genre *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Cependant, depuis les années 1990, le taux de découverte de nouvelles molécules à partir des actinomycètes est en diminution remarquable, et très peu de molécules ont été commercialisées (Cattoir and Daurel, 2010). Parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activités biologiques, ou encore des composés mineurs (Bérdy, 2005), et avec l'émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules bioactives devient donc un besoin urgent.

L'une des stratégies proposée, est d'exploiter la diversité bactérienne afin de renouveler notre arsenal de molécules bioactives. Les chercheurs pensent que plusieurs souches microbiennes à fort potentiel ont été ignorées et peu exploitées par le passé. Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouvelles molécules bioactives, les chercheurs ont commencé à s'intéresser ces dernières années aux genres rares d'actinomycètes provenant essentiellement de niches écologiques extrêmes ou peu étudiées. L'exploration d'écosystèmes diversifiés favorise la détection d'actinomycètes rares pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérien et/ou antifongique important (Tiwari and Gupta, 2012, 2013). Malgré tous ces efforts, cela demeure insuffisant au regard de l'ampleur de l'antibiorésistance.

Ainsi, trouver d'autres alternatives aux antibiotiques classiques, en s'intéressant à d'autres classes de molécules bioactives est une autre solution proposée. Les peptides antimicrobiens, les bactériophages, les hydrolases de la paroi des bactéries ou des champignons, et les lectines sont de nouvelles alternatives aux molécules antibiotiques afin de lutter contre les microorganismes pathogènes (Parisien *et al.*, 2008).

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand. Ce sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes (Sharon and Lis, 2004).

Les lectines sont en fait les récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clés dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Ce n'est que récemment, que nous avons commencé à considérer les lectines comme des molécules bioactives et nous nous sommes intéressés, de plus en plus, aux rôles biologiques de ces molécules. Les Lectines possèdent plusieurs propriétés biologiques notamment : des activités mitogènes (stimulation lymphocytaire) (Singh *et al.*, 2010), inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Bovi *et al.*, 2011), actions antivirales (Zhao *et al.*, 2010), antibactériennes (Nunes *et al.*, 2011), antifongiques (Amano *et al.*, 2012), et des effets immunologiques et toxicologiques (Jeurink *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2012). Ces diverses propriétés sont à la base de l'utilisation récente des lectines dans les domaines biomédicaux (hématologie, immunologie, oncologie, biologie cellulaire), agronomique et biotechnologie (défense des plantes contre les agents pathogènes).

Depuis des décennies, La plupart des études concernant les propriétés biologiques des lectines étaient axées sur les lectines végétales. Mais ces dernières années, les lectines microbiennes commencent à recevoir un grand intérêt parmi les scientifiques en raison de leurs activités antimicrobiennes, antitumorales, anti-prolifératives et immunomodulatrices, très intéressantes (Singh and Walia, 2014). Les actinomycètes rares constituent donc une source inédite et originale pour l'étude des protéines bioactives comme les lectines, surtout que très peu d'études se sont intéressées à l'étude de ces molécules chez ce groupe bactérien.

Les travaux de recherche de cette thèse s'inscrivent dans cette volonté de mettre en évidence de nouvelles molécules bioactives d'origine protéique à partir de microorganismes peu étudiés. Notre objectif principal est l'isolement de nouvelles lectines bioactives à partir de six souches actinomycétales appartenant principalement à des genres rares. Cet objectif se décompose en plusieurs étapes :

- Mettre en évidence la production de lectines par des souches d'actinomycètes appartenant à des genres rares, en utilisant différents milieux de cultures ;
- Sélectionner les meilleures souches productrices de lectines ;
- Purifier et caractériser ces molécules ;
- Etudier leurs activités biologiques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Les Lectines

1. Généralités

Les lectines sont des protéines fonctionnelles qui, tout comme les enzymes et les anticorps, ont la capacité de reconnaître spécifiquement et de fixer de manière non covalente et réversible un ligand, particulièrement les sucres. Dotées d'un domaine de liaison des sucres dit CRD pour « carbohydrate recognition domain » (séquence peptidique invariante ou très bien conservée qui forme le domaine structural minimal nécessaire à la reconnaissance du sucre), les lectines sont capables de fixer de manière réversible un sucre simple ou sous forme d'oligosaccharide. Les interactions sucre-lectine se produisent en général via des liaisons hydrogène, des contacts hydrophobes ou par l'intermédiaire de cations (Kocourek and Horejsi, 1981). Le mot *lectine* dérive du verbe latin *légere* qui veut dire « sélectionner » ou « choisir », un nom bien approprié pour cette très importante classe de protéines.

Les lectines sont des molécules ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capable d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines sont généralement multivalentes. Les méthodes anciennement utilisées pour leur identification consistent à mélanger l'extrait à examiner (dérivé par exemple d'un tissu ou d'une plante) avec des érythrocytes en solution. L'agglutination ou la précipitation des cellules indique que la solution analysée contient une (ou parfois plusieurs) molécules agglutinantes. Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle mais la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixante, en concomitance avec la naissance de la glycobiologie. L'intérêt était motivé surtout par l'utilisation des lectines dans la détection, l'isolation et la caractérisation d'oligosaccharides, tels que les déterminants des groupes sanguins et de glycoconjugués, surtout des glycoprotéines. La découverte majeure que certains états physiologiques et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules fut possible grâce à l'utilisation des lectines. Le nombre de travaux publiés sur les lectines a vu une grande croissance principalement grâce à l'abondance des lectines dans tous les organismes vivants, accompagné d'une certaine facilité de purification. Dans les derniers temps, on a aussi commencé à considérer les lectines

comme des molécules bioactives et on s'est de plus en plus intéressé aux rôles biologiques de ces molécules (Cioci, 2006).

2. Historique des lectines

Vers la fin du 19^{ème} siècle, des preuves de la présence dans la nature de protéines qui possèdent la capacité d'agglutiner les érythrocytes, ont commencé à s'accumuler. A l'époque et au regard de leurs provenances essentiellement d'extrait de plantes, ces protéines sont appelées phyto-agglutinines ou hémagglutinines. Les prémices de la découverte des hémagglutinines viennent avec la description et l'isolement vers 1888 par Peter Hermann Stillmark d'une protéine hautement toxique extraite de *Ricinus communis* et baptisée ricine (Sharon and Lis, 2004). Par la suite, Hellin H. a démontré la présence d'une autre hémagglutinine toxique, l'abrine, dans des extraits *Abrus precatorius*. Les recherches menées simultanément avec ses deux lectines ont ainsi montré la spécificité de la réponse et le phénomène de la mémoire immunologique, et le transfert de l'immunité humorale.

L'extraction et la purification en 1919 de la Concanavaline A à partir de *Canavalia ensiformis* par James B. Sumner a marqué le début d'une nouvelle ère pour la recherche des hémagglutinines (Sharon and Lis, 2004). Entre 1954 et 1956, Olavi Makela, alors doctorant à Renkonen, a examiné des extraits de graines représentant 743 espèces végétales de 165 genres, tous de la famille des légumineuses, et a détecté une activité hémagglutinante dans plus d'un tiers d'entre eux, et près d'un dixième des hémagglutinines exposaient une spécificité pour un groupe sanguin (Ando *et al.*, 2001).

La capacité des agglutinines de plantes à distinguer entre les érythrocytes de différents groupes sanguins conduit à proposer pour eux le nom des lectines, du latin légère ce qui signifie « choisir, discriminer ». Ce terme a été généralisé par la suite pour englober toutes les protéines d'origine non immune qui lient des structures saccharidiques de manière réversible et ne possédant pas d'activité enzymatique (Sharon and Lis, 2004).

Dans les années 1960, l'attitude de la communauté scientifique envers les lectines, particulièrement les biochimistes et les immunologistes, a changé. Les scientifiques se sont penchés sur l'aspect structural des lectines. Ces études vont de la caractérisation physicochimique des lectines au séquençage des acides aminés et l'élucidation de leur structure 3D (Sharon and Lis, 2004). En 1970, a été introduite la purification des glycoprotéines basée sur les lectines immobilisées (Donnelly and Goldstein, 1970). Depuis lors, l'intérêt que portent les scientifiques aux lectines ne cesse d'augmenter. Les lectines

représentent des réactifs extrêmement précieux pour l'investigation des sucres aux surfaces cellulaires, l'évaluation du rôle de ceux-ci dans la croissance cellulaire et la différenciation, l'analyse des interactions des cellules avec leur environnement et l'étude de leurs implications dans divers processus pathologiques (Sharon and Lis, 2004).

3. Rôles des lectines

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié sans doute à leur capacité unique de « lire » l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Les lectines sont en fait les récepteurs spécifiques pour les interactions protéine-sucre qui jouent des rôles clé dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (Wiley and Skehel, 1987). De la même façon, les lectines situées sur la surface des bactéries, des virus ou des parasites intestinaux reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection (**Figure 1**). Les rôles joués par les lectines des plantes restent toujours un mystère. Une hypothèse très probable est le rôle de défense du végétal contre les phytopathogènes (ou contre les animaux qui peuvent se nourrir de la plante). D'autres auteurs ont stipulé un rôle des lectines dans l'association entre les plantes (particulièrement les légumineuses) et le rhizobium pour la fixation de l'azote (Kijne *et al.*, 1997).

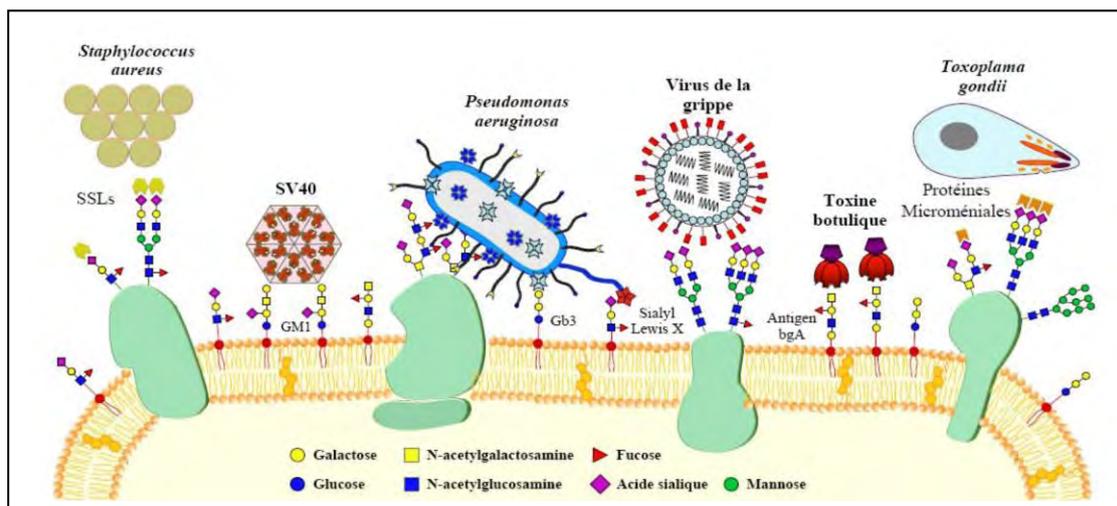


Figure 1. Rôle des lectines chez les microorganismes pathogènes pour reconnaître et adhérer aux glycoconjugués de la cellule hôte (Imberly and Varrot, 2008).

Les lectines animales sont impliquées dans divers processus biologiques cruciaux notamment les reconnaissances cellules-cellules, la migration cellulaire et la communication inter et intracellulaires (Sharon, 2007). L'étude des rôles joués par les lectines dans les processus biologiques a été au centre de plusieurs travaux de recherche.

Ainsi, Bevilacqua *et al.*, ont mis en évidence l'implication des sélectines dans le recrutement des lymphocytes via les glycoconjugués présents sur leurs surfaces (Bevilacqua *et al.*, 1991). Les lectines animales ont des rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. Lors du processus de fertilisation, le premier contact entre les cellules reproductrices fait intervenir une reconnaissance spécifique entre une lectine du spermatozoïde (spermadhésine) et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). L'intérêt porté aux lectines s'est intensifié suite aux différentes découvertes relatives à leurs rôles biologiques. Ainsi, elles ont été utilisées comme outil de biochimie pour analyser les membranes cellulaires.

4. Spécificité et affinité

Sharon et Lis, divise les lectines en cinq classes en fonction de leur maximum d'affinité pour le mannose (Man), le galactose (Gal) ou N-acétylgalactosamine (GalNAc), la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) ou l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (Lis and Sharon, 1998). Ces monosaccharides et leurs dérivés sont les unités typiques des structures d'oligosaccharides sur les surfaces cellulaires, les autres ne s'y retrouvent que rarement. Les lectines reconnaissent également de manière spécifique des oligosaccharides. L'affinité des lectines pour les monosaccharides est généralement assez faible en comparaison avec leur affinité pour les oligosaccharides (Dam and Brewer, 2002). L'affinité est généralement modulée par la présence d'un substituant sur le carbone anomérique du monosaccharide et donc ces lectines reconnaissent aussi des di- ou trisaccharides. La similitude topologique entre certains monosaccharides est déterminante pour la spécificité: par exemple, la plupart des lectines, qui reconnaissent le Gal, lient aussi le GalNAc. Certaines lectines présentent une affinité pour des monosaccharides qui ne semblent pas être structurellement proches, par exemple Fuc, Man et Fru (fructose). Pourtant, les trois fonctions hydroxyles, qui sont fondamentales pour la liaison du sucre à la lectine, ont une topologie très similaire, et pour cette raison, ces trois ligands s'attachent à la lectine PA2L de *Pseudomonas aeruginosa* (Loris *et al.*, 2003).

La classification des lectines en fonction de leur spécificité pour des monosaccharides n'est cependant pas tellement adaptée, si on considère que ces protéines présentent une affinité beaucoup plus forte pour les oligosaccharides. Pour la reconnaissance des structures oligosaccharidiques, la similitude topologique joue un rôle encore plus important. La surface d'une lectine peut porter plusieurs sites qui peuvent reconnaître des unités saccharidiques: le site principal reconnaît spécifiquement les unités monosaccharidiques, alors que les sites secondaires (appelés parfois "les sites hydrophobes") reconnaissent, par exemple, les aglycones hydrophobes, ou bien précisent la spécificité de la lectine envers les oligosaccharides particuliers (Loris *et al.*, 1998). La protéine peut donc présenter une affinité pour plusieurs oligosaccharides, dont la topologie et l'arrangement spatial correspondent à la surface de la protéine. Par exemple, La galectine-3 humaine présente une affinité envers plusieurs oligosaccharides (Bachhawat-Sikder *et al.*, 2001). Les oligosaccharides sont reconnus par les lectines dans une conformation unique, qui ne doit pas forcément correspondre à la conformation de plus basse énergie que l'oligosaccharide adopterait en solution (Bush *et al.*, 1999). L'affinité montrée pour les oligosaccharides est généralement beaucoup plus élevée que pour les monosaccharides par la présence de sites de liaison plus profonds formant plus de contacts avec le ligand.

5. Multivalence

Un concept important sur la structure moléculaire des lectines est celui du *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD), introduit pour la première fois chez les lectines animales (Drickamer, 1988). Il s'agit généralement d'une séquence peptidique invariante ou très bien conservée qui forme le domaine structural minimal nécessaire à la reconnaissance du ligand. La multivalence, propriété fondamentale pour l'activité des lectines, se traduit par la liaison de plusieurs molécules de glucides à une molécule (ou à un assemblage de molécules) de lectine. Dans certains cas, un monomère de lectine peut porter un ou plusieurs sites de liaison pour le glucide (**Figure 2, A**). Dans d'autres cas, des monomères de lectines avec un seul site s'associent souvent sous la forme de dimères, trimères, tétramères etc. (**Figure 2, B**), qui créent aussi une multivalence pour les glucides. Une autre classe de lectines montre la présence de deux CRD distincts reliés par un domaine de jonction (*linker*). Les deux domaines peuvent montrer des spécificités différentes (**Figure 2, C**) ou bien l'un d'entre eux peut avoir une activité enzymatique (ou autre) (**Figure 2, D**) comme dans le cas des lectines appelés *chimerlectines*. Les interactions multiples entre la protéine et le glucide sont

probablement impliquées dans le processus de reconnaissance (Lee and Lee, 1995). Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques semblent utiliser des interactions faibles mais multivalentes plutôt qu'une seule interaction forte. La multivalence est donc employée non seulement pour atteindre l'affinité, ou l'avidité nécessaire, mais aussi pour assurer la haute spécificité pour les interactions avec certains types de surfaces cellulaires.

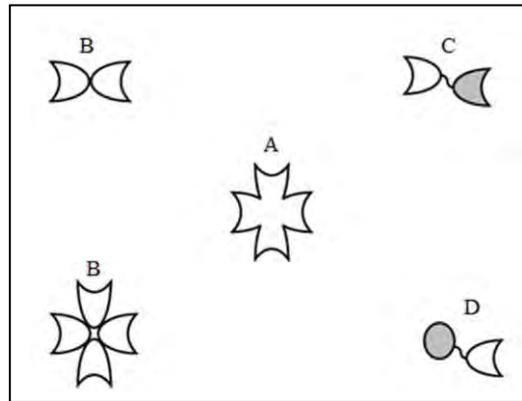


Figure 2. Exemple de structure quaternaire de lectines (Cioci, 2006).

6. Sites de reconnaissance

Toutes les informations disponibles sur les modes de reconnaissance ont été établies sur la base de l'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre. Dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides, les sites de liaison sont généralement des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes. Les liaisons hydrogène entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et très directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité. Les chaînes latérales des résidus chargés comme l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine et l'arginine sont souvent impliquées dans les liaisons hydrogène avec les ligands (Cioci, 2006).

Les groupements NH ou CO de la chaîne principale de la protéine participent souvent à la reconnaissance. Une importante contribution à la force de l'interaction vient parfois des interactions hydrophobes. Les sucres sont des molécules très polaires mais la disposition des groupements OH peut créer des zones hydrophobes qui peuvent donner lieu à des interactions avec les résidus aromatiques, comme la tyrosine ou le tryptophane. Ce type d'interaction est appelé *stacking interaction* (Vyas, 1991).

Dans les lectine de type C un atome de calcium est coordonné par les chaînes latérales des acides aminés dans les sites de liaison est par deux des hydroxyles 2-OH, 3-OH et 4-OH du sucre, qui est généralement un fucose, un mannose, ou moins fréquemment un galactose (Drickamer, 1996). La lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa*, adopte un repliement protéique différent des lectines de type C mais elle reconnaît le galactose par une interaction très similaire. Une nouvelle classe de protéines présentant une grande affinité pour le fucose/mannose a été trouvée chez certaines bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum* et *Ralstonia solanacearum*. Ces lectines montrent la présence exceptionnelle de deux atomes de calcium dans le site de liaison.

Les interactions de type salin ne sont généralement pas impliquées dans les interactions lectine-sucre sauf pour des glucides chargés comme l'acide sialique (Grootenhuis and Van Boeckel, 1991). Le contact entre le ligand et la protéine est parfois facilité par les molécules d'eau, interposées entre la lectine et le glucide (Bourne *et al.*, 1990; Loris *et al.*, 1994).

7. Les activités biologiques des lectines

7.1. Activité agglutinante

La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Pour cette raison, l'interaction de lectines avec les glucides présents à la surface des cellules comme les érythrocytes résulte en la formation d'un réseau entre les cellules, qui entraîne leur agrégation et précipitation (l'hémagglutination). Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (Rüdiger, 1993) et leur caractérisation (Goldstein and Poretz, 1986).

L'agglutination est un processus complexe qui dépend de plusieurs facteurs internes tels que les propriétés moléculaires de la lectine (par exemple, la taille moléculaire, le nombre de sites de liaisons aux glucides, l'affinité de la liaison, les propriétés de surface de la cellule, le nombre et l'accessibilité des lectines aux ligands glucidiques, et l'état métabolique de la cellule) (Wood, 1995). En plus de ça d'autres facteurs externes peuvent affecter le processus d'agglutination, en particulier, la température, le type de cellules utilisées, et la concentration des cellules.

Les activités d'agglutination et de précipitation des lectines sont similaires à celles des anticorps qui peuvent être inhibés par des composés de bas poids moléculaire appelées

haptènes. L'agglutination des lectines elle aussi peut être inhibée par l'ajout de certains sucres, ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (Van Damme *et al.*, 1999).

7.2. Activité mitogène

Certaines lectines peuvent stimuler les mitoses des lymphocytes ou l'induction de transformations blastiques. La Concanavaleine A et la PHA, la lectine du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), sont en particulier des lectines mitogènes qui font l'objet de nombreux travaux en immunologie. Ces recherches ont engendré une croissance explosive de l'utilisation des lectines mitogéniques dans la recherche biologique. Les lymphocytes stimulés produisent des facteurs de croissance tels que les lymphokines et les cytokines. Lorsque le système immunitaire est défaillant, la réponse mitogénique est affectée (Mier and Gallo, 1982). Les lectines offrent alors un moyen d'évaluer la compétence immunitaire des patients et de surveiller les effets des différents traitements immunothérapeutiques (Sharon, 2007). Elles sont régulièrement employées dans les laboratoires cliniques.

7.3. Activité antivirale

La surface des Rétrovirus tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de nombreux autres virus enveloppés sont couvertes par des glycoprotéines codées par les virus. Les glycoprotéines gp120 et gp41 présentes sur la surface du VIH sont fortement glycosylées. On estime que les glycanes représentent plus de 50% de la masse moléculaire de gp 120 (Mizuochi *et al.*, 1988; Ji *et al.*, 2006). L'activité antivirale des lectines semble dépendre de leur aptitude à se lier à des oligosaccharides contenant du mannose, présents sur la surface des glycoprotéines de l'enveloppe virale. Les agents qui interagissent spécifiquement et fortement avec ces glycanes peuvent perturber les interactions entre les protéines de l'enveloppe virale et les cellules de l'hôte (Botos and Wlodawer, 2005; Balzarini, 2006). Les lectines peuvent se lier à la surface virale et prévenir d'autres interactions avec d'autres co-récepteurs. (Sacchettini *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2002)

Contrairement à la plupart des agents thérapeutiques antiviraux actuels qui agissent par l'inhibition du cycle de vie du virus. Les lectines peuvent empêcher la pénétration des virus dans les cellules hôtes. Les lectines antivirales, sont mieux adaptées à des applications topiques, et peuvent présenter une toxicité plus faible que de nombreux traitements antiviraux actuellement utilisés. En plus, ces protéines sont souvent résistantes aux températures élevées et aux pH acides.

L'activité antivirale d'un certain nombre de lectines qui possèdent une affinité aux glucides riches en mannose a été décrite par le passé. Des exemples de ces lectines comprennent la Jacaline (O'Keefe *et al.*, 1997), Concanavaleine A (Hansen *et al.*, 1989), agglutinine de *Urtica dioica* (Balzarini *et al.*, 1992), la lectine isolée *Myrianthus holstii* (Charan *et al.*, 2000), et la lectine de *Narcissus pseudonarcissus* (Balzarini *et al.*, 1991). Les lectines dérivés d'organismes marins présentent une source riche de produits antiviraux naturels (Tziveleka *et al.*, 2003), comme la CV-N (Boyd *et al.*, 1997), SVN (Bokesch *et al.*, 2003), MVL (Bewley *et al.*, 2004) et GRFT (Mori *et al.*, 2005), qui présentent les activités les plus élevées parmi les lectines qui ont été étudiées jusqu'à présent (Ziółkowska and Wlodawer, 2006). Keyaerts *et al.*, décrivent l'activité antivirale des lectines d'origine végétales possédant une spécificité pour différents structures glycaniques contre le Coronavirus (SARS-CoV), responsable des infections des voies respiratoires inférieures chez les humains (Keyaerts *et al.*, 2007). L'activité de la lectine KAA2 extraite à partir d'algues rouge *Kappaphycus alvarezii* a été testée contre diverses souches du virus de la grippe, y compris le récent virus pandémique de la grippe H1N1. Cette lectine montre la capacité d'inhiber toutes les souches virales de la grippe (Sato *et al.*, 2011).

L'actinohivine est une lectine isolée à partir d'un genre rare d'actinomycètes *Longispora albida*, cette lectine possède une grande affinité au mannose et montre une très forte activité contre le virus du VIH, cette activité se traduit également par une liaison de la lectine avec la glycoprotéine gp120 (Chiba *et al.*, 2004).

7.4. Activité antifongique

Malgré le grand nombre de lectines et des hémagglutinines qui ont été purifiées, seules quelques-unes manifestent une activité antifongique. Il a été démontré que le champignon phytopathogène *Trichoderma viride* induit la production de lectines dans les cellules vasculaires des racines et des tiges chez *Gastrodia elata*. Ceci indique que les lectines sont probablement des protéines de défense chez les plantes (Sá *et al.*, 2009). Les lectines végétales ne peuvent ni se lier aux glycoconjugués présents sur les membranes fongiques ni pénétrer dans le cytoplasme en raison de la paroi cellulaire. Il est peu probable que les lectines inhibent directement la croissance fongique en modifiant la structure et/ ou sa perméabilité. Cependant, la liaison des lectines à la surface des membranes fongiques peut avoir des effets indirects. Les lectines d'*Urtica dioica* semble inhiber la synthèse de la paroi fongique (Van

Parijs *et al.*, 1991). Les effets des lectines extraites d'orties sur la paroi fongique et la morphologie des hyphes suggèrent que ces lectines possèdent la capacité de réguler la colonisation endomycorhizienne des rhizomes (Van Parijs *et al.*, 1991).

7.5. Activité antibactérienne

plusieurs lectines montrent également des activités antibactériennes très intéressantes (Jensen *et al.*, 1997; Ottinger *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2004; Tasumi *et al.*, 2004). Une nouvelle lectine isolée à partir du venin de serpent *Bothrops leucurus* montre une activité antibactérienne envers des bactéries pathogènes Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*) (Nunes *et al.*, 2011). Les lectines isolées à partir des graines d'arachides *Archidendron jiringa* montre une activité inhibitrice contre *B. subtilis* et *S. aureus*, mais pas d'activité contre *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Charungchittrak *et al.*, 2011). Beaucoup d'études montrent que les lectines ayant une affinité aux acides sialiques, ont la capacité d'agglutiner les bactéries. La lectine (SNA1) isolée à partir de *Sorbus nigra* peut agglutiner la souche *Streptococcus suis* (Charland *et al.*, 1995). La lectine isolée de *Penaeus merguinsis* quant à elle, est capable d'agglutiner les souches de *Vibrio* (Utarabhand *et al.*, 2007).

7.6. Activité cytotoxique

Les lectines font l'objet de nombreuses études toxicologiques. Depuis des années, elles sont en effet retrouvées dans beaucoup de plantes destinées à l'alimentation animale ou humaine (la lectine de la légumineuse tropicale *Canavalia ensiformis* n'est qu'un exemple parmi d'autres) et induisent fréquemment une diminution de la valeur nutritionnelle des matières premières végétales qui en contiennent (Jaffé and Seidl, 1992). Les haricots contiennent ainsi des fractions protéiques hémagglutinantes qui affectent la croissance et peuvent causer la mort d'animaux qui en consomment. Le mode d'action des lectines n'est qu'imparfaitement connu. Un des modes d'action invoqués chez le rat serait une liaison des lectines (PHA ou ConA) avec des groupements récepteurs de la surface des cellules de la muqueuse intestinale pouvant induire des défauts d'absorption des nutriments (Pusztai, 1991).

7.7. Activité anti insecticide

Les premiers travaux portant sur l'identification de lectines comme facteurs biochimiques de résistance des plantes à des insectes concernent essentiellement les Coléoptères. En 1976, Janzen et Juster montrent que des larves de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius), sont incapables d'attaquer des graines de haricot commun, *Phaseolus vulgaris*, du fait de la présence d'une lectine, la PHA. Il semble que les lectines à galactosamine et à glucosamine soient plus particulièrement toxiques pour les espèces de coléoptères étudiées, mais des lectines à mannose (lectine du pois, PSA, et du perce-neige, GNA), se montrent également actives sur *Callosobruchus maculatus* (Czapla and Lang, 1990).

Une lectine de Césalpiniacées (*Bauhinia purpurea* L., BPA) est très toxique vis-à-vis de la pyrale, de même que les seules lectines testées des familles de Poacées (WGA) et d'Euphorbiacées (RCA). La lectine du soja (SBA) provoque seulement une inhibition de croissance des larves d'*Ostrinia nubilalis* de l'ordre de 25 %, à la concentration de 1 % (Czapla and Lang, 1990), alors que Shukle et Murdock, observent à cette même concentration une forte toxicité vis à vis de *Manduca sexta* (L.) (Shukle and Murdock, 1983). Les travaux de Rahbé et Febvay, montrent, qu'administrée en milieu artificiel, la lectine à mannose/glucose, la Concanavaline A présente des propriétés toxiques intéressantes vis à vis du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Rahbé and Febvay, 1993).

8. Intérêt des lectines pour l'homme

Les lectines peuvent interagir avec des systèmes biologiques et développer une diversité d'événements et fonctions dans ses organismes vivants. Ces interactions ont une grande importance car elles se retrouvent impliquées dans des processus biologiques ainsi que dans des processus pathologiques (Lis and Sharon, 1998). Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical.

- De par leur spécificité, les lectines immobilisées sur colonne peuvent être utilisées pour l'identification, la purification de glycoconjugués aussi bien que pour leur caractérisation (Hirabayashi, 2004).

- Certaines lectines reconnaissent spécifiquement les antigènes des groupes sanguins humains (Boyd and Shapleigh, 1954) et sont utilisées pour leur identification dans des banques de sang.
- Certaines lectines purifiées à partir des graines de légumineuses tropicales présentent des propriétés anti-inflammatoires (Alencar *et al.*, 2005).
- L'adhésion de certaines bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte est assurée par les lectines qui sont présentes sur la surface bactérienne et qui s'attachent aux glycoprotéines ou glycolipides sur les surfaces cellulaires de l'hôte (Sharon and Ofek, 2000). L'affinité des lectines pour les glucides est d'habitude relativement basse. Par modification chimique, on peut obtenir une augmentation d'affinité de plusieurs ordres. Par cette approche, on peut envisager de concevoir des glucides antiadhésifs qui s'attacheraient aux lectines bactériennes avec une affinité plus forte que leurs ligands naturels et empêcheraient la bactérie d'adhérer aux cellules de l'hôte, ce qui est généralement le premier pas de l'infection bactérienne (Sharon and Ofek, 2000).
- Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histo-chimiques puisque certaines maladies tel le cancer sont associées à une modification des glycannes présents sur les cellules (Guillot *et al.*, 2004).

9. Les lectines bactériennes

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol et jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte pendant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré bien évidemment beaucoup d'attention dans ces dernières années (Sharon, 1996). Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles: les adhésines, les toxines et les autres lectines solubles qui n'appartiennent pas aux deux premières classes (Imberty *et al.*, 2005).

9.1. Les lectines solubles

Dans cette famille de lectines bactériennes on regroupe toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie ayant une affinité pour des sucres et ne montrant pas d'activité enzymatique. Seul un petit nombre de lectines solubles ont été caractérisées et le domaine d'étude est en pleine expansion. Deux lectines, nommées PA-IL et PA-IIL sont produites par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. *Chromobacterium violaceum* est aussi un pathogène pour les humains et produit une lectine, CV-IIL, ayant une forte homologie de séquence avec PA-IIL. RSL est une lectine produite par la bactérie *Ralstonia solanacearum*, qui attaque les racines des plantes. La séquence montre la présence de deux motifs peptidiques répétés et dans la structure cristalline trois monomères s'associent pour former une structure de type β -propeller à six lames. RSL est la seule protéine qui adopte une structure tertiaire β -propeller dérivée par l'oligomérisation des sous-unités et non par le repliement dans la chaîne (Kostlánová *et al.*, 2005).

La Cyanovirine-N, produite par la cyanobactérie *Nostoc ellipsosporum* est sans doute la lectine bactérienne la plus connue et mieux étudiée, car cette protéine montre une puissante activité antivirale et plus précisément elle est capable d'inhiber le virus du SIDA (HIV) (Boyd *et al.*, 1997). Sa structure tridimensionnelle résolue d'abord par NMR et ensuite par cristallographie a montré un nouveau domaine de reconnaissance (Bewley, 2001). La Cyanovirine-N reconnaît avec une très forte affinité les oligosaccharides mannosylés (oligomannose-8 et -9) de la glycoprotéine gp120 qui forme l'enveloppe extérieure du virus.

9.2. Les toxines

Les toxines sont des protéines secrétées par la bactérie qui montrent une activité toxique directe dans les cellules cibles. L'endommagement de la cellule peut advenir par la rupture de la paroi cellulaire, par l'inhibition de la synthèse protéique ou par l'activation des métabolismes secondaires. Les toxines du type AB₅ sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*E.coli* (ETEC), *Shigella dysenteriae* et *Borderella pertussis*. Ces toxines sont formées d'une sous-unité A qui est responsable de l'activité enzymatique et d'une ou plusieurs sous-unités B qui sont spécialement conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire, comme le GM1, GM2 et le Gb3 (Merritt and Hol, 1995).

9.3. Les adhésines

Certaines bactéries, principalement les Gram négatif et exceptionnellement les Gram positif, présentent à leurs surfaces des organelles dites fimbriae ou pili. Les pili interviennent dans divers processus, notamment, la reconnaissance et l'adhésion sur les cellules. Ils sont donc les principaux responsables de processus pathogènes envers les organismes eucaryotes. Les pili sont des structures protéiques filamenteuses de 1 à 2 μm de longueur exprimés en centaines de copies à la surface de la bactérie. Trois types de pili ont été distingués; les pili de type IV, les pili de type P et les pili de type I. Bien que de natures différentes, l'organisation structurale des pili est similaire (Soto and Hultgren, 1999). Le mode d'assemblage des pili de type I et ceux de type P est le même. Il fait intervenir une voie dite chaperone-usher (Nishiyama *et al.*, 2005; Kline *et al.*, 2010). La partie principale qui émerge de la surface de la bactérie est une longue structure hélicoïdale polymérique rigide, assemblée à partir des nombreux monomères. Les sommets des pili peuvent contenir une lectine (adhésine) reliée au dernier monomère du pilus par une partie flexible (monomères adaptateurs) (**Figure 3**).

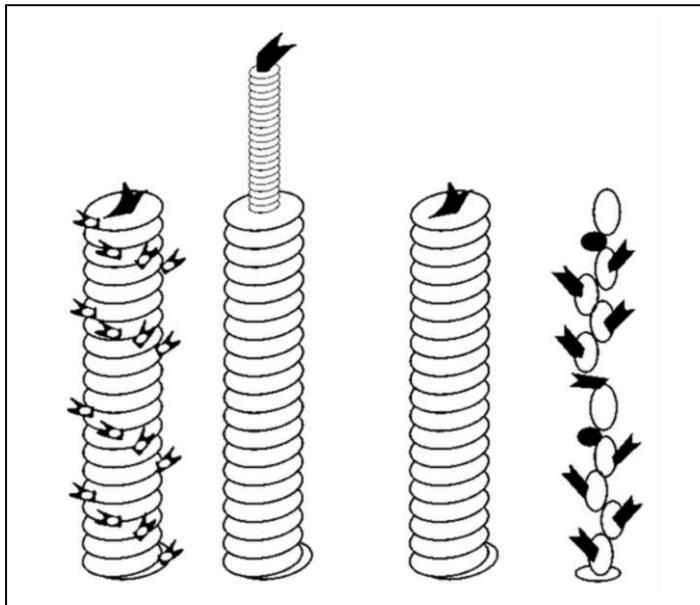


Figure 3. Représentation schématique de différents fimbriae de la bactérie *Escherichia coli* (Lis and Sharon, 1998)

Les protéines réceptrices appartenant à la famille des SBP (Substrat binding protein) forment une autre classe d'adhésines. Ces protéines souvent associées à des complexes protéiques membranaires de transport. Les SBP sont généralement associées à des ABC transporteurs chez les procaryotes (Berger, 1973; Berger and Heppel, 1974; Tam and Saier,

1993; Quioco and Ledvina, 1996; Wilkinson, 2002), mais il a été démontré plus récemment qu'elles peuvent faire partie d'autres complexes protéiques (Felder *et al.*, 1999; Misono, 2002; Neiditch *et al.*, 2006; Gonin *et al.*, 2007; Mulligan *et al.*, 2009). Ce sont des protéines de fixation spécifique qui sont responsables de la capture du substrat et de l'adhésion. Elles présentent des affinités pour les glycoprotéines, les oligopeptides, les acides aminés, les vitamines, en plus des carbohydrates (Tam and Saier, 1993; Quioco and Ledvina, 1996).

Chez les bactéries à Gram négatif, elle est sécrétée dans le périplasme (Neu and Heppel, 1965) alors que chez les bactéries à Gram positif et les Archae, elle est transloquée vers la face externe de la cellule par la voie générale de sécrétion Sec, son peptide signal est clivé, pour être ensuite ancrée à la face externe de la membrane. Cet ancrage est permis par la présence d'une extension N-terminale lipidique hydrophobe (Gilson *et al.*, 1988). Dans ces différentes configurations, la protéine de fixation peut avoir une mobilité relative, qui est cependant limitée par la consistance gélatinée du périplasme chez les bactéries à Gram négatif, et par l'association avec la membrane cytoplasmique chez les bactéries à Gram positif.

CHAPITRE II : Les Actinomycètes

1. Généralités et caractéristiques des actinomycètes

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à la classe des Actinobacteria. Cette classe regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" relativement élevé dans leur ADN ($G + C > 55$ mol %). Plusieurs forment peuvent être observés, allant de la cellule coccoïde ou bacillaire jusqu'à un mycélium complexe générateur de spores enveloppées dans un sporange chez certains genres (Ensign, 1978; Larpent and Sanglier, 1989; Chun *et al.*, 1997). Les actinomycètes se rapprochent des champignons essentiellement par l'existence de filaments ramifiés, ressemblance morphologique assez superficielle (Stackebrandt *et al.*, 1997). Ils forment des filaments ramifiés qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination : le mot «Actinomycètes» provient de deux substantifs grecs 'aktis' (rayon) et 'mykes' (champignon) et signifie «Champignons rayonnants» (Gottlieb, 1973; M. P. Lechevalier and Lechevalier, 1981; Allan and Prosser, 1983). La phylogénie moléculaire a montré sans appel l'appartenance des actinomycètes aux Eubactéries. Par ailleurs, la composition de leur paroi et leurs sensibilité aux antibactériens les rapprochent des Eubactéries (Stackebrandt *et al.*, 1997). Cependant leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Ottow and Glathe, 1968; Larpent and Sanglier, 1989). La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien (**Figure 4**). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture, ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Holdfasts) (Kalakoutskii and Agre, 1976). En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Van Keulen *et al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets. Le cycle de développement des actinomycètes est très similaire à celui des champignons (**Figure 5**), à la différence essentielle que ces bactéries demeurent haploïdes durant tout le cycle.

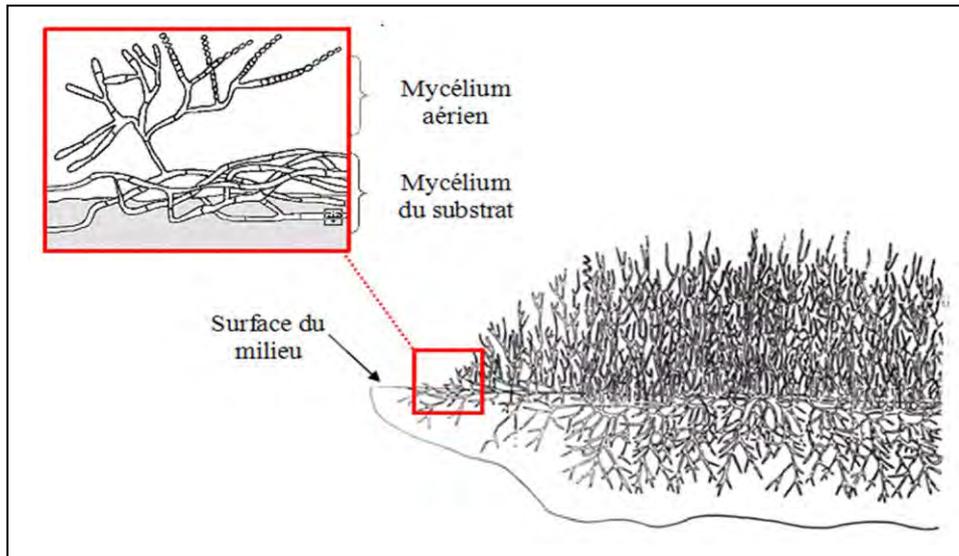


Figure 4. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Prescott *et al.*, 2003).

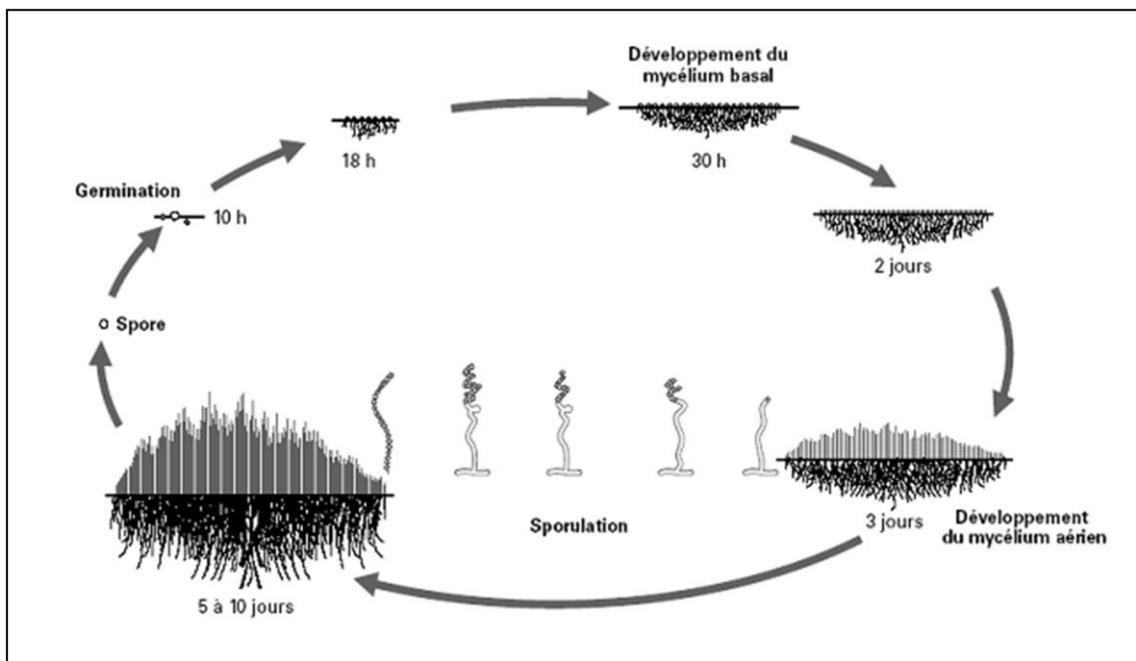


Figure 5. Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Prescott *et al.*, 2003)

Il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire (mycélium du substrat) formé d'hyphes non septés, ramifié et ancré dans le milieu solide (Miguélez *et al.*, 1999, 2000). À partir de ce mycélium primaire s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien, ce mycélium prend naissance après autolyse du mycélium de substrat (Locci and Sharples, 1984).

Plusieurs de ces bactéries produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Les spores des actinomycètes sont de deux sortes. Les endospores, produites par des actinomycètes thermophiles, proviennent de la cassure de la paroi de l'hyphe. Les Exospores ou les spores de « segmentation » naissent par suite de cloisonnements à l'intérieur des hyphes (Waksman, 1950). D'un genre à l'autre, les spores des actinomycètes s'organisent en diverses structures:

- Les conidies, ce sont des spores asexuées. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*) ;

- les Sporangies, c'est des sacs contenant des spores. Les sporangies peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* (Kalakoutskii and Agre, 1976);

- Les scléroties trouvés chez le Genre *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés ;

- Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

La morphologie, la disposition des chaînes sporales, ainsi que la composition chimique (composition des cellules et des parois cellulaires, type de lipides, et présence de quinones isoprénoides) sont particulièrement importants pour la classification taxonomique des actinomycètes. La première édition du Bergey's Manuel classe les actinomycètes en 7 sections, principalement en fonction du type de leur parois cellulaires, l'arrangement des conidies, et la présence ou l'absence de sporangies (Holt *et al.*, 1994). Dans la seconde édition, l'analyse des séquences d'ARN 16S a permis de classer les actinomycètes sous un seul grand phylum «Actinobacteria », ce phylum est défini comme un ensemble de souches présentant

plus de 80% de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955) (Stackebrandt *et al.*, 1997). Ce phylum est constitué d'une seule classe dénommée également «Actinobacteria», de cinq sous classes, six ordres, 14 sous ordres et 40 familles (Garrity *et al.*, 2004). Actuellement, selon la dernière édition du Bergey's Manuel, le phylum Actinobacteria comprend 5 classes, 19 ordres, 50 familles et 221 genres (Zhi *et al.*, 2009).

Les actinomycètes sont des eubactéries aérobies strictes ou microaérophiles, cependant il existe certaines formes fermentatives, anaérobies strictes, illustrées par le genre *Actinomyces*. En général, les actinomycètes sont des chimio-organotrophes hétérotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Ils sont universellement répandus. On les trouve dans différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, glaciers, déserts, sols pollués, lacs alcalins, milieux salins (H. A. Lechevalier and Lechevalier, 1981; Goodfellow and Williams, 1983; Lacey, 1997).

Ces microorganismes sont surtout connus pour leur capacité à produire une pléthore de molécules ayant de nombreuses applications dans divers domaines et de ce fait, présentent un fort intérêt pour les industriels (antibactériens, antifongiques, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antivirales, anti tumoraux, antimétabolites, anti allergénique, protéases alcalines, glucose isomérase, vitamines ...) (Bouras, 2005).

Il existe 23000 métabolites secondaires produits par les microorganismes, plus de 10000 sont produits par les actinomycètes, ce qui représente 45% du total des métabolites microbiens, et même 80%, si on ne considère que les composés ayant un usage pratique (Bérdy, 2005) **(Figure 6, Tableau 1)**.

L'Actinomycine, un antibiotique antitumoral, est le premier antibiotique isolé à partir d'une souche d'actinomycète (Waksman and Woodruff, 1940). De nombreuses autres molécules sont également élaborées par ces microorganismes. Certaines ont une activité antitumorale (Carcinostatine, Adriamycine, Anthramycine, Daunomycine, Anthracycline, etc.), herbicide, antiparasite comme l'antimalaria (Distamycine), anticoccidienne, insecticide (Avermectine, Polyoxines, Mylébémycine, etc.), antivirale (Mutactimycines) et acaricide (Altemicidines) (Perry *et al.*, 1990; Lombardi and Crisanti, 1997; Choi *et al.*, 1998; Raty *et al.*, 2002).

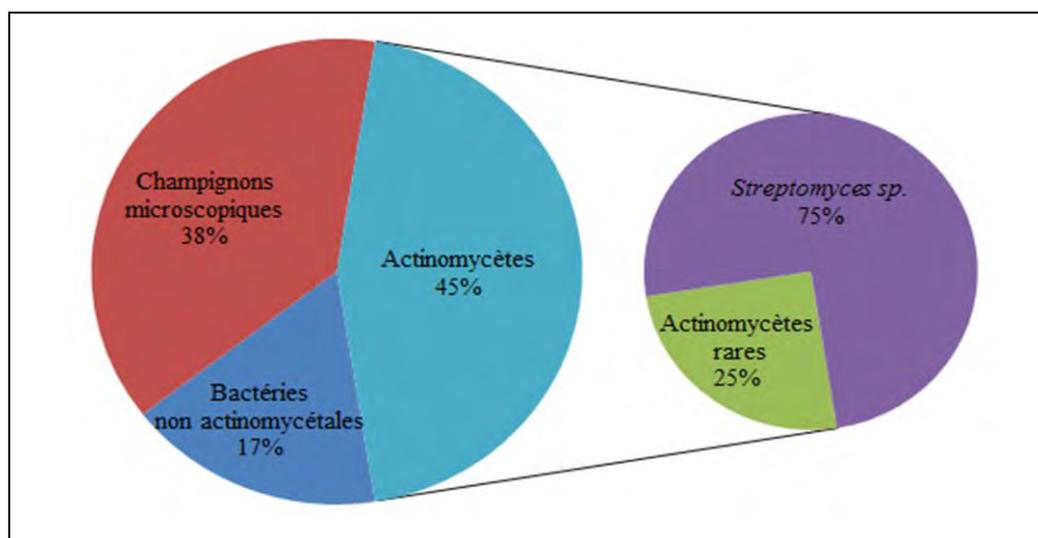


Figure 6. Origine des produits microbiens bioactifs (Bérdy, 2005)

Tableau 1. Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs d'après (Bérdy, 2005) : molécules possédant une activité antimicrobienne et/ou une activité antitumorale et/ou une activité antivirale.

Source	Antibiotiques	Autres métabolites bioactifs	Total des métabolites bioactifs	Métabolites utilisés (en thérapie humaine)	Métabolites inactifs
Bactéries (autres)	2900	900	3800	10-12 (8-10)	3000-5000
Actinomycétales	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000-1000
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	1080	7630	-	-
Actinomycétales rare	2250	220	2470	-	-
Champignons	9400	3700	8600	30-35 (13-15)	2000-15000
Total	16500	6000	22500	140-160 (100)	20000-25000

Par ailleurs, les actinomycètes jouent un rôle écologique important. Ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases) (Moreira *et al.*, 2002). Les glycosidases jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases et xylanases), animales et fongiques (chitinases). D'autres enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, cholestérol oxydase), ou vétérinaires, comme additif nutritionnel pour le bétail (Oestergaard and Sjoeholm, 2001).

Cette capacité à produire une telle diversité de molécules et surtout lié à la taille de leur génome, elle est en générale de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois plus grand que celui de *E. coli*, et la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les actinomycètes possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. À la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir des plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, et ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques.

2. Les actinomycètes rares

2.1. Intérêt et caractéristiques des actinomycètes rares

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. La résistance aux antibactériens est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables. Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin primordial.

Dans le but d'augmenter les chances de découvrir de nouveaux métabolites bioactives pour lutter contre le nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques actuellement utilisés, des recherches se focalisent notamment sur l'exploitation de la diversité microbienne issue d'écosystèmes extrêmes. En effet, de nombreux milieux naturels sont encore inexplorés ou sous-explorés et donc, peuvent être considérés comme une ressource abondante pour l'isolement de nouveaux microorganismes (Tiwari and Gupta, 2012). Les actinomycètes sont responsables de la production de plus de la moitié des molécules bioactives (Bérdy, 2005). Plus de 10 % de ces métabolites sont isolés à partir de ce qu'on appelle les actinomycètes «rares», qui comprennent près de 220 genres différents (Tiwari and Gupta, 2012).

L'utilisation du terme «rare» n'est pas une indication relative à leur abondance dans l'environnement, mais surtout à leur fréquence d'isolement à l'aide des méthodes conventionnelles, qui est beaucoup plus faible par rapport au genre *Streptomyces*. Plusieurs chercheurs soutiennent que les actinomycètes rares représentent un groupe bactérien, très diversifié et peu étudié, qui peut être une source importante pour la découverte de molécules bioactives encore inconnues (Sosio *et al.*, 2000). Parmi les genres rares les plus importants : *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Actinokineospora*, *Acrocarpospora*, *Actinosynnema*, *Catenuloplanes*, *Cryptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Kineosporia*, *Kutzneria*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirilliplanes*, *Thermomonospora*, *Thermobifida*, et *Virgosporangium* (Lazzarini *et al.*, 2000).

Bien que l'exploitation des actinomycètes rares en tant que source pour la découverte de nouvelles molécules bioactives soit à un stade précoce, de nombreux nouveaux métabolites ont déjà été découverts ces dernières années. La base de données ABL décrit la distribution relative des souches d'actinomycètes rares, selon le nombre de molécules bioactives qu'elles produisent (**Figure 7**).

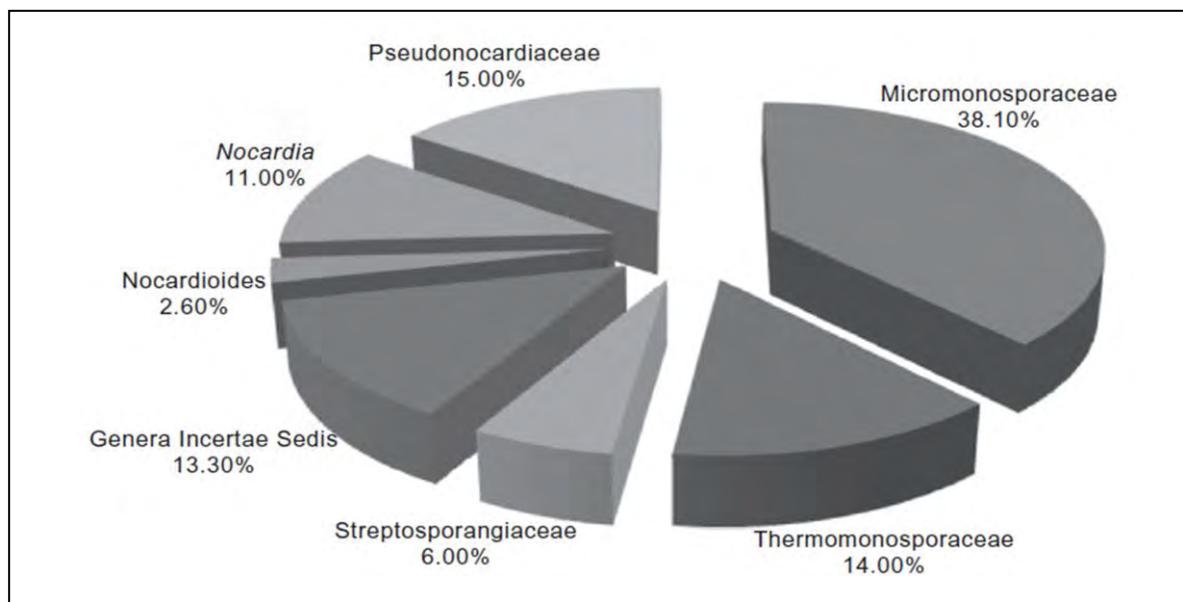


Figure 7. Répartition relative des souches productrices de biomolécules parmi les actinomycètes rares (selon la classification récente publiée dans l'Atlas des actinomycètes, Japon) (Lazzarini *et al.*, 2000; Tiwari and Gupta, 2012).

L'importance de ces souches est surtout démontrée par la découverte de nombreux agents antibactériens à succès, tels que : Les Rifamycines produites par *Amycolatopsis mediterranei*, l'Erythromycine par *Saccharopolyspora erythraea*, la Teicoplanine par *Actinoplanes teichomyceticus*, la Vancomycine par *Amycolatopsis orientalis*, et la Gentamicine à partir de *Micromonospora purpurea*. Il faut noter, que tous les antibiotiques glycopeptidiques connues (≈ 120) sont uniquement produits par des genres rares d'actinomycètes (Bérdy, 2005).

Un autre exemple de la réussite des molécules produites par les actinomycètes rares, est la Salinosporamide A, il s'agit d'un agent antimicrobien/antitumoral produit par une souche appartenant au genre *Salinospora*. Cette molécule est passée en phase II des essais cliniques, après seulement 3 ans de sa découverte (Fenical, 2006). Plusieurs autres molécules nouvelles ont été isolées au cours des années 2003-2005 à partir d'actinomycètes rares d'origine marine, comme par exemple l'Helquinoline produite par *Janibacter limosus* qui possède une activité antimicrobienne à large spectre. La Marinomycine produite par une souche *Marinispora*, montre une activité antibactérienne et antitumorale. De même pour la Mechercharmycine et la molécule MKN-349A produites respectivement par *Thermoactinomyces sp.* et *Nocardiopsis sp.* qui montrent des activités anticancéreuses et immunomodulatrices très intéressantes.

Récemment, de nouvelles molécules produites par des genres rares d'actinomycètes viennent d'être commercialisées. La Dalbavancine et la Spynosine sont deux nouveaux antibiotiques glycopeptidiques anti-Gram positif. La molécule NVB302, dérivée de la Deoxyactagardine B produite par la souche *Actinoplanes liguriae*, est actuellement une molécule candidate pour le traitement des diarrhées provoquées par *Clostridium difficile* (Appleyard, 2009). Une autre molécule identifiée NAI-107 produite par *Microbispora sp.* représente le premier exemple de lantibiotique de classe I produit par des actinomycètes rares (Castiglione *et al.*, 2008). C'est est le composé lantibiotique le plus actif identifié chez les actinomycètes. La Kibdelomycine est le premier inhibiteur de topoisomérase bactérienne de type II, et montre une puissante activité antibactérienne (Phillips *et al.*, 2011). Cette molécule fait partie d'une nouvelle classe d'antibiotiques produite par une nouvelle espèce appartenant au genre *Kibdelosporangium*.

En plus de la richesse et diversité des substances bioactives produites par les actinomycètes rares, l'autre avantage est la complexité structurale de ces molécules. L'érythromycine est l'un des antibiotiques les plus représentatifs produits par ce groupe bactérien, il s'agit d'un macrolide macrocyclique, avec deux sucres (L-cladinose et D-desosamine) substitués sur un cycle lactone à 14 éléments. Cette structure chimique complexe et originale, fait de cet antibiotique un composé très difficile à reproduire par des procédés synthétiques (**Figure 8**).

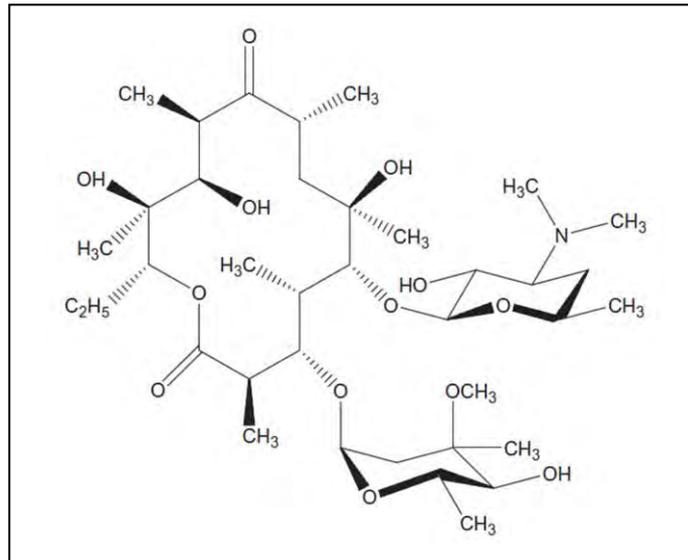


Figure 8. Structure de l'érythromycine produite par *Saccharopolyspora erythraea* (Tiwari and Gupta, 2013).

2.2. Ecologie des actinomycètes rares

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent une présence substantielle des genres rares d'actinomycètes et une grande diversité dans différents types d'habitats (Tiwari and Gupta, 2013). Bien que le sol reste leur principal habitat, elles peuvent aussi être isolées à partir de sédiments, des milieux aquatiques, plantes, pierres, animaux et humains. Plusieurs espèces ont été trouvées dans des écosystèmes extrêmes tels que les marais salants, les sols désertiques, et les profondeurs marines (Groth *et al.*, 1999).

La diversité et la distribution des populations d'actinomycètes rares dépendent généralement des caractéristiques physico-chimiques et des facteurs biologiques de chaque écosystème.

- Le sol

Comme pour les Streptomycètes, le sol est le principal habitat des actinomycètes rares. Les facteurs environnementaux comme le type de sol, le pH, la teneur en humus et les caractéristiques des acides humiques contenues dans le sol affectent leur distribution.

Groth *et al.*, ont isolé 5000 souches actinomycétales à partir d'échantillons de sols provenant de forêts tropicales. L'identification de ces isolats a révélé une prédominance des souches *Streptomyces*, cependant des souches appartenant aux genres *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Nocardia* et *Streptosporangium* ont également été trouvées (Groth *et al.*, 1999).

Les souches *Saccharothrix algeriensis* et *Nonomuraea sp.* NM94 ont été isolées à partir d'échantillons de sols désertiques sahariens (Zitouni *et al.*, 2004; Badji *et al.*, 2007).

- Milieux marins

Plusieurs souches d'actinomycètes rares ont été isolées à partir de sédiments marins, avec une prédominance du genre *Actinoplanes* (Takizawa *et al.*, 1993). Jensen *et al.*, ont démontré qu'il existe une distribution bimodale des actinomycètes en milieu marin en fonction de la profondeur. Les *Streptomyces* sont généralement majoritaires en milieu peu profond à proximité des côtes, alors que les *Actinoplanes* deviennent prédominants en zone profonde (Jensen *et al.*, 2005). Une autre étude menée dans les Fjords de Norvège montre une prédominance de genre *Micromonospora* dans les sédiments (Bredholt *et al.*, 2008).

- Les plantes

Plusieurs espèces actinomycétales sont décrites dans les associations plantes-microorganismes. Ces associations sont de types opportunistes (endophytes) ou/et saprophytes, et ne montrent aucune phyto-pathogénicité en général. Taechwisan *et al.*, ont isolé de nombreuses espèces d'actinomycètes endophytes à partir de divers tissus végétaux, appartenant à 36 plantes différentes. La majorité des taxons appartiennent aux *Streptomyces*, cependant des souches appartenant aux genres *Microbispora*, *Nocardia* et *Micromonospra* ont également été identifiées (Taechowisan *et al.*, 2003).

- Animaux et humains

La souche *Tsukamurella spongiae sp.* Nov a été isolée à partir d'une éponge marine recueillie en eau profonde au large des Antilles néerlandaises (Olson *et al.*, 2007).

Plusieurs genres rares d'actinomycètes ont été isolées à partir de prélèvements cliniques, et la pathogénicité de certaines souches pour les humains ou les animaux a été prouvée, le genre *Nocardia* ainsi que d'autres genres apparentés (*Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella*) revêtent une importance médicale particulière (Georghiou and Blacklock, 1992; Garrity *et al.*, 2004; Gauthier, 2006). Les espèces *Nocardia asteroides*, *Nocardia braziliensis*, *Actinomadura madurae* et *Dermathopjilus congelensis* sont les espèces d'actinomycètes hors mycobactéries les plus citées en pathologie humaine.

Selon Zerizer *et al.*, plusieurs espèces d'actinomycètes rares ont été isolées à partir de prélèvements cliniques, ces souches appartiennent notamment aux genres *Micromonospora*, *Kribbella*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Saccharothrix*, *Nonomuraea*, et *Nocardiopsis* (Zerizer *et al.*, 2013).

2.3. Isolement des actinomycètes rares

Les méthodes d'isolement des actinomycètes rares sont les mêmes utilisées pour l'isolement des Streptomycètes. Cependant, les actinomycètes rares possèdent une croissance beaucoup plus lente que celles des *Streptomyces* dont la croissance est plus rapide et finissent souvent par les recouvrir, ce qui rend leur isolement très difficile. Plusieurs techniques ont été développées afin de mieux évaluer la diversité microbienne des bactéries à croissance lente. Actuellement, Le prétraitement des échantillons et l'utilisation des milieux sélectifs sont les principales méthodes utilisées pour l'isolement des actinomycètes rares.

- Traitements physiques et chimiques

Les traitements des échantillons de sol par dessiccation et chauffage améliorent considérablement l'isolement des genres rares d'actinomycètes. Un traitement thermique des échantillons permet d'inhiber la croissance de certaines bactéries. Les spores des espèces *Streptosporangium* et *Microbispora* sont très résistants à la chaleur sèche que les spores des espèces *Streptomyces* (Nonomura and Ohara, 1969), cette méthode est aussi efficace pour isoler d'autres genres d'actinomycètes rares tels que : *Microbispora*, *Dactylosporangium* et *Actinomadura* (Hayakawa *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996).

D'autres traitements physiques ont permis l'isolement sélectif d'actinomycètes rares comme l'utilisation des UV (Galatenko and Terekhova, 1990), les ultrasons (Miguélez *et al.*, 1993), les radiations à hautes fréquences (Bulina *et al.*, 1998), et les pulsations électriques (Bulina *et al.*, 1998). Des actinomycètes rares ont également été isolées après un prétraitement d'échantillons de sol par des agents chimiques comme le phénol (Hayakawa *et al.*, 1991), ou la chloramine T (Hayakawa *et al.*, 1991).

- Les milieux sélectifs

En raison du désavantage compétitif des actinomycètes rares avec les autres microorganismes sur les milieux d'isolement conventionnels. Plusieurs milieux sélectifs ont été développés afin de réduire la croissance des microbes indésirables, et favoriser celle des genres rares. Hayakawa et Nonomura, ont formulé une gélose à base d'acide humique et de vitamines (Hayakawa and Nonomura, 1987). L'acide humique est l'unique source de carbone et d'azote, il s'agit d'un polymère hétérogène extrêmement réticulé, et très résistant à la dégradation biologique (Kumada, 1987). Seuls les actinomycètes sont capables d'hydrolyser ce substrat et l'utiliser comme support pour la sporulation (Kontchou and Blondeau, 1992). La réticulation de l'acide humique permet aussi de limiter la croissance des bactéries non filamenteuses.

Les agents de solidification sont connus pour stimuler la sporulation. La gomme Gellane additionnée de carbonate de calcium favorise la sporulation du mycélium aérien des *Actinobispora* (Suzuki *et al.*, 1998).

Le milieu HAVA (Hair Hydrolysate Vitamin Agar), est jusqu'à présent le milieu le plus approprié pour l'isolement des actinomycètes rares, en particulier les genres suivants : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, et *Streptosporangium* (Seong *et al.*, 2001).

- Les barrières physiques

L'isolement sélectif des actinomycètes rares, nécessite la réduction du nombre de bactéries non filamenteuses. Hirsh et Christensen, ont utilisé une barrière physique pour l'isolement sélectif des bactéries filamenteuses. Pour cela, des particules de sol sont déposées sur une membrane de filtration (0.22µm) placée sur la surface d'un milieu de croissance à base d'humus. Le mycélium des actinomycètes est suffisamment mince pour pénétrer dans les pores du filtre et se développer au-dessus de l'agar, tandis que les champignons et les autres bactéries restent confinés à la surface de la membrane. Le filtre est ensuite retiré après quelques jours d'incubation (Hirsch and Christensen, 1983).

- Les antibiotiques sélectifs

L'utilisation d'antibiotiques pour sélectionner les microorganismes qu'on désire isoler, ou contre les groupes de bactéries indésirables est devenue l'une des techniques sélectives les plus importantes pour l'isolement des actinomycètes rares. Un milieu de culture amidon-caséine additionné de 1 à 50µg/mL de Novobiocine est souvent utilisé pour isoler les *Actinoplanaceae* (Palleroni, 1980). La Kanamycine, la Tautomycetine, la Rubomycine et la Roseofingine favorisent l'isolement sélectif des *Actinomadura* et des *Nocardia* (Vetlugina *et al.*, 1990).

- Le chimiotactisme

Cette méthode est utilisée pour isoler les spores mobiles produites par certains genres rares d'actinomycètes. Les souches d'*Actinoplanacea*, peuvent être isolées des environnements aquatiques en utilisant des substrats insolubles tels que la kératine et les graines de pollen (Couch, 1950).

Une autre méthode basée sur l'attraction de zoospores par les ions chlorhydrique est utilisée pour l'isolement des *Actinoplanaceae* à partir du sol, cette technique consiste à inonder l'échantillon de sol avec de l'eau, et de plonger des capillaires remplis de tampon phosphate contenant du KCl, les zoospores attirés par le KCl, sont recueillis dans les capillaires (Palleroni, 1980).

La méthode utilisant le Collodion comme agent chimio-attractif et également très efficace pour l'isolement des *Actinoplanes* et des *Dactylosporangium* du sol (Hayakawa *et al.*, 1991).

3. Le genre *Micromonospora*

Le genre *Micromonospora* a été décrit la première fois par Ørskov (1923). Ce genre est actuellement bien défini en termes de critères morphologiques, chimio-taxonomiques, et phylogénétiques (Kroppenstedt, 1985; Kawamoto, 1989; Koch *et al.*, 1996) qui les distinguent des autres membres de la famille *Micromonosporaceae*. Ce genre comprends 60 espèces, et 7 sous-espèces définies sur la base de leur marqueurs chimio-taxonomiques, leur critères physiologiques, et leur liens phylogénétiques (Euzeby, 2016).

Les *Micromonospora* sont des bactéries Gram positif (DNA G+C : 68 à 75mol%), mésophiles, aérobies/microaérophiles, chimio-organotrophes, sensibles à des pH acides inférieur à 5, la température idéale pour leur croissance se situe entre 20 et 40°C, et toute croissance s'arrête au-delà de 50°C pour la plupart des espèces de ce genre (Vobis, 1992).

3.1. Morphologie et structure cellulaire

Les souches de *Micromonospora*, forment généralement des colonies surélevées et plissées sur milieu solide. Les colonies sont initialement de couleur jaune pâle, à orange claire. Après, les colonies commencent à développer des pigments solubles qui diffèrent d'une espèce à l'autre (Bleu-vert, brun, orangé foncé, violet ou rouge). Plus les colonies sont âgées, plus elles auront tendance à être recouvertes par un mucus sporal de couleur noir, ou brun noir (Kawamoto, 1989) (**Figure 9**).

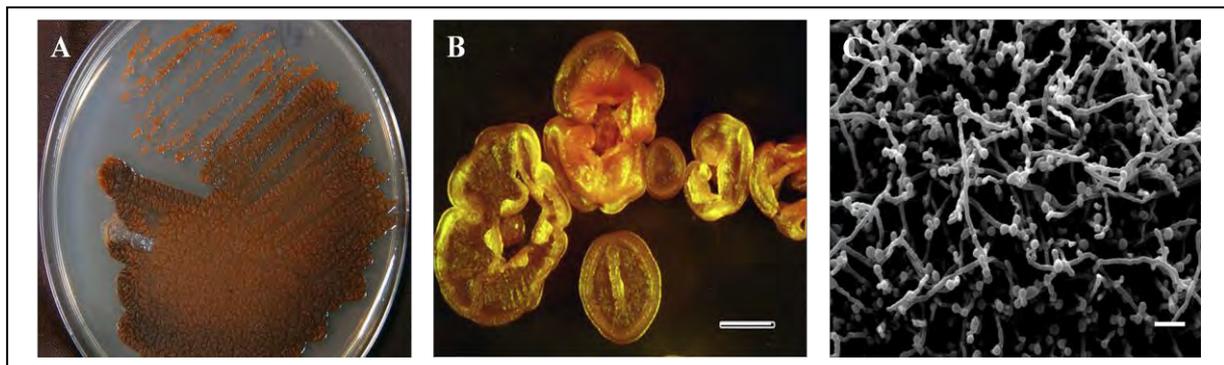


Figure 9. Aspect morphologique des *Micromonospora*. (A) Culture de la souche *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 sur milieu ISP₂ après 4 jours d'incubation, (B) Aspect macroscopique des colonies de la souche *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 (bar : 5µm), (C) Aspect microscopique du mycélium de substrat sur milieu ISP₂ avec formation de spores individuelles (bar : 1µm) (Hirsch and Valdés, 2010).

Les espèces de ce genre présentent un mycélium de substrat ramifié et bien développé, avec un diamètre allant de 0.2 à 0.6 µm. La formation de spores non mobiles individuelles sur le mycélium du substrat est la principale caractéristique des bactéries de ce genre (**Figure 9, C**). Elles sont de forme sphérique à ovale (0.7-1.5µm) et se présentent à l'extrémité de courts sporophores. Le mycélium aérien quant à lui est généralement absent, à l'exception de certaines cultures qui développent de courts hyphes aériennes stériles.

La sporogénèse implique la formation d'un septum de sporulation qui est suivi par la maturation des spores avec un épaissement des couches de la paroi (Hardisson and Suarez, 1979). La libération des spores est favorisée par un étirement de la paroi des hyphes près du septum de sporulation. Les spores de *Micromonospora* sont relativement très résistantes aux traitements physiques tels que la sonification, ou un traitement thermique à 75°C (Johnston and Cross, 1976; Suarez *et al.*, 1980; Kawamoto *et al.*, 1982), au-delà de cette température la viabilité des spores est nettement réduite (Suarez *et al.*, 1980). Elles peuvent résister à la dessiccation et restent viables dans le sol et les boues pendant de longues périodes (Cross and Attwell, 1974). Elles montrent aussi une résistance à certains agents chimiques tel que l'acétone (Kawamoto *et al.*, 1982), le diméthylformamide, le formamide, l'alcool tert-butyle, et le phénol (Hayakawa *et al.*, 1991). La viabilité des spores n'est pas affectée à des pH neutres entre 6 et 8, mais diminue sensiblement à des pH acides (Kawamoto *et al.*, 1982). En général la germination des spores de *Micromonospora* est un processus lent, mais il est similaire à celui observé chez d'autres actinomycètes (Kawamoto, 1989).

Le genre *Micromonospora* est caractérisé par une paroi cellulaire de type II, des sucres de type D (Lechevalier and Lechevalier, 1970), des phospholipides de types PII (Lechevalier *et al.*, 1977), et des acides gras de type 3b (Kroppenstedt, 1985). Le peptidoglycane des *Micromonospora* contient de l'acide méso-diaminopimélique, et/ou de l'acide 3-OH-diaminopimélique (Kawamoto *et al.*, 1981). Il peut aussi contenir de la glycine, et de l'acide glutamique. L'acide muramique de la paroi cellulaire est de type glycolyl, il semble avoir un ratio équimolaire d'acide glycolique et d'acide diaminopimélique (Kawamoto *et al.*, 1981). La glycine est toujours présente en première position de la sous unité peptidique attachée à l'acide N-glycolylmuramique. Il a été observé que le peptidoglycane des souches de *Micromonospora olivasterospora* et *Micromonospora sagamiensis*, résiste bien à l'action des lysozymes (β -N-acetylmuramidase) (Szvoboda *et al.*, 1980; Kawamoto *et al.*, 1981).

L'arabinose et le xylose sont les deux sucres caractéristiques présents dans les hydrolysats cellulaires chez la plupart des espèces. Cependant des quantités variables de galactose, glucose, mannose et rhamnose peuvent également être trouvées chez certaines espèces (Kawamoto *et al.*, 1981). Le galactose, glucose, et rhamnose remplacent l'arabinose chez d'autres espèces (Kroppenstedt *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005).

Les phospholipides majeurs chez les bactéries de ce genre sont : le phosphatidylethanolamine, le phosphatidylinositol, et le phosphatidylinositol mannosides (Lechevalier *et al.*, 1977).

Les acides gras saturés et insaturés, sont principalement : C15:0 iso, C17:0 iso, C15:0 anteiso, C17:0 anteiso, C17:0 10-methyl, et C17:0 10-methyl. Les acides mycoliques quant à eux sont absents. Les menaquinones les plus importants sont : MK-9(H4), MK-9(H6), MK-10(H4), MK-10(H6), ou MK-12(H6) (Collins *et al.*, 1984; Kawamoto, 1989; Tomita *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 2004; Thawai *et al.*, 2004; Kroppenstedt *et al.*, 2005; Thawai, Tanasupawat, Itoh, Suwanborirux, and Kudo, 2005; Thawai, Tanasupawat, Itoh, Suwanborirux, Suzuki, *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005)

3.2. Phylogénie

La structure intragénérique des *Micromonospora* a été décrite pour la première fois par (Koch *et al.*, 1996) grâce à l'analyse des séquences d'ARNr 16S. Après des études phylogénétiques des séquences des gènes d'ARNr 16S, il a été démontré que les espèces *Micromonospora* forment un clade très étroit au sein de la famille *Micromonosporaceae*. En effet les séquences des gènes d'ARNr 16S des *Micromonospora* sont presque identiques (99.7% à 99.9% de similitudes). Ces valeurs élevées ne peuvent être utilisées pour confirmer le statut d'espèce pour des souches étroitement apparentées, notamment en raison des substitutions nucléotidiques dans les régions variables des gènes d'ARNr 16S, qui peuvent induire des erreurs lors de l'établissement de leur position phylogénétique.

Les espèces *Micromonospora* sont actuellement définies génomiquement par des valeurs d'hybridation ADN-ADN inférieur à 70%. Ceci contraste avec les grandes similitudes des séquences de gènes ARNr 16S.

Plusieurs auteurs ont noté, que les *Micromonospora* possèdent une signature nucléique entre les positions 603 et 627 des gènes d'ARNr16S (Koch *et al.*, 1996). Des études d'hybridation ADN-ADN confirment que le genre *Micromonospora*, est très hétérogène (Kasai *et al.*, 2000). Récemment, Le gène *gyrB* codant pour une ADN topoisomérase, est utilisé comme une alternative pour déterminer la position phylogénétique des souches *Micromonospora* (Kasai *et al.*, 2000). En effet, le gène *gyrB* possède un taux d'évolution moléculaire supérieur à celui de l'ARNr (Kasai *et al.*, 2000).

3.3. Conditions de croissance et physiologie

L'identification des espèces *Micromonospora*, repose sur leurs caractères physiologiques (croissance sur des milieux spéciaux, profils d'utilisation du carbone, activité glycosidase, réduction des nitrates, et tolérance à l'NaCl) (Kawamoto, 1989). La plupart des souches *Micromonospora* utilisent le fructose, glucose, sucrose et l'amidon comme seule source de carbone, certaines souches peuvent utiliser le cellobiose, galactose, mannose, tréhalose, et xylose, et seulement quelques souches possèdent la capacité à utiliser du glycérol, inositol, mannitol, rhamnose, ribose, ou encore la salicine. L'utilisation des carbohydrates par ces souches peut être affectée par le milieu de base, ce qui explique les écarts reportés par plusieurs auteurs (Kawamoto, 1989). Les souches *Micromonospora* montrent des activités α et β -glucosidases, β -galactosidase, et β -N-acetylglucosaminidase. Cependant des résultats variables ont été décrits pour l' α -galactosidase, α -mannosidase, et la β -xylosidase (Kawamoto, 1989). Les sels d'ammonium inorganiques, et les acides aminés sont une meilleure source d'azote que les sels de nitrates pour la majorité des espèces *Micromonospora* (Kawamoto *et al.*, 1983). La tolérance à l'NaCl varie de 1.5 à 5% (w/v). Les souches de ce genre ne montrent aucune croissance à des pH inférieur à 5 ou supérieur à 9.5, ou à des températures supérieur à 45°C.

3.4. Ecologie

Les souches de *Micromonospora*, peuvent être isolées facilement à partir du sol et des milieux aquatiques. La plupart des publications suggèrent qu'elles sont d'origine tellurique. Les *Micromonospora* sont très fréquentes dans les sols neutres et alcalins (Jensen, 1930; Vobis, 1992). Plusieurs études indiquent qu'elles sont sensibles à des pH acides, cependant certaines espèces ont été isolées à partir de sols acides, ou de milieux acidifiés comme les litières végétales (Zenova *et al.*, 2004). Les spores de *Micromonospora* sont hydrophiles, très résistantes aux traitements thermiques et à différents agents chimiques, et peuvent survivre pendant des années dans l'environnement (Cross, 1981a).

Depuis longtemps, les écosystèmes aquatiques ont été considérés comme le principal habitat des *Micromonospora* (Cross, 1981b; Goodfellow and Haynes, 1984). Plusieurs souches *Micromonospora* ont été isolées à partir d'eaux douces ou des milieux aquatiques marins (Cross, 1981a, 1981b; Goodfellow and Williams, 1983), elles sont fréquemment isolées à partir d'échantillons des eaux de ruisseaux et de rivières (Burman, 1973). Elles sont parmi

les populations actinomycétales prédominantes dans les sédiments lacustres, et les échantillons de boue (Johnston and Cross, 1976). Elles jouent un rôle actif dans la dégradation des biopolymères dans les sédiments, en raison de leur capacité à hydrolyser la cellulose, la chitine, et le xylane (Erikson, 1941; Hunter *et al.*, 1981). Leur tolérance aux basses tensions d'oxygène, suggère qu'elles peuvent se développer dans des conditions microaérophiles dans les sols alluviaux, les prairies, les plaines inondables, et les sols humides des écosystèmes fluviaux (Goodfellow and Williams, 1983; Vobis, 1992; Zenova *et al.*, 2004).

Les *Micromonospora* font également partie des communautés actinomycétales prédominantes dans les litières végétales, les lichens, les racines et la rhizosphère de certaines plantes (Zenova *et al.*, 1994; González *et al.*, 2005). Plusieurs espèces de *Micromonospora* sont des endophytes retrouvées dans les tissus végétaux. Elles colonisent les racines de certaines espèces comme *Casuarina* et *Triticum* (Coombs and Franco, 2003; Valdés *et al.*, 2005). Leur capacité à inhiber certains champignons phytopathogènes comme *Pythium* et *Phytophthora* suggère que leur association avec les plantes repose sur un avantage sélectif (Coombs and Franco, 2003). Un isolat étroitement rapproché à l'espèce *Micromonospora yulongensis*, a été trouvé dans les racines du blé. Les méthodes de culture indépendantes ont identifié des clones d'actinobactéries endophytes rapprochées aux deux espèces *Micromonospora endolithica* et *Micromonospora peucetica* dans les racines du blé, ces résultats suggèrent la présence d'une grande diversité de souches *Micromonospora* chez les plantes (Coombs and Franco, 2003; Conn and Franco, 2004). Plus récemment, les nodules racinaires de légumineuses (*Lupinus angustifolius*, *Pisum sativum*, et *Vicia sativa*) montrent qu'elles sont un réservoir extrêmement riche pour l'isolement de nouvelles souches de *Micromonospora* (Trujillo *et al.*, 2006, 2007).

Les *Micromonosporales* ont également été isolées à partir de plusieurs milieux marins, y compris les zones côtières (Watson and Williams, 1974), les marais salants (Hunter *et al.*, 1981), et les sédiments marins en eaux profondes (Weyland, 1969, 1981). Pendant longtemps, il a été suggéré que les spores des *Micromonospora* ont été lavées des sols et accumulées comme spores dormantes au fond des lacs et des sédiments marins (Weyland, 1969, 1981; Johnston and Cross, 1976; Cross, 1981a, 1981b; Goodfellow and Haynes, 1984). Malgré l'existence de plusieurs preuves qui suggèrent l'adaptation des *Micromonospora* aux milieux marins, et l'existence d'une population indigène marine (Okami and Okazaki, 1978; Jensen *et al.*, 1991; Takizawa *et al.*, 1993; Mincer *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004), ce n'est que

récemment, que la croissance active d'un mycélium a été démontrée sur des particules de sable en milieu marin (Jensen *et al.*, 2005). En dépit de cela, beaucoup d'actinomycètes isolées sur des milieux à base d'eau de mer, sont capables de croître sur des milieux préparés avec de l'eau distillée.

3.5. Métabolisme secondaire

Les *Micromonospora*, sont après les *Streptomyces* les producteurs les plus prolifiques des métabolites bioactifs. Elles produisent une gamme extrêmement diversifiée de structures chimiques. D'après (Bérdy, 2005) près de 740 souches de *Micromonospora* produisent des métabolites bioactifs. Ce sont des producteurs potentiellement importants d'Aminoglycosides (Fortimicines, Gentamicines, Kanamycine, Mannosidostreptomycine, Neomycine B, Paromamine, Sagamicine, Sisomicine, et Verdamicine), Ansamycines (Halomicines, Rifamycines), Anthracyclines (Daunorubicine, Sibanomycine), Anthraquinones (Dynemicine), Macrolides (antibiotique XK 41-B-2, Erythromycines, Juvenimicines, Megalomycines, Rosaramicine, et Rustmicine), Oligosaccharides (Antlermicine et Everninomicine), antibiotique antitumoral Eneidyne (Calicheamycine), et antibiotiques peptidiques (Actinomycine, Bottromycine, Microsporine, et Thiocoraline) (Wagman and Weinstein, 1980; Vobis, 1992; Horan, 1999).

3.6. Génomique et protéomique des *Micromonospora*

Les *Micromonospora* sont bien connues pour être des producteurs prolifiques de molécules bioactives, cependant peu d'études et d'analyses génomiques ont été réalisées sur ce genre. Durant les années 1980 et 1990, les procédures de clonage de plusieurs espèces de *Micromonospora* ont été publiées. Un certain nombre de gènes ont été clonés, mais la plupart ne concernaient que des gènes impliqués dans la production d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques (Kelemen *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994). L'électrophorèse en champs pulsé a révélé que *Micromonospora chalcea* DSM43026, possède une chromosome linéaire de 7.7 Mpb (Redenbach *et al.*, 2000). Plus récemment, des analyses génomiques ont été réalisées sur différentes souches *Micromonospora*. La détermination de la séquence complète du génome de *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 (GenBank accession: CP002162) en 2009 a permis d'élargir considérablement les connaissances sur ce genre bactérien. En tout, le génome de *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 englobe 7.02 millions de paires de

bases avec un %G+C de 72.86%. 88.64 % de l'ADN chromosomique est constitué d'ADN codant (6285 gènes) (Hirsch and Valdés, 2010). La plupart des gènes sont impliqués dans les processus métaboliques (48.2%) et cellulaires (27%) et plus de 500 gènes (8.3%) sont responsables de la régulation biologique. Une carte protéomique a également été établie pour cette souche (Proteome ID :UP000001908), elle comprend 6204 protéines différentes, la majorité sont des protéines non caractérisées dont les fonctions restent inconnues (Lucas *et al.*, 2010).

MATERIEL ET METHODES

1. Actinomycètes

Six souches actinomycétales ont été choisies pour la réalisation de cette étude. Ces souches ont été identifiées par le Dr. Zerizer Habiba (Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université des frères *Mentouri*-Constantine, Algérie) (Zerizer *et al.*, 2013).

Il s'agit de souches isolées à partir de produits pathologiques provenant de patients immunodéprimés hospitalisés au niveau du CHU de Constantine. Le choix de ces souches a été motivé par leur origine, et leur appartenance à des genres rares d'actinomycètes. En effet, sur les 6 souches choisies, 5 appartiennent à des genres différents d'actinomycètes rares (**Tableau 2**).

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu gélosée ISP₂ (**Annexe 1**), milieu préconisé par (Shirling and Gottlieb, 1976) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes.

Tableau 2. Souches actinomycétales utilisées.

Référence	Nom de la souche	GeneBank Accession
GF 44b	<i>Kribbella sp.</i>	(JQ972873)
GF 44c	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	(JQ972874)
GF 03	<i>Nonomuraea roseola</i>	(JQ972872)
GF 118b	<i>Saccharothrix sp.</i>	(JQ972880)
GF 262b	<i>Actinomadura madurae</i>	(JQ972881)
GF.P 40	<i>Streptomyces sp.</i>	(KF991620)

2. Mise en évidence des lectines et sélection de la meilleure souche productrice

2.1. Fermentation

Une suspension sporale est préparée pour chaque souche dans de l'eau physiologique stérile. Chaque suspension doit avoir une concentration initiale en spore de 10^6 spores/mL. Des précultures sont ensuite effectuées dans des Erlenmeyers de 500 mL avec trois milieux de cultures différents (ISP2, Bennett, et PMY) (**Annexe 1**). Le volume de préculture est de 100 mL soit 20 % (volume liquide/volume Erlenmeyer). Les précultures sont placées 3 jours dans un incubateur thermostaté à 30°C, et à agitation orbitale fixée à 250 rpm (révolution par minute). Après incubation, 25mL des précultures sont transférées dans des Erlenmeyers de 1L contenant un volume de 500 mL de chaque milieu de culture, soit 5 % volume préculture/volume culture. Les cultures des souches (GFP 40, GF 44c, GF 44b, et GF 262b) sont incubées à 30°C pendant 6 jours, les souches à croissance lente (GF 03, et GF 118b) sont incubées pendant 10 jours.

2.2. Extraction des lectines

2.2.1. Les lectines extracellulaires

L'extraction des lectines a été réalisée selon la méthode décrite par Singh *et al.*, (1993). Les mycéliums bactériens sont récoltés à partir de la culture liquide en fin de phase exponentielle de croissance par centrifugation à 4000 x g pendant 20min, les surnageant sont récupérés, filtrés (membrane 0.22µm PP, Millipore) et immédiatement soumis à un test d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence de lectines extracellulaires.

2.2.2. Les lectines intracellulaires

Pour extraire les lectines intracellulaires, les culots bactériens sont lavés trois fois avec du tampon PBS, pH 7.2 (**Annexe 2**), puis resuspendus dans le même tampon afin d'obtenir une suspension à 20%. Après un traitement aux lysozymes (0.2mg/mL, 10min à 4°C), les cellules bactériennes sont désintégrées par vibrations ultrasoniques en utilisant un Vibra Cell™ 75043 (Bioblock Scientific, 750W puissance max) avec une sonde de 13mm de diamètre. Le traitement ultrasonique est appliqué à une amplitude de 75% avec un cycle de marche/arrêt de 5 secondes, pendant un temps total de sonification de 3 minutes. Les échantillons sont maintenus dans un bac de glace durant tout le processus. Après sonification, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 25000 x g pendant 30 minutes à 4°C, et les surnageant obtenus sont immédiatement filtrés (membrane 0.22µm PP, Millipore) et testés.

2.3. Test d'hémagglutination et mise en évidence des lectines

Ce test repose sur l'observation de l'agglutination (ou agrégation) des érythrocytes par les lectines visible à l'œil nu sous forme d'une phase gélatineuse, et sur la détermination du point d'équivalence qui est la concentration minimale de lectines montrant une agglutination évidente (**Figure 10**). Les érythrocytes de plusieurs mammifères sont parmi les plus utilisées (humain, lapin, mouton, rat, etc...).

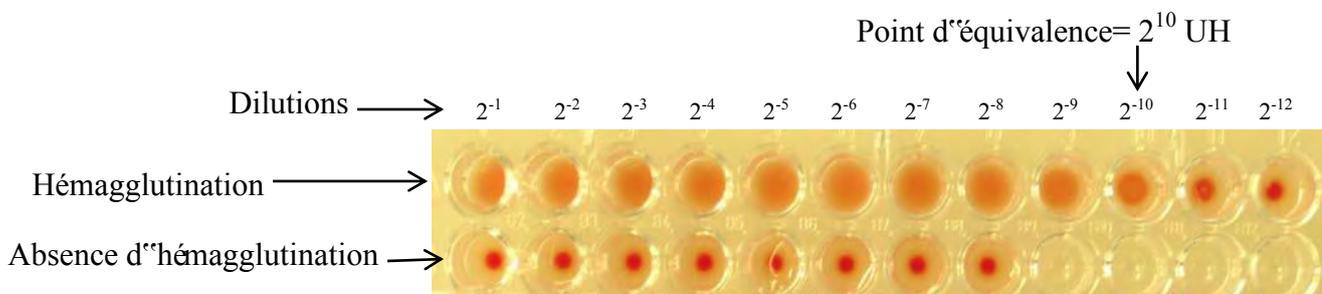


Figure 10. Le test d'hémagglutination sur microplaque de titration.

L'activité hémagglutinante des extraits extra/intracellulaires des six souches actinomycétales a été testée dans des microplaques de titration. 50 μ L de tampon PBS sont placés dans chaque puits de la microplaque, puis 50 μ L de chaque extrait sont ajoutés dans le premier puits, et une double dilution en série est réalisée. Ensuite, 50 μ L de la suspension d'érythrocytes à 4 % en solution saline (NaCl 150 mM) (v/v) sont ajoutés et mélangés à chaque puits (**Annexe 3**). La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après 45 minutes d'incubation à 37° C. En cas d'un résultat positif, les hématies forment un tapis qui couvre le fond du puits de la plaque de microtitration. Contrairement à un résultat négatif ou l'hémagglutination n'a pas eu lieu, on observe que tous les érythrocytes précipitent au fond du puits, et un point rouge peut être observé (**Figure 10**). Cependant, des précautions doivent être prises afin de ne pas confondre entre hémolyse et hémagglutination. La différence entre ces deux phénomènes peut être simplement observée si les puits sont examinés par le côté. Dans le cas d'une hémagglutination, le tapis d'hématies ne couvre que le fond du puits, alors que le surnageant reste translucide. S'il y'a une hémolyse, l'ensemble du puits est rempli avec une solution rouge. La plus petite concentration en extrait brut pour laquelle une hémagglutination est encore visible est appelée point d'équivalence et la concentration en extrait de ce puits correspond à une unité d'hémagglutination (UH).

Le test d'hémagglutination a été réalisé séparément envers les érythrocytes de rat, lapin, souris, et avec les différents groupes sanguins humains ABO. La souche présentant la meilleure activité hémagglutinante a été sélectionnée pour la suite de notre travail.

2.4. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Le dosage des protéines totales des différents extraits est réalisé selon la méthode de Bradford (1976). La bovine serum albumine (BSA) a été utilisée comme standard (**Annexe 4**).

3. Purification des lectines de la souche *M. aurantiaca* GF44c

Après le test d'hémagglutination réalisé sur les différents extraits protéiques, la meilleure activité hémagglutinante spécifique a été obtenue avec du sang de rat, à partir de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c cultivée sur milieu ISP₂, cette souche et ces paramètres (héamties de rat et milieu ISP₂) ont été donc sélectionnés pour la suite de ce travail.

3.1. Préparation de l'extrait brut

L'isolat clinique *Micromonospora aurantiaca* GF44c est cultivé dans 2 litres de milieu ISP₂, pendant 6 jours sur plaque d'agitation (250 rpm), à 30°C. 90g de mycélium bactérien en poids humide sont récoltés par centrifugation à 4000 x g pendant 20min, le culot bactérien est lavé trois fois avec le tampon PBS, et l'extraction des lectines intracellulaires est réalisée selon le même protocole décrit précédemment (**Figure 11**). Les filtrats obtenus sont ensuite concentrés par ultrafiltration (Vivaspin, seuil de rétention 10kDa), puis conservés dans un congélateur à -20°C. C'est cet extrait qui sera utilisé pour la purification, et la caractérisation, et pour les différents tests biologiques.

3.2. Purification préliminaire

3.2.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

L'extrait brut (50mL) de la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation à différents paliers (0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%) afin de séparer les protéines en différentes fractions. Une saturation initiale à 25% a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d'ammonium à l'extrait brut placé dans un bécher à 0°C, sous agitation constante et laissé pendant 4h (**Annexe 5**). Après centrifugation à 20000 x g pendant 30min, les protéines précipitées sont récupérées dans 2mL de tampon Tris-HCl (20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl).

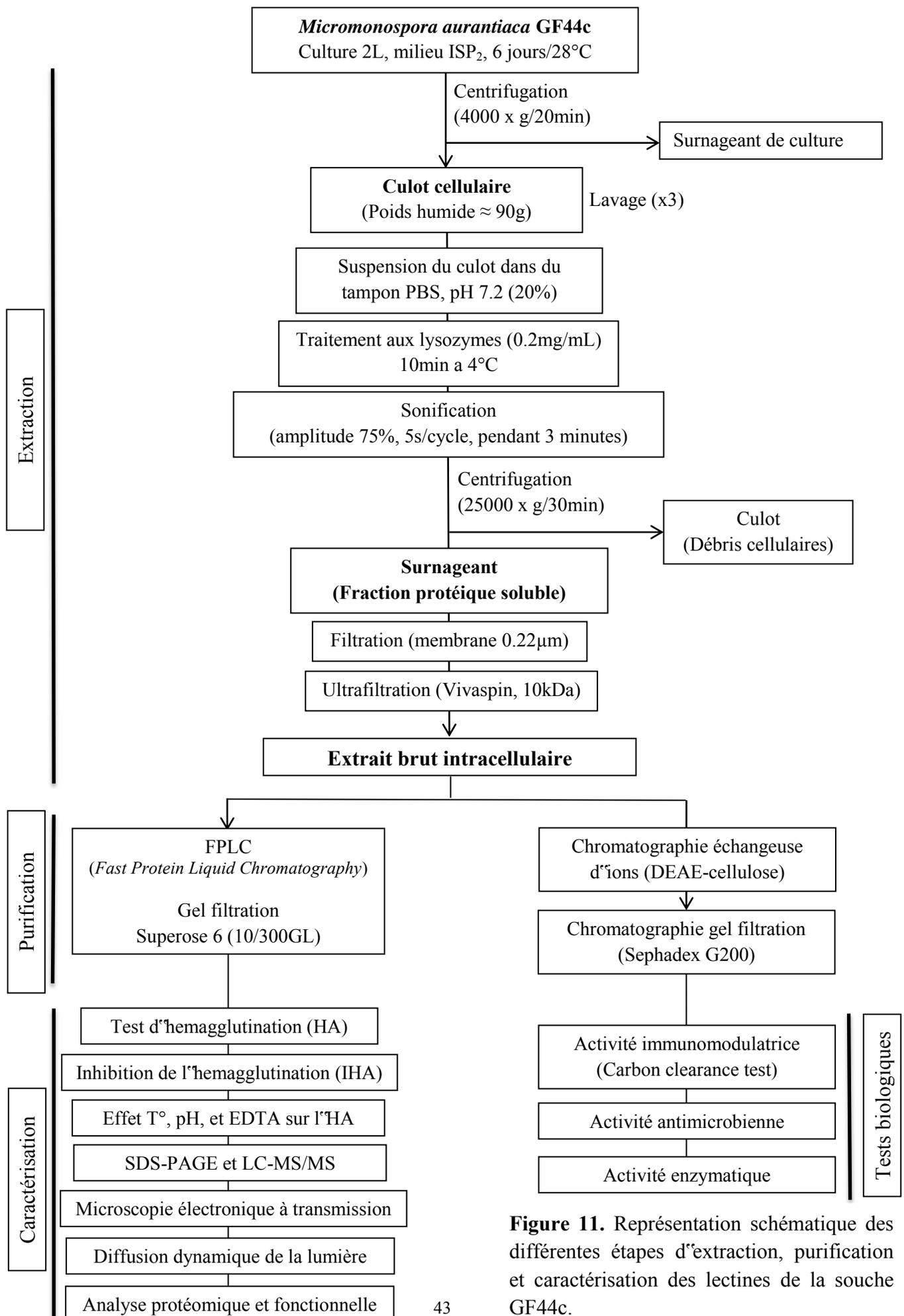


Figure 11. Représentation schématique des différentes étapes d'extraction, purification et caractérisation des lectines de la souche GF44c.

Cette solution représente la première fraction protéique F1(0-25%). Le surnageant obtenu est resoumis pour une autre précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation de 25 à 50% en suivant la même procédure. L'opération se poursuit jusqu'à une saturation à 100% de l'extrait en sulfate d'ammonium. Les 4 fractions protéiques ainsi obtenues F1 (0-25%), F2 (25-50%), F3 (50-75%), F4 (75-100%) sont ensuite dialysées afin d'éliminer le sulfate d'ammonium résiduel.

3.2.2. Dialyse

Les protéines précipitées mises en suspension dans un volume réduit du tampon Tris-HCl (20 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl) sont dialysées contre 2 litres du même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable (Spectra/por ; 20mm ; limite d'exclusion :12kDa) sous une faible agitation à 4°C. Le tampon de dialyse est renouvelé 3 fois chaque 4h. L'activité hémagglutinante de chaque fraction protéique est testée, et les meilleures fractions actives seront utilisées pour la prochaine étape.

3.2.3. Chromatographie

Afin de purifier des lectines produites par la souche *M. aurantiaca* GF 44c, et de choisir la meilleure procédure de purification, différents types de colonnes chromatographiques ont été préparées et testées : chromatographie d'affinité sur gel Sepharose 4B-mucine et Sepharose 4B-fetaine, colonnes d'affinités sepahrose 6B couplées à différents substrats glucidiques (N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine, fucose, mannose, galactose, acide sialique), chromatographie échangeuse d'ions DEAE-cellulose, et chromatographie sur gel filtration Sephadex G200.

- **Chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-cellulose)**

Une colonne échangeuse d'ions (1x10cm) de DEAE-Cellulose (Sigma Aldrich) a été préparée selon les instructions du fabricant. La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl (20mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl). 0.5 mL de la fraction protéique active est chargée à l'intérieur de la colonne à un débit de 0.4mL/min. Les protéines qui n'ont pas réagi avec la résine sont lavées de la colonne par le tampon d'équilibrage. L'élution des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 0.15 à 1.5 M d'NaCl dans le même tampon. Des fractions de 2mL sont récoltées et le profil chromatographique est suivi par lecture de l'absorbance à $\lambda=280$. Les fractions protéiques sont dialysées contre du tampon Tris-HCl, pH 7.5, puis testées. Les fractions actives sont soumises à la prochaine étape de purification.

- **Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-200)**

Dans la chromatographie sur gel filtration, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance hydratée spongiforme dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G200 (Pharmacia). Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 5 à 600 kDa.

Une colonne d'une dimension de (1x60cm) a été préparée puis équilibrée avec du tampon Tris-HCl (20mM Tris-HCl pH7,5 , 150mM NaCl) jusqu'à stabilisation du débit à 0.5mL/min. Le volume mort (V_0) de la colonne est déterminé par injection du bleu de dextran (10^3 kDa) à une concentration de 1 mg/mL.

La fraction douée d'une forte activité hémagglutinante issue de l'échange ionique (2mL) est déposée en haut de la colonne et éluée dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 2mL sont recueillies et caractérisées (activité hémagglutinante contre le sang de rat, et teneur protéique). La fraction active est lyophilisée pour la réalisation des différents tests biologiques. Plusieurs purifications sont nécessaires jusqu'à obtention d'une bonne quantité d'extrait.

3.3. Purification sur système ÄKTA™ FPLC (gel filtration Superose 6)

Afin d'optimiser la purification des lectines contenues dans l'extrait brut de la souche GF44c, Une chromatographie en phase liquide rapide des protéines a été réalisée (FPLC, fast protein liquid chromatography). Il s'agit d'une chromatographie en phase liquide à haute performance utilisée pour purifier ou analyser des mélanges de protéines. L'FPLC a été développée et commercialisée en Suède par « Pharmacia » en 1982 et a été appelée à l'origine chromatographie liquide rapide à haute performance pour contraster avec l'HPLC (Chromatographie liquide à haute performance). L'FPLC est généralement appliquée aux protéines; cependant, en raison du large choix des résines et des tampons, ses applications sont maintenant nombreuses. Dans une FPLC, la pression et le débit sont continuellement contrôlés, et l'élution peut être suivie en temps réel. La différence avec l'HPLC est que la pression appliquée à la colonne est relativement faible (généralement inférieure à 5 bars), mais le débit est significativement plus élevé, de 1 à 5 mL/min, ceci permet d'avoir une séparation rapide et à haute performance en gardant les protéines sur leur formes natives. Elle peut être appliquée aussi bien pour la séparation des protéines dans de petits volumes, comme pour des volumes à échelle industrielle.

Dans notre étude, 150µL d'extrait brut concentré ($\approx 6\text{mg/mL}$) sont appliqués directement dans une colonne „Tricorn“ prépaquée de Superose 6 (10/300GL ; GE Healthcare)

haute performance, montée sur système AKTA explorer 100 (GE Healthcare). Le Superose 6 est une matrice d'agarose hautement réticulée, avec une stabilité physique et chimique élevée, et un domaine de fractionnement allant de 5 à 5000 kDa. La séparation est réalisée dans du tampon HEPES (20mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl) (**Annexe 2**), avec un débit d'écoulement de 0.5mL/min. La chromatographie est suivie en temps réelle par lecture spectrophotométrique UV à 280nm. Des fractions de 1mL sont récoltées par un collecteur Frac 900 (GE Healthcare) et maintenues à une température de 4°C durant tout le processus de purification. La colonne a été préalablement calibrée en utilisant un kit de haut poids moléculaire pour gel filtration (HMW Kit, GE Healthcare). Ce kit comprend, le bleu de Dextran 2000, Thyroglobuline (669kDa), Ferritine (440kDa), Aldolase (158kDa), Conalbumine (75kDa), et l'Ovalbumine (43kDa). L'activité hémagglutinante des fractions obtenues est testée contre des hématies de rat, et la fraction active est utilisée, pour la caractérisation.

4. Caractérisation des lectines de la souche *M.aurantiaca* GF44c

4.1. Test d'hémagglutination (Rüdiger, 1993)

L'activité hémagglutinante des différentes fractions protéiques obtenues après purification sur gel filtration (Superose 6), est testée sur des microplaques de titration. 50 µL de tampon HEPES sont placés dans chaque puits de la microplaque, puis 50 µL de chaque fraction sont ajoutés dans le premier puits. Une double dilution en série est réalisée. Ensuite, 50 µL de la suspension d'érythrocytes de rat à 4 % en solution saline sont ajoutés et mélangés à chaque puits, et les plaques sont ensuite incubées à 37° C pendant 45 minutes. La fraction active est soumise à un test d'inhibition.

4.2. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) (Goldstein and Poretz, 1986), permet de cribler les ligands potentiels de la lectine. Lorsque l'hémagglutination peut être entièrement inhibée par le ligand testé, la concentration minimale en ligand empêchant la formation du réseau est mesurée ; c'est ce qu'on appelle le potentiel d'inhibition du ligand. Pour pouvoir comparer les potentiels d'inhibition de plusieurs ligands, il est préférable, de faire les différents tests sur un même lot de globules rouges. En effet, la valeur du potentiel d'inhibition peut dépendre de la source ainsi que de l'âge des érythrocytes. La mesure de l'inhibition d'hémagglutination est un test rapide et simple qui permet d'évaluer les ligands solubles de façon comparative, donnant un ordre approximatif d'avidité.

Pour ce test d'inhibition, notre fraction active est diluée dans du tampon HEPES pH7.2, de façon à obtenir une concentration qui correspond à 8 UH. Différents sucres et glycoprotéines (27 sucres et 7 glycoprotéines) ont été préparés à une concentration initiale de 400mM et de 1mg/mL respectivement, dans du tampon HEPES, pH7.2. Un volume de 50µL de solution de ligand est déposé dans le premier puits, puis une gamme de concentrations est réalisée par dilutions en cascade de deux en deux dans les puits suivants. Un volume de 25µL de la fraction active est ajouté à chaque puits contenant 25µL de sucre/glycoprotéine à tester. Après incubation 30min à 37°C, 50µL d'une suspension d'érythrocytes de rat à 4% sont ajoutés à chaque puits. L'inhibition de l'hémagglutination est lue après 60min d'incubation à température ambiante.

4.3. Effet de la température, du pH , et de l'EDTA sur l'hémagglutination

L'effet de la température sur l'activité hémagglutinante est déterminé en incubant la fraction active (0.3mg/mL) à différentes températures (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, et 100° C) pendant 1 h. Les échantillons sont ensuite rapidement refroidis dans de la glace.

L'activité hémagglutinante est testée en comparaison avec un échantillon témoin de lectines (32UH).

Pour tester l'effet du pH, des échantillons de lectines sont dialysés contre des solutions tampons à différents pH [3-11] pendant 24 h. Différents tampons ont été utilisés pour cela (selon la gamme de pH) : 20 mM de tampon citrate phosphate (pH 3.0 à 6.0), 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 7.0 à 9.0), et 20 mM de tampon Glycine-NaOH (pH 10.0 à 11.0). L'activité hémagglutinante est testée après une 2^{ème} dialyse des échantillons contre du tampon HEPES, pH7.2 pendant 18 h à 4 ° C.

Afin de déterminer l'effet de l'EDTA sur l'hémagglutination, des échantillons de la fraction active sont incubés dans un volume équivalent de tampon HEPES pH 7.2, additionné d'EDTA (Concentrations initiales : 10, 20 et 40mM) pendant 1h. Les échantillons sont ensuite distribués dans des puits de plaque de microtitration et l'activité d'hémagglutination est mesurée comme décrit précédemment.

Les hématies de rat ont été utilisées pour le test d'hémagglutination. Les résultats de l'activité hémagglutinante des échantillons traités sont exprimés en pourcentage par rapport à l'échantillon témoin qui représente 100%.

4.4. Electrophorèse SDS-PAGE

L'SDS-PAGE de la fraction active obtenue et de l'extrait brut est réalisée en conditions dénaturantes sur gel polyacrylamide à 15% (Laemmli, 1970). Les échantillons à analyser ont été réduits puis chauffés à 100°C pendant 5min, et finalement chargés dans les puits d'un gel polyacrylamide de 1.5mm d'épaisseur. Le kit de marqueurs moléculaire utilisé est Bio-Rad Precision Plus, 10-250 kDa (Bio-Rad Precision Plus Protein, All Blue Prestained Protein standards). Après électrophorèse, le gel est traité par une solution de bleu de

Coomassie (0,04 % (p/v) Coomassie brillant blue R-250, 40 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique glacial) pendant 24h.

L'excès de colorant est ensuite éliminé par une solution de (25 % (v/v) méthanol, et 10 % (v/v) acide acétique glacial) jusqu'à transparence du gel. Le gel est finalement lavé abondamment à l'eau.

4.5. Microscopie électronique à transmission (MET)

Afin d'analyser notre échantillon, une goutte de 5 μ L de la fraction active purifiée à une concentration de 0.3mg/mL est placée sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formar et de Carbone, préalablement rendue hydrophile par une décharge cathodique pendant 30 secondes. La grille est ensuite prise avec une pince fine et rincée par 5 à 6 gouttes d'eau milliQ délivrées par une fine pipette Pasteur, après cette étape de lavage deux gouttes d'uranyl acetate sont placées sur la grille, et laissées pendant 30 à 40secondes. L'excès est absorbé par un petit morceau de papier filtre puis la grille est mise sur un papier filtre dans une boîte fermée et laissée à sécher pendant quelques dizaines de minutes avant d'être introduite dans le microscope. Les spécimens sont examinés par microscope électronique à transmission fonctionnant à 80 kV (JEM-1400, JEOL, Tokyo, Japan).

4.6. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La fraction active purifiée (0.3mg/mL) a été filtrée à travers une membrane de 0.22 μ m, puis centrifugée à 20000 x g pendant 30min, afin d'éliminer les bulles d'air résiduelles. La distribution de la taille est obtenue à partir d'une mesure de la vitesse de fluctuation de la lumière réfléchi à un angle donné par les particules dans la solution, dans notre cas un faisceau laser d'une longueur d'onde de 633nm est appliqué à un angle de 90° (Zetasizer Nano ZS; Malvern instruments). Les résultats sont présentés par un histogramme

(Nombre des particules en suspension en fonction leur rayon hydrodynamique). Ce rayon est directement proportionnel à la taille des particules en solution.

4.7. Spectrométrie de masse et étude protéomique

Après fractionnement de notre échantillon protéique par des techniques séparatives telles que les gels d'électrophorèse 1D ou des chromatographies liquides. Les protéines ainsi séparées sont digérées en peptides à l'aide de protéases, le plus couramment avec la trypsine. Les mélanges de peptides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Puis, les identifications des protéines et l'exploitation des données de spectrométrie de masse sont réalisées grâce à des outils bioinformatiques spécialisés (**Figure 12**).

4.7.1. Identification des protéines sur gel d'électrophorèse

- Digestion trypsinique *in gel*

La digestion *in gel* est basée sur la procédure de Rosenfeld (Rosenfeld *et al.*, 1992). Les bandes protéiques obtenues après électrophorèse sont excisées et coupées en de petits morceaux de (1x1.5mm). Ils sont tout d'abord décolorés en utilisant une solution de 25mM de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) pH 8.8, et de 50% d'acétonitrile (CH_3CN) pendant 10 min ; cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que les morceaux de gel se décolorent complètement. Les gels sont ensuite déshydratés par l'addition de 100% CH_3CN pendant 5 minutes avant de les sécher à 37°C. Une réduction est réalisée par addition d'une solution de 15mM de Dithiothreitol à 46°C pendant 60 minutes, suivie d'une alkylation avec 55mM d'Iodoacetamide à température ambiante pendant 60 minutes (cette réaction doit s'effectuer dans le noir). Les morceaux de gels sont ensuite lavés deux fois avec 25mM NH_4HCO_3 et 100% CH_3CN , puis séchés à 37°C pendant 10 min.

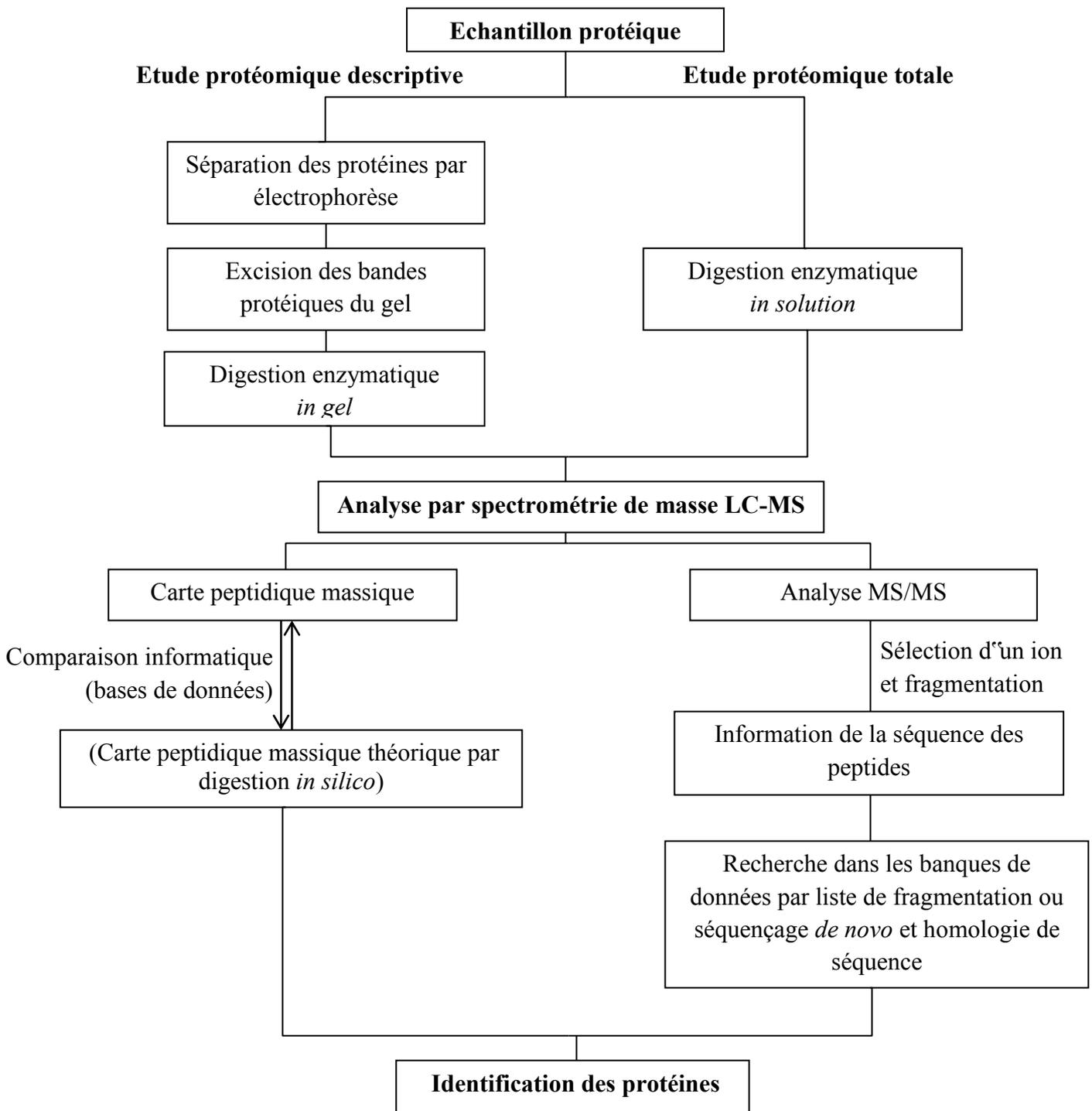


Figure 12. Identification protéique par spectrométrie de masse (Miguet, 2006).

Les protéines sont digérées par la trypsine (protéolyse après une arginine ou une lysine). Les peptides obtenus sont ionisés et analysés par le spectromètre de masse (MS). Chaque ion est représenté selon sa valeur m/z et son abondance. La liste des masses de ces ions est appelée carte peptidique massique et peut être comparée aux masses des peptides obtenus par digestion *in silico* du protéome théorique de l'organisme étudié ou des séquences protéiques présentes dans les bases de données internationales. Cette comparaison permet l'identification protéique. Dans les cas où cette analyse n'est pas possible ou pas suffisante une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est nécessaire. Pour cela un peptide est sélectionné, fractionné et la masse de chacun des peptides issus de son fractionnement est analysée, ceci conduit à l'obtention d'une partie de la séquence de la protéine analysée qui est utilisée pour l'identification finale.

La digestion trypsinique est réalisée par l'addition de 25 μ L (environ 50ng) de trypsine (Promega, Madison) sur les gels, pendant 15min à 4°C. Cette étape permet à la trypsine de bien pénétrer dans les fragments de gels, et la température prévient l'autolyse de l'enzyme. La solution de trypsine est ensuite enlevée et remplacée avec 50mM NH₄HCO₃, et les gels sont incubés toute la nuit à 37°C. Les peptides restants dans les morceaux de gels sont extraits par 100 μ L de 100% CH₃CN pendant 20min, la solution est ensuite évaporée au SpeedVac (Eppendorf) jusqu'à contraction des morceaux de gel. Finalement les gels sont jetés, et les peptides concentrés sont reconstitués avec 10 μ L d'acide formique à 0.1% (HCOOH).

- Nano HPLC Q-Exactive plus

L'analyse est réalisée sur system HPLC nanodébit (U3000 RSLC Thermo Fisher Scientific), connecté à un spectromètre de masse hybride quadripôle-Orbitrap™ (Q Exactive™ plus, Thermo Scientific) équipé avec une source nanoelectrospray.

Les peptides obtenus par digestion trypsinique (1 μ L) sont chargés dans une précolonne de concentration (TAclaim 5 μ m, 300 μ m i.d x 5 mm) utilisant une injection en boucle partielle. La colonne est lavée avec du tampon A1 (5% Acétonitrile et 0.1% acide formique) pendant 5min à un débit de 10 μ L/min, et les peptides sont ensuite élués et séparés sur une nano colonne C18 reverse-phase (Acclaim PepMap100 C18, 3 μ m, 75 mm i.d. \times 500 mm). L'élution des peptides s'effectue par un gradient linéaire de 5 à 50% de tampon B1 (75% acétonitrile and 0.1% acide formique) à un débit de 250nL/min et une température de de 45°C. Une fois élués de la colonne, les peptides sont ionisés par nanoélectrospray et conduits dans le spectromètre de masse Q-Exactive-plus pour des analyses MS et MS/MS en parallèle.

La procédure s'opère en mode MS/MS "data-dependent" : un scan MS (dans la gamme m/z 400-1600) est suivi de deux spectres MS/MS où les ions précurseurs sont les ions les plus intenses du scan MS précédent (fragmentation HCD).

Une analyse MS à haute résolution (70 000 à $m/z = 400$, AGC réglé sur 10^6 ions avec un temps de remplissage de 180ms) est effectuée dans l'Orbitrap, en l'espace d'environ 1.6 secondes. Une période d'exclusion de 60 secondes permet d'éviter de fragmenter un même peptide plusieurs fois de suite (exclusion des m/z de plus ou moins 5 ppm de la masse du peptide) et donc de favoriser l'identification de peptides moins abondants. La résolution des spectres HCD a été fixée à 35 500 avec $m/z = 200$ (AGC réglé sur 10^5 ions avec un maximum de temps de remplissage de 120ms). L'énergie de collision normalisée est de 28eV.

- **Traitement bioinformatique des données**

Le logiciel Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) a été utilisé pour comparer les résultats de spectrométrie de masse en utilisant le moteur de recherche SEQUEST. L'interrogation a été réalisée contre la base de données Swiss-Prot (Proteome ID : UP000001908, *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442, Septembre 2015), en incluant la possibilité de modifications suivantes : Oxydation des méthionines, tryptophane, histidine, désamidation de l'asparagine, glutamine, carbamidomethylation de la cysteine, phosphorylation de la tyrosine, serine, threonine, pyro-Glu, sont spécifiées comme modifications variables des peptides pour toutes les recherches SEQUEST. Pour une meilleure identification des peptides, un taux de faux positifs de 1% et un minimum de 2 peptides uniques ont été utilisés pour la filtration des peptides.

4.7.2. Analyse protéomique totale

- **Digestion trypsinique *in solution***

La digestion et l'extraction peptidique a été réalisée selon la procédure décrite par (Devos *et al.*, 2015). Les protéines contenues dans la fraction active sont précipitées par

l'ajout d'acide Trichloroacétique à 20%. Le culot protéique est lavé deux fois avec de l'acétone glacé, et les protéines sont finalement reprises dans un tampon d'Urée (2M Urée, 50mM Bicarbonate d'ammonium, pH8). Une réduction des protéines est réalisée avec l'addition de 10mM de Dithiothreitol pendant 30min à 60°C, suivie d'une alkalysation avec une solution de 20mM d'Iodoacetamide à température ambiante pendant 30 min, et les protéines sont finalement digérées par l'ajout de trypsine (Promega, Madison) (1:50w/w) pendant 12h à 37°C.

- NanoLC-ESI-MS/MS

L'échantillon peptidique (conditionné dans 100mM de formiate d'ammonium, pH 10) est séparé sur system UPLC NanoAcuity (Waters Corporation, Milford, MA), à une seule dimension. La séparation des peptides se fait à pH élevé. Les tampons A2 et B2 utilisés sont composés respectivement de (3% d'acétonitrile, 20mM de formiate d'ammonium, pH 10) et (65% d'acétonitrile, 20mM de formiate d'ammonium, pH 10). L'échantillon est chargé sur une colonne Xbridge® Peptide BEH C18 NanoEase™ (130 Å, 5 µm, 300 µm x 50 mm; Waters) avec le tampon A2 à un débit de 2µL/min. Les peptides sont ensuite élués de la colonne avec du tampon B2, puis concentrés sur une colonne de piégeage Symmetry® C18 trapping (5 µm, 180 µm x 20 mm; Waters).

La sortie de la colonne est directement reliée à un émetteur PicoTip (uncoated SilicaTip™ 10+/-1 µm, New Objective, Woburn, MA, US) monté sur une source Nanolockspray d'un spectromètre de masse de type SYNAPT™ G1 HDMS (Waters). L'analyseur du temps de vol (TOF) a été calibré avec des fragments MS/MS de la [glu1]-fibrinopeptide B humaine (Glu-fib) de m/z 72 à 1285, et les données ont été corrigées en utilisant la masse monoisotopique des précurseurs doublement chargés de la Glu-fib (m/z= 785.8426). L'acquisition des données a été réalisée en mode "data-dependent".

La gamme m/z sélectionnée est de 125 à 2000Da. La tension capillaire est réglée à 3.0kV, la tension du cône d'échantillonnage à 26V, la tension du cône d'extraction à 4V ; et la température de la source réglée à 80°C.

- **Traitement bioinformatique et identification des protéines**

Les données de l'analyse spectrométrique sont traitées par un serveur interne : Protein Lynx Global ServerTM v2.5 (PLGS, Waters Corporation), en utilisant les paramètres suivants :

- Base de données : SwissProt,
- Espèce : *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442 (Proteome ID : UP000001908, Septembre 2015),
- Digestion trypsinique,
- La tolérance de l'ion précurseur et de l'ion fragment est déterminée automatiquement,
- Une masse protéique maximale de 250 000 Da,
- Une détection d'un minimum de 5 ions fragments par peptide,
- Un minimum de 10 ions fragments et 2 peptides par protéine.
- Une augmentation de 57,02 Da sur les résidus de cystéine (carboxyamidomethylation fixe), et 15,99 Da sur les résidus méthionine (oxydation dynamique),
- Un maximum d'une seule erreur de clivage, et un taux de faux positifs à 4% a été autorisé.

4.7.3. Analyse fonctionnelle des protéines identifiées

L'analyse fonctionnelle a été déterminée selon la méthode COG (Clusters of Orthologous Groups). Les différents groupes COG ont été créés manuellement en utilisant les séquences des protéines pour les recherches dans la base de données COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Les COG ont été regroupés en

fonction des définitions proposées dans la base de données des domaines conservés du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tatusov *et al.*, 2000).

La prédiction de la localisation subcellulaire des protéines identifiées a été réalisée en utilisant l'algorithme en ligne PsortB.v3 (<http://www.psort.org/psortb/>) (Yu *et al.*, 2010). L'outil PRED-TAT a permis de prédire la présence de peptides signal Tat et Sec (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/submit>) (Bagos *et al.*, 2010). Les séquences des protéines identifiées ont également été soumises à une analyse *in silico* en utilisant la ressource PRED-LIPO (<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-LIPO/>), afin de prédire les lipoprotéines (Bagos *et al.*, 2008).

5. Activités biologiques

5.1. Test d'activité anti-microbien

5.1.1. Les souches tests

La fraction active obtenue après chromatographies échangeuse d'ions et gel filtration (Sephadex G200) a été testée pour mettre en évidence son activité anti-microbienne, vis-à-vis de neuf souches bactériennes (quatre Gram- et cinq Gram+), et de deux souches de champignons filamenteux.

Les bactéries tests ont été obtenues au niveau du laboratoire de Bactériologie Médicale du C.H.U. de Constantine. (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus faecalis*, et *Salmonella enteritidis*). Les champignons tests proviennent du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'Université des frères Mentouri-Constantine. (*Aspergillus niger* CIP 1431, et *Fusarium oxysporum* CIP 625.72).

5.1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Pour chaque bactérie test, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures, mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile de telle manière à obtenir une densité optique comprise entre 0.1 à 0.2 pour une longueur d'onde de 620 nm (approximativement 10^6 CFU/mL).

Les échantillons de la fraction active sont filtrés dans des conditions aseptiques à travers une membrane de 0.22 μ m. La technique de diffusion des disques sur gélose est réalisée selon la méthode décrite par (Murray *et al.*, 1999). Des disques de papier filtre stériles (4 mm de diamètre, Whatman N°3, U.K.) reçoivent 20 μ L de la fraction active hémagglutinante à différentes concentrations (0.5, 0.25, et 0.125mg/mL), les disques témoins reçoivent 20 μ L de tampon. Après séchage sous courant d'air chaud les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablementensemencé par écouvillon avec les souches tests. Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes sont laissées 2 heures à 4°C. La lecture des résultats est réalisée après 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

5.1.3. Mise en évidence de l'activité antifongique

Pour l'activité antifongique *Aspergillus niger* CIP 1431, et *Fusarium oxysporum* CIP 625.72 sontensemencées par pique centrale sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose Sabouraud, puis incubées à 30°C. Après développement du mycélium fongique, des disques stériles de papier filtre sont déposés à une distance de 1cm de la bordure de la colonie et reçoivent aseptiquement 20 μ L d'échantillon à tester, préparés à différentes concentrations (0.5, 0.25 et 0.125 mg/mL). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 jours. Une inhibition de la croissance fongique au contact des disques est considérée comme un résultat positif.

5.2. Test d'activité immunomodulatrice *in vivo*

L'effet immunomodulateur de l'extrait hémagglutinant obtenu après purification sur colonne échangeuse d'ions et gel filtration a été évalué et mesuré *in vivo* par le test de clairance de carbone (carbone clearance rate test) selon le protocole décrit par (Biozzi *et al.*, 1953).

Le test de clairance de carbone permet d'évaluer *in vivo* l'activité immunomodulatrice de certaines molécules sur le système réticulo-endothélial. Le système réticulo-endothélial (RES) est un système constitué majoritairement de cellules phagocytaires. Les cellules du RES jouent un rôle vital dans la clairance des particules de la circulation sanguine. Lorsque des particules de carbone colloïdales sous la forme d'encre sont injectées directement dans la circulation sanguine d'une souris, les cellules phagocytaires vont essayer de neutraliser ces particules. Cette activité phagocytaire exprimée par l'indice phagocytaire (K), est évaluée par la mesure du taux de particules de carbone présentes dans le sang dans un intervalle de temps bien précis. L'élimination des particules de carbone dans le sang est régie par équation exponentielle (Gokhale *et al.*, 2003). Dans le cas d'une immunostimulation, le taux de clearance des particules de carbone par les cellules phagocytaires sera très important, à l'inverse d'une immunosuppression ou le taux de clearance du carbone sera très faible.

5.2.1. Animaux

Des souris mâles (*Mus musculus*, 25-35 g) ont été obtenus à partir de la pharmacie centrale d'Algérie. Les animaux ont été logés dans des conditions normales de température (25 ± 1 °C), une exposition à la lumière de 12 h par jour, et ont été nourris avec un régime alimentaire standard avec un libre accès à l'eau. Toutes les expériences ont été menées dans le strict respect des lignes directrices fournies par le guide du comité d'éthique sur l'expérimentation animale (CPCSEA).

5.2.2. Indice phagocytaire

Les souris sont séparées en 4 groupes de 7 individus chacun. L'extrait de lectines lyophilisé est dissout dans de l'eau physiologique à des doses de 30,50 et 100mg/Kg par poids corporel, pour les groupes expérimentaux (GII, GIII, et GIV) respectivement. Le groupe control (GI) reçoit 0.5mL d'eau physiologique, alors que les groupes expérimentaux reçoivent par injection intraveineuse 0.5mL de l'extrait de lectines aux différentes concentrations. Après 48h, les souris reçoivent une autre injection intraveineuse d'une solution aqueuse d'encre de Chine (Encre de chine: 3mL, eau physiologique: 4mL, et solution de gélatine à 3%: 4mL) à une dose de (0.1mL/10g). Des échantillons sanguins sont prélevés à partir de la veine retro orbitale grâce à des tubes capillaires à hématocrites après 5 et 15 min de l'injection. Les prélèvements sanguins (30µL) sont mixés avec 4 mL d'une solution de carbonate de sodium à 0.1% afin de provoquer la lyse des hématies, et l'absorbance est directement mesurée au spectrophotomètre à 675nm (Singh *et al.*, 2012). Après cette étape, les souris sont immédiatement sacrifiées, le foie ainsi que la rate de chaque individu sont prélevés, lavés à l'eau physiologique puis pesés. L'activité phagocytaire est exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure toutes les fonctions du système réticulo-endothélial en contact avec le sang, et par l'indice phagocytaire (corrigé α) qui exprime cette activité par unité de poids des organes actifs: foie et rate. Le taux de clairance est exprimé quant à lui par la période de demi-vie des particules de carbone dans le sang ($t_{1/2}$, min). Ces paramètres sont calculés au moyen des équations suivantes: (Biozzi *et al.*, 1953; Drissi *et al.*, 2006):

$$K = \frac{(\ln OD1 - \ln OD2)}{(t2 - t1)} , \quad t_{1/2} = 0.693 / K , \quad \alpha = \sqrt[3]{K} \frac{\text{poids corporel de l'animal}}{\text{poids (foie + rate)}}$$

OD1 et OD2 sont les densités optiques aux temps t1 (5min) et t2 (15min) respectivement.

5.2.3. L'analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de comparaison de Dunnett's, en utilisant l'outil statistique XLSTAT 2013 pour Windows Office. Les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type, avec un seuil de signification statistique fixé à 5%.

5.3. Test d'Activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'extrait brut et de la fraction active a été testée sur gélose ISP₉ (Shirling and Gottlieb, 1966), additionnée pour chaque test de 0.5% de caséine, gélatine, pectine, et cellulose respectivement. Pour l'activité chitinolytique, un milieu minimum additionné de 0.2% de chitine colloïdale est utilisé (Hsu and Lockwood, 1975). Des puits de 4mm de diamètre creusés dans les boîtes reçoivent 30µL de la fraction active (0.3mg/mL) ou de l'extrait brut (6mg/mL). Les boîtes sont ensuite incubées pour un minimum de 5 jours à 25°C. La présence d'activité enzymatique se traduit par l'apparition de zones claires autour des puits. L'hydrolyse de la cellulose et de la pectine est révélée par l'apparition de zones claires après coloration à l'Iodine, ou d'une solution à 1% de Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, respectivement (Jacob *et al.*, 2008; Mäki-Arvela *et al.*, 2011).

RESULTATS

1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante et sélection de la meilleure souche

Six souches actinomycétales, dont 5 appartenant à des genres rares d'actinomycètes, ont été choisies pour mettre en évidence la production de lectines, aussi bien en milieu extracellulaire qu'intracellulaire. Pour cela, ces différentes souches ont été cultivées sur 3 milieux de culture différents. Les souches GF03, GF 118b et GF 262b ont pu croître que sur le milieu ISP₂.

Après extraction des différentes fractions protéiques (intra et extracellulaires), un test d'hémagglutination a été réalisé en utilisant 7 types d'érythrocytes différents. Les résultats montrent une absence de l'agglutination des érythrocytes humains avec tous les extraits. La plupart des activités sont observées avec les érythrocytes de rat et de lapin. On remarque que l'activité semble plus prononcée avec les extraits intracellulaires qu'extracellulaires. Cette différence d'activité est sûrement due à la teneur en protéines qui est plus faible dans les extraits extracellulaires.

Dans notre étude, les meilleures activités sont observées avec les extraits de la souche GF 44c, notamment avec les érythrocytes de rat et de lapin (**Tableau 3**). Le milieu ISP₂ et PMY semblent favoriser l'activité hémagglutinante en comparaison avec le milieu Bennett. L'activité la plus prononcée est observée sur les hématies de rat avec l'extrait intracellulaire de la souche GF44c, obtenu après une culture de 6 jours sur milieu ISP₂ (activité hémagglutinante spécifique = 9.86 UH/mg).

2. Purification

L'extrait intracellulaire de la souche GF44c présentant la meilleure activité hémagglutinante a été sélectionné pour la suite de l'étude.

Afin d'étudier ces hémagglutinines, une culture de deux litres sur milieu ISP₂ a été réalisée pour la souche *M.aurantiaca* GF 44c. Après une incubation de 6 jours, la fraction protéique intracellulaire est extraite selon le protocole décrit par (Singh *et al.*, 1993).

Tableau 3. Activité hémagglutinante spécifique des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocytes utilisés.

Référence	Nom des Souches	Nature de l'extrait	Milieux de culture		
			ISP ₂	Bennett	PMY
GF 44b	<i>Kribbella sp.</i>	IC	-	R (1.38) L (3.66)	-
GF 44c	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	EC	R (6.95) L (3.47) S (0.86)	R (3.47) L (3.47) S (0.86)	R (3.47) L (3.47)
		IC	R (9.86) L (4.93) S (1.23)	R (4.93) L (4.93) S (0.61)	R (4.93) L (4.93) S (0.61)
GF 03	<i>Nonomuraea roseola</i>	IC	L (5.36)	-	-
GF 262b	<i>Actinomadura madurae</i>	IC	R (2.25) L (4.50)	-	-
GF P 40	<i>Streptomyces sp.</i>	EC	R (1.53) L (1.53)	-	-
		IC	R (0.40) L (3.23)	L (0.40)	R (3.23) L (3.23)

IC : extrait intracellulaire, EC : extrait extracellulaire, Hémagglutination positif (R : Rat, L : Lapin, S : Souris). L'activité hémagglutinante spécifique est exprimée en UH/mg.

2.1. Purification préliminaire

La procédure de purification est une étape cruciale pour la suite de notre travail. Il est nécessaire de réaliser plusieurs purifications préliminaires, afin de choisir la procédure la plus optimale. Dans la littérature, la plupart des lectines sont purifiées en une seule étape sur des colonnes d'affinités couplées à différents ligands saccharidiques (Nascimento *et al.*, 2012), notamment (Mannose, fucose, galactose N-acétyl glucosamine (GlcNac), N-acétyl galactosamine (GalNac), et acide sialique), ces monosaccharides et leurs dérivés sont les unités typiques des structures d'oligosaccharides sur les surfaces cellulaires, particulièrement celles des érythrocytes. Dans ce travail, nous avons préparé et testé plusieurs colonnes d'affinités afin de purifier ces lectines, des colonnes Sepharose-6B couplées au mannose, fucose, galactose, GlcNac, GalNac, en plus des colonnes Sepharose-4B couplées à des glycoprotéines comme, la fétuine et la mucine.

Aucune de ces colonnes ne s'est révélée efficace pour la purification de ces molécules (Résultats non mentionnés), ceci s'explique par l'affinité de ces molécules à des ligands beaucoup plus complexes que ceux que nous avons testés sur ces colonnes.

Afin de purifier ces molécules nous avons essayé une autre approche, en utilisant une purification sur 3 étapes, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (DEAE-cellulose), plus une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G200).

Après précipitation différentielle de l'extrait brut de la souche *M.aurantiaca* GF44c sur 4 paliers de concentration (F1 [0-25%], F2 [25-50%], F3 [50-75%], F4 [75-100%]) et dialyse des différentes fractions obtenues, Le test d'hémagglutination montre que les 3 premières fractions contiennent des hémagglutinines, particulièrement la fraction F2 [25-50%] (64UH). Les fractions F1, F2 et F3 [0-75%], ont été regroupées, puis soumises à une chromatographie échangeuse d'ions. Le profile chromatographique sur DEAE-Cellulose indique l'élution de 3 pics protéiques (1 pic après lavage de la colonne, et 2 pics après élution avec un gradient linéaire d'NaCl [0.5-1.5 M] (**Figure 13**).

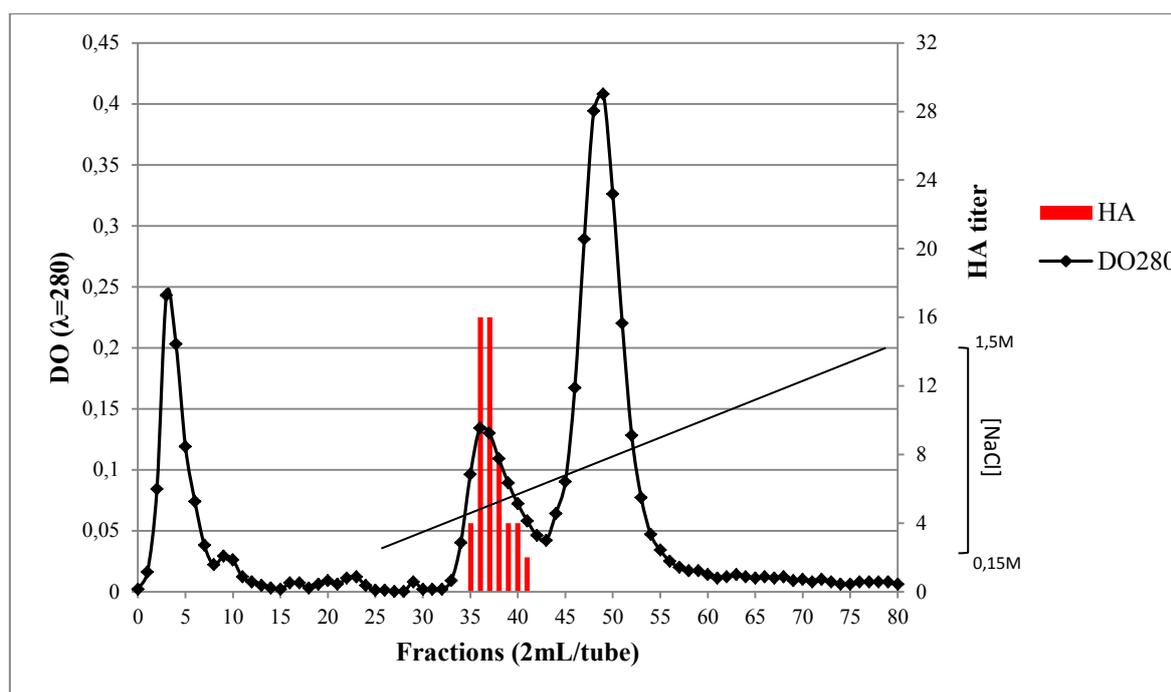


Figure 13. Purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c sur colonne échangeuse d'ions (DEAE-cellulose).

Seul le premier pic obtenu après élution $[\text{NaCl}] \approx 0.3\text{M}$, présente une activité hémagglutinante de l'ordre de 16UH. Cette fraction a été ensuite soumise à une chromatographie sur gel filtration Sephadex G200. Le chromatogramme obtenu montre l'élution d'un seul pic protéique dans le volume mort de la colonne, avec une activité maximale de l'ordre de 16UH également (**Figure 14**).

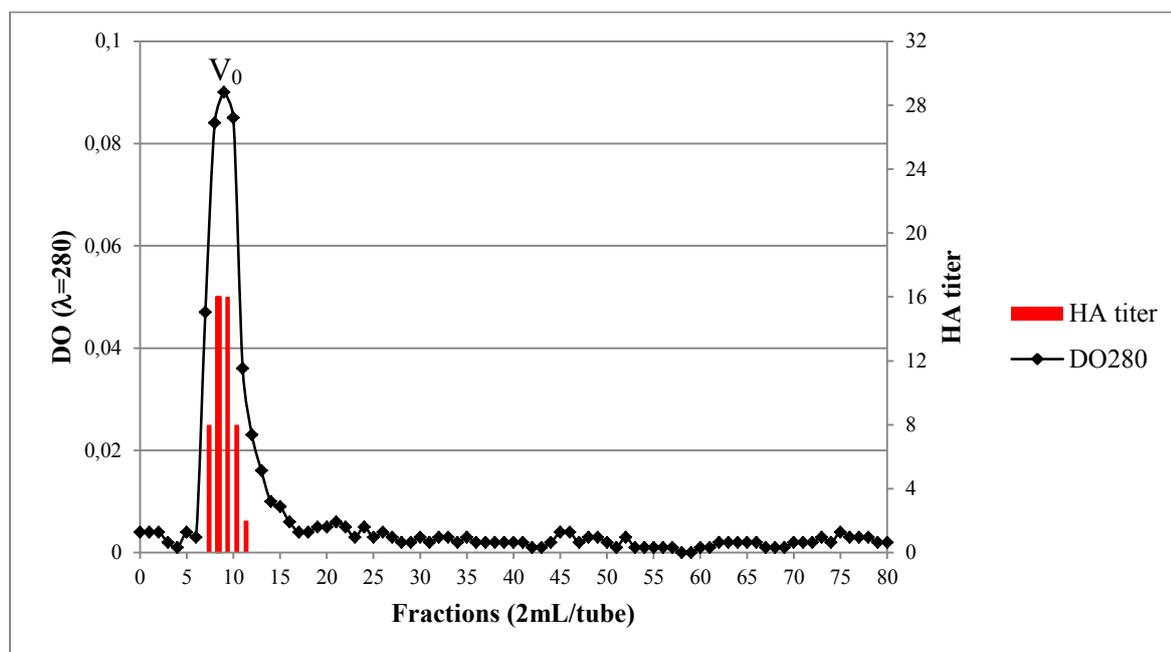


Figure 14. Purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c sur colonne Sephadex G200.

La procédure de cette purification préliminaire est décrite dans le **tableau 4**. L'activité spécifique de l'extrait brut était de 9.71 (UH/mg), et elle est passée à (11.78 UH/mg) après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à (29.62UH/mg) après la chromatographie (DEAE et G200). Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 3.05, avec un rendement assez faible de 1%.

Tableau 4. Purification préliminaire des lectines à partir de la souche *M.aurantiaca* GF44c.

Fractions	Volume (mL)	Proteines (mg)	Activité Totale (UH) ^a	SHA (UH/mg) ^b	Indice de Purification ^c	Rendement (%) ^d
Extrait brut	50	329.54	3200	9.71	1	100
SA [0-75%]	2	10.86	128	11.78	1.22	4
DEAE-Cellulose	3.5	2.94	56	19.04	1.96	1.75
Sephadex-G200	2	1.08	32	29.62	3.05	1

^(a) Activité hémagglutinante totale (titre x volume). Les hématies de rat ont été utilisées pour ce test. ^(b) L'activité spécifique (SHA) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines (mg/mL). ^(c) L'index de purification est défini comme le rapport entre l'activité spécifique de la fraction purifiée sur l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur donne une idée de l'augmentation de la pureté obtenue au cours de la purification des lectines. ^(d) le rendement c'est le (%) de l'activité totale d'origine qui reste présente dans une fraction considérée.

2.2. Purification FPLC (gel filtration-Superose 6)

L'élution de la fraction active dans le volume mort de la colonne Sephadex G200, suggère la présence de macromolécules, dont la taille est probablement supérieure à 600kDa (domaine de fractionnement de la colonne G200 : 5-600kDa). Afin d'optimiser la procédure de purification de ces macromolécules hémagglutinantes, l'extrait brut a été directement soumis à une FPLC, sur une colonne gel filtration (Superose 6, GL 10-30), dont le domaine de fractionnement est nettement plus élevé que celui du Sephadex G200 (5 à 5000kDa). Le profil chromatographique indique l'élution de 7 fractions protéiques (**Figure 15**). L'activité hémagglutinante a été détectée dans la première fraction (P1) qui a été exclue dans le volume mort de la colonne (**Figure 16**) ; elle présente une activité hémagglutinante spécifique de 111.49UH/mg, avec un facteur de purification de 11.48, et un rendement de 1% (**Tableau 5**).

L'élution de la fraction active la aussi dans le volume mort confirme la présence d'un complexe protéique de taille macromoléculaire.

Table 5. Procédure de purification des lectines de la souche GF44c sur colonne Superose6

Fractions	Volumes (mL)	Concentration en Protéines (mg)	activité Totale (UH)	SHA (UH/mg)	Index de purification	Rendement (%)
Extrait brut	50	329.54	3200	9.71	1	100
Superose 6 (Fraction P1)	1	0.287	32	111.49	11.48	1

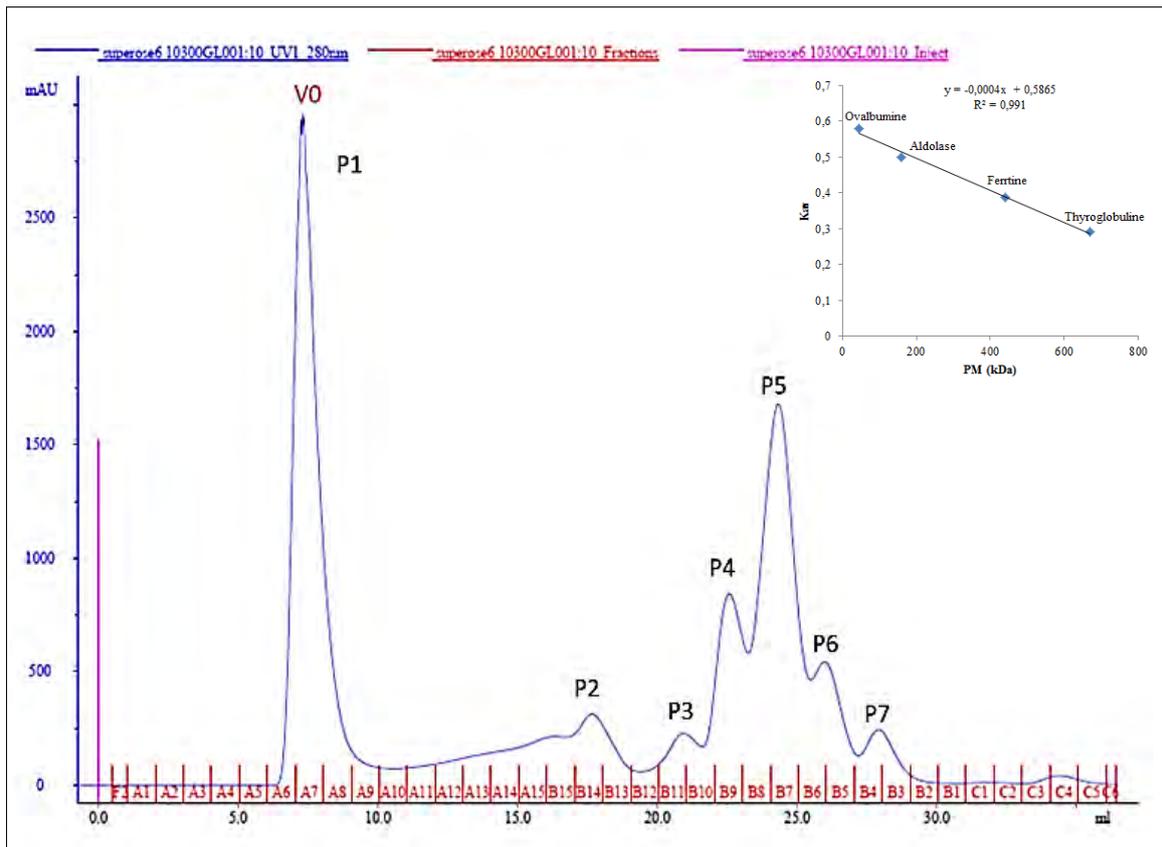


Figure 15. Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel filtration Superose 6 (10/300GL) montrée sur système FPLC-AKTA explorer.

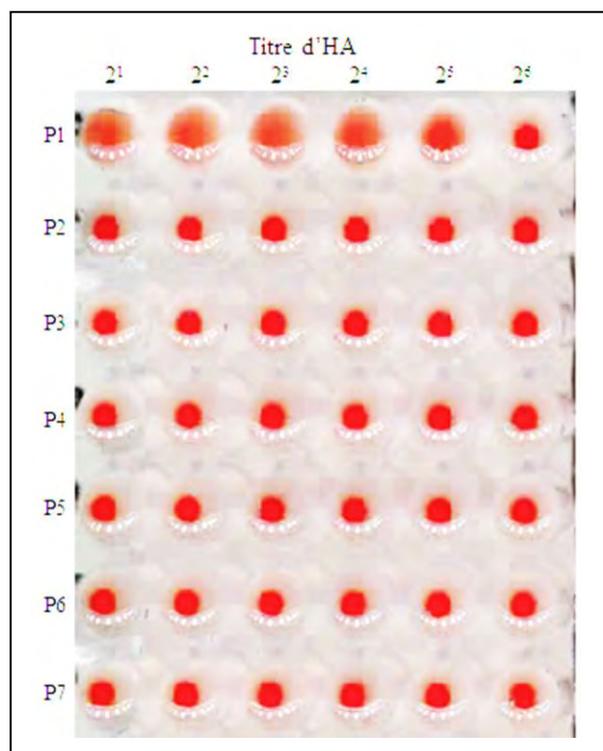


Figure 16. Test d'hémagglutination avec le sang de rat pour les différentes fractions obtenues après purification sur colonne Superose 6.

3. Caractérisation des molécules hémagglutinantes dans la fraction P1

3.1. Inhibition de l'hémagglutination

Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinantes contenues dans la fraction P1, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé. Un échantillon de la fraction P1 a été incubé avec différents monosaccharides, disaccharides et glycoprotéines (29 sucres et 7 glycoprotéines). Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhibée uniquement avec les glycoprotéines, plus particulièrement par les albumines (Ovalbumine avec une concentration minimale inhibitrice de 0.004mg/mL, la BSA 0.031mg/mL, et la caséine 0.125mg/mL) (**Figure 17, Tableau 6**). Aucun des mono ou disaccharides testés (avec une concentration initiale de 100mM) n'est capable d'inhiber l'activité hémagglutinante de la fraction P1.

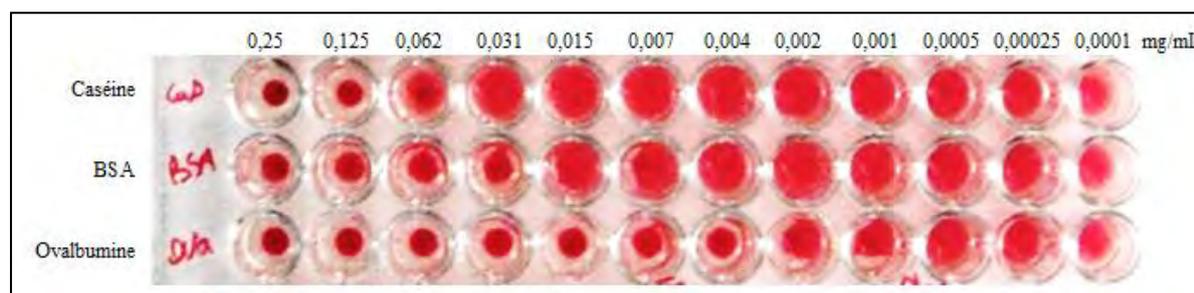


Figure 17. Test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction P1.

3.2. Effet de la Température, du pH et de l'EDTA sur l'hémagglutination

La fraction P1 a été soumise à différentes températures (20-100°C), différents pH (2-11), et à différentes concentrations d'EDTA (5-20mM). On observe que l'activité hémagglutinante de la fraction P1 reste maximale entre 20 et 60°C. au delà de cette température l'activité diminue considérablement, jusqu'à disparaître à une température de 100°C (**Figure 18, A**). Les pH très acides (entre 2 et 4) affectent considérablement l'activité hémagglutinante, cependant au delà d'un pH de 5, l'activité se stabilise, même à des pH très alcalins (pH 11) (**Figure 18, B**). L'incubation des échantillons de la fraction P1 avec de l'EDTA pendant 1h n'affecte pas l'activité hémagglutinante des molécules même à une forte concentration (20mM) (**Figure 19**).

Tableau 6. Effet des différents sucres, glycoprotéines et protéines sur l'activité hémagglutinante de la fraction P1 (test d'inhibition de l'hémagglutination)

Sucres, glycoprotéines et protéines	Concentration minimal inhibitrice (MIC)*
Glucose	NI
Mannose	NI
Fucose	NI
Galactose	NI
Rhamnose	NI
Sorbose	NI
Mannitol	NI
Arabinose	NI
Xylose	NI
Inositol	NI
Sorbitol	NI
Fructose	NI
Xylitol	NI
Glucosamine-HCl	NI
N-acetyl-glucosamine	NI
N-acetyl-galactosamine	NI
Methyl- α -L-fucopyranoside	NI
Methyl- β -L-fucopyranoside	NI
Methyl- α -D-Mannopyranoside	NI
Methyl- α -D-Galactopyranoside	NI
Acide sialique	NI
Lactose	NI
Saccharose	NI
Maltose	NI
Cellobiose	NI
Melibiose	NI
Raffinose	NI
Hepparine	NI
Chitosane	NI
Fetaine	NI
Inuine	NI
Caseine	0.125 mg/mL
Ovalbumine	0.004 mg/mL
Bovin serum albumin	0.031 mg/mL
Mucine (bovine submaxillary glands)	NI
Mucine (porcine stomach)	NI

(*) Concentration minimal requise pour inhiber 8 unités hémagglutinantes.

NI: Absence d'inhibition;

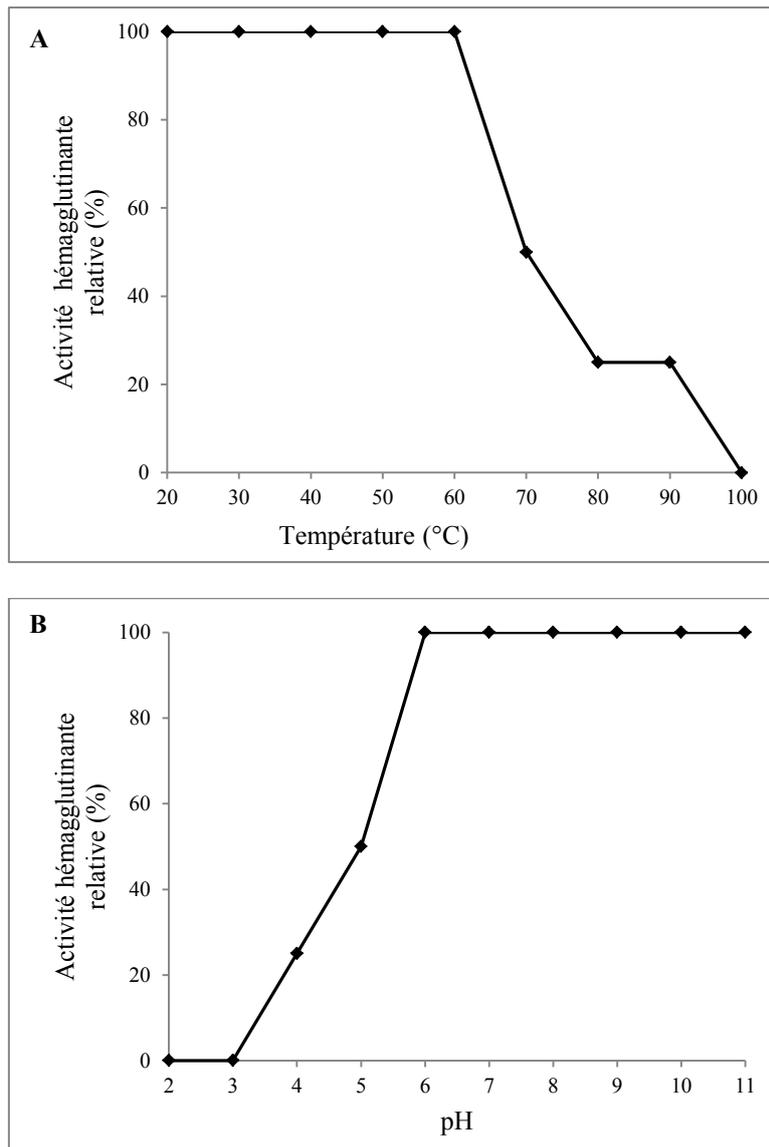


Figure 18. Effet de la température (A), et du pH (B) sur l'activité hémagglutinante de la fraction P1.

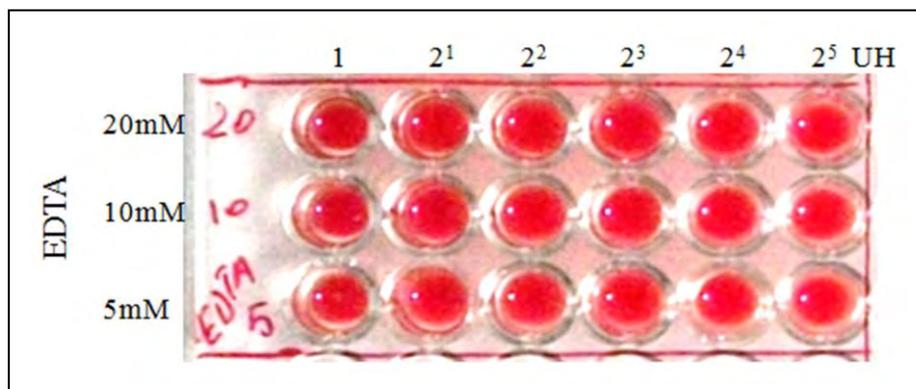


Figure 19. Effet de l'EDTA sur l'hémagglutination de fraction P1.

3.3. SDS-PAGE et spectrométrie de masse (Nano HPLC Q-Exactive plus)

L'analyse SDS-PAGE de la fraction active (P1) révèle la présence d'une bande protéique visible bien distincte (≈ 40 kDa) en plus de plusieurs autres bandes plus ou moins visibles. La plupart de ces bandes présentent un poids moléculaire compris en 25 et 75kDa (**Figure 20**).

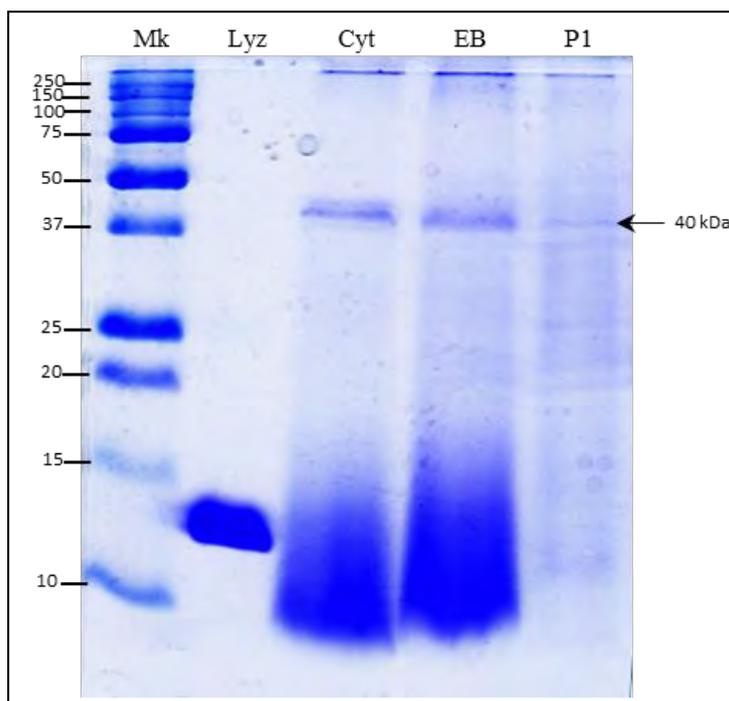


Figure 20. Gel SDS-page (15%) de la fraction P1 après coloration au bleu de Coomassie.

Mk : marqueurs moléculaires, Lyz : lysozyme (control), Cyt : extrait cytoplasmique, EB : extrait brut intracellulaire (après filtration et ultrafiltration >10 kDa), P1 : fraction P1.

La bande protéique la plus visible (la plus majoritaire) (≈ 40 kDa) a été excisée du gel, pour être identifiée par spectrométrie de masse (Nano HPLC Q-Exactive plus). L'analyse a permis d'identifier 13 protéines différentes, cependant une seule présente un score assez élevé, avec un poids moléculaire similaire à celui de la bande protéique. Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des récepteurs protéiques extracellulaires (Extracellular ligand-binding receptor, UniProt N° : D9T5Z9, poids moléculaire = 39.3 kDa) (**Tableau 7**).

Tableau 7. Identification des protéines par spectrométrie de masse (bande protéique majoritaire sur gel d'électrophorese≈40kDa).

N°Accession UniProt	gènes	Protéines identifiées	Score (Mascot) ^a	Couverture (%) ^b	PM (kDa) ^c	pI ^d
D9T5Z9	Micau_4391	Extracellular ligand-binding receptor	447,80	48,96	39,3	5,27
D9SZF4	Micau_5723	Phosphate-binding protein PstS	284,95	45,23	37,6	5,59
D9TEW6	Micau_5433	Uncharacterized protein	238,53	67,57	38,4	5,44
D9T6M2	Micau_0401	NADH-quinone oxidoreductase, chain G	238,33	57,07	86,7	5,38
D9TBU4	atpA	ATP synthase subunit alpha	201,23	56,91	59,8	5,11
D9T3R6	Micau_4232	Band 7 protein	176,02	63,86	39,9	6,04
D9TE31	Micau_5408	Extracellular solute-binding protein family 5	170,47	43,14	58,9	5,16
D9T8P6	Micau_0606	Extracellular solute-binding protein family 5	152,10	39,10	56,0	6,04
D9TBK2	Micau_5041	Extracellular solute-binding protein family 1	139,04	60,76	48,0	5,12
D9SZI1	groL	60 kDa chaperonin	129,82	55,74	56,9	4,96
D9TDV7	Micau_5334	Succinate dehydrogenase	115,42	51,65	70,2	6,20
D9TBU2	atpD	ATP synthase subunit beta	107,60	51,35	52,1	4,93
D9T6P7	Micau_0426	M6 family metalloprotease domain protein	97,38	39,38	88,4	5,17

- A. Le Score représente les résultats de l'analyse contre la base de données SwissProt (Plus le score est élevé, plus l'identification est fiable).
- B. Taux de couverture de la séquence protéique par les peptides identifiés.
- C. Poids moléculaire calculé des protéines identifiées (en Daltons).
- D. Point isoélectrique théorique des protéines identifiées (en fonction de leur composition en acides aminés).

4. Mise en évidence des vésicules membranaires (MET et DLS)

Le profile chromatographique de l'extrait intracellulaire de la souche GF44c sur colonne Superose 6 révèle 7 fractions protéiques. L'élution de la fraction active (P1) dans le volume mort de la colonne, suggère la présence d'un complexe protéique de taille macromoléculaire. Les résultats de l'SDS-PAGE qui révèlent la présence de plusieurs bandes protéiques confirme la suggestion de la présence d'une structure macromoléculaire, constituée probablement de plusieurs protéines.

Afin de mieux caractériser ces macromolécules se trouvant dans cette fraction P1, une microscopie électronique à transmission a été réalisée. L'examen des micrographes obtenus révèle la présence de plusieurs structures membranaires fermées de formes sphériques et régulières (**Figure 21, A, B, C**). On observe également que ces structures sont entourées par des molécules de petite taille, probablement des protéines attachées à leurs surfaces (points blanc indiqués par des flèches sur la **figure 21 (C)**). Il faut noter qu'aucun agrégat protéique ou débris cellulaire d'une taille supérieur à 200nm n'a été observé.

L'analyse par diffusion dynamique de la lumière, grâce à l'instrument Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments), révèle que cette fraction contient une population majeure de particules par volume d'échantillon, ces structures présentes des tailles allant de 30 à 100nm (**Figure 22**) (moyenne du diamètre hydrodynamique= 73.99 ± 29.93 nm, le poids moléculaire est estimé à 1.57×10^4 kDa, polydispersité=40.5%). D'après le graph de distribution de la taille des particules en fonction du nombre, on peut voir que ces structures sont très homogènes (plus 75% de cette population possède une taille comprise entre 40 et 60nm).

Ces structures de taille nanométriques ont été observées chez d'autres bactéries à Gram négatif et positif (diamètre de 20 à 200nm), et sont appelées vésicules membranaires (Lee *et al.*, 2009; Kulp and Kuehn, 2010; Brown *et al.*, 2014; Olaya-Abril *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015).

L'analyse microscopique et la diffusion dynamique de la lumière mettent en évidence la présence de vésicules membranaires sphériques dans la fraction active P1, probablement responsables de l'hémagglutination des érythrocytes de rat, grâce à des protéines associées à leurs surfaces.

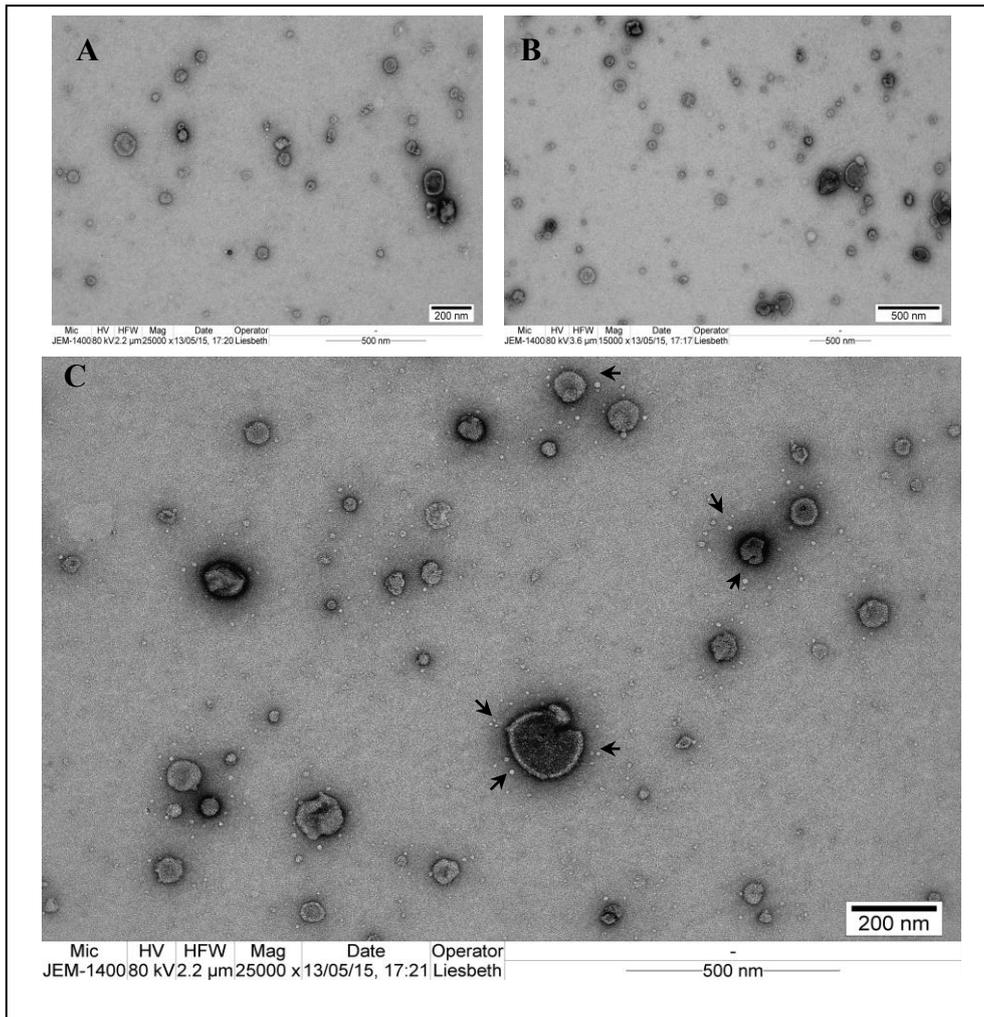


Figure 21. Micrographes des vésicules membranaires contenues dans la fraction P1.
 (A) bar=200nm, (B) bar=500nm, (C) bar=200nm

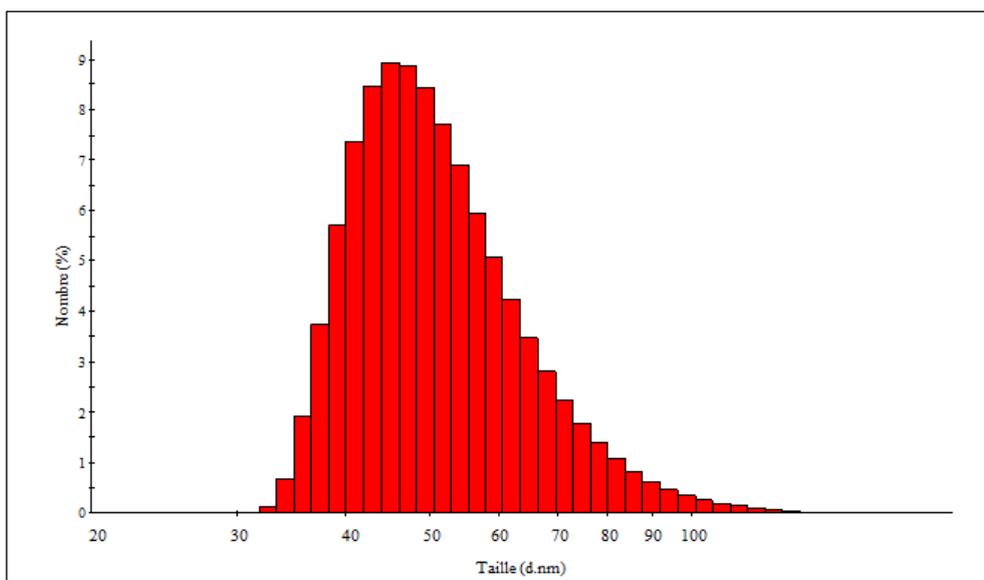


Figure 22. Distribution de la taille (diametre.nm) des vésicules contenues dans la fraction P1 en fonction du nombre (analyse DLS).

5. Etude protéomique des vésicules membranaires

La mise en évidence de la présence de vésicules membranaires par microscopie électronique, et la révélation par l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE de la présence de plusieurs bandes protéiques de différentes tailles, indique que ces vésicules sont très riches en protéines. L'identification de ces protéines est une étape nécessaire afin de mieux comprendre le rôle de ces vésicules. Pour cela, nous avons directement soumis notre extrait vésiculaire (fraction P1) à une analyse protéomique totale. Après extraction des protéines des vésicules membranaires, et digestion trypsinique de ces dernières. La mixture peptidique est analysée par spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS). Les données obtenues sont traitées sur un serveur PLGS, afin d'identifier ces protéines. Les résultats du traitement bioinformatique ont permis d'identifier 81 protéines vésiculaires différentes (**Tableau 8**).

La plupart des protéines identifiées sont des protéines non caractérisées (18 protéines). Les ABC transporteurs et les protéines appartenant à la famille des récepteurs extracellulaires (Extracellular ligand-binding protein, SBP) sont parmi les protéines vésiculaires les plus abondantes avec 10 et 7 protéines respectivement. Plusieurs sous unités d'ATP synthase (7) et de NADH quinone oxidoréductase (6) ont été identifiées. Ces vésicules semblent être enrichies également en enzymes diverses (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, Succinate dehydrogenase, Glutamine synthetase, Peptidase et metalloprotease), et en lipoprotéines. La **figure 23**, montre la distribution des protéines vésiculaires de la souche *M.aurantiaca* GF44c, en fonction de leur poids moléculaire et leur point isoélectrique (pI), en comparaison avec le protéome de la souche référence *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029. On remarque que la majorité des protéines vésiculaires possèdent un pI acide, et une masse moléculaire inférieure à 50kDa.

5.1. Localisation des protéines vésiculaires

L'outil PSORTb v3.0 a été utilisé pour prédire la localisation subcellulaire des protéines (**Figure 24, A**). Sur les 81 protéines vésiculaires identifiées 48% (39) ont pour origine la membrane cytoplasmique (la majorité sont des protéines non caractérisées). Les protéines cytoplasmiques représentent 23% (9) des protéines identifiées, suivie par les protéines de la paroi cellulaire 4% (3) représentées par les SBP extracellulaires de la famille 5, et les protéines à localisation extracellulaire 3% (2) représentées par des protéases. 22% (8) des protéines identifiées sont de localisation inconnue.

Tableau 8. Identification des protéines vésiculaires (LC-MS/MS).

N°Accession UniProt	Gènes	Protéines identifiées	Score ^a (PLGS)	Couverture (%) ^b	PM ^c (kDa)	pI ^d	COG fonction ^e	COG Accession	Signal peptide ^f	Pred-Lipo ^g
Localisation : Membrane cytoplasmique										
D9TE00	<i>Micau_5377</i>	Multidrug-ABC transporter related	3872,667	49,67	32,495	5,66	[V]	COG1131		
D9TCT9	<i>Micau_5220</i>	Multidrug-ABC transporter related	2737,802	41,21	32,938	9,01	[V]	COG1131		
D9T399	<i>Micau_2082</i>	Teichoic acid-ABC transporter related	2562,54	67,67	28,650	9,15	[G], [M]	COG1134		
D9SYR4	<i>Micau_1541</i>	Aminoacid-ABC transporter related	2236,434	44,76	26,743	6,23	[E], [F]	COG1126, COG0194		
D9SZN3	<i>Micau_5803</i>	Sugar-ABC transporter related	1956,224	53,99	39,747	6,27	[G]	COG3839		
D9TEW7	<i>Micau_5434</i>	Aminoacid-ABC transporter related	834,4926	48,52	28,326	5,37	[E]	COG0411		
D9T6F3	<i>Micau_0332</i>	Multidrug-ABC transporter related	706,957	30,13	33,912	5,81	[V]	COG1131		
D9T3U7	<i>Micau_6202</i>	Sodium-ABC transporter related	649,8082	27,95	27,076	6,08	[C], [P]	COG4555		
D9T5Z6	<i>Micau_4388</i>	Aminoacid-ABC transporter related	572,8488	19,93	31,380	6,21	[E]	COG0411		
D9T1C7	<i>Micau_3930</i>	Cobalt-ABC transporter related	541,3081	19,71	57,221	5,9	[P], [R]	COG1122		
D9TBU2	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	12887,08	79,42	52,238	4,83	[C]	COG0055		
D9TBU6	<i>atpF</i>	ATP synthase subunit beta	4597,075	41,34	19,658	5,12	[C]	COG0711	TM	
E1UYD0	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta (Fragment)	7319,053	72,19	33,005	-	[C]	COG0055		
D9TC10	<i>Micau_0995</i>	Cation diffusion facilitator family transporter	1473,32	22,06	36,151	5,5	[P]	COG0053	Sec	
D9TC38	<i>Micau_1023</i>	Cell division ATP-binding protein FtsE	3629,055	54,87	25,370	10,04	[D], [U]	COG2884, COG0630		
D9T792	<i>Micau_4572</i>	Cytochrome c oxidase subunit 2	3634,832	35,6	35,736	8,55	[C]	COG1622	TM	
D9T184	<i>Micau_3887</i>	Daunorubicin resistance ABC transporter ATPase subunit	3132,836	72,87	34,529	5,04	[V]	COG1131		
D9TAU1	<i>Micau_0832</i>	Daunorubicin resistance ABC transporter ATPase subunit	1408,241	43,26	35,228	5,53	[V]	COG1131		
D9SXJ6	<i>Micau_1378</i>	Nitrogen regulatory protein P-II	6702,51	71,43	12,151	5,68	[T], [E]	COG0347		
D9SZF7	<i>pstB</i>	Phosphate import ATP-binding protein PstB	2515,77	31,01	28,840	7,68	[P]	COG1117		
D9T5N3	<i>Micau_2291</i>	Preprotein translocase_YajC subunit	2447,788	50,41	13,271	5,45	[U]	COG1862	TM	
D9T628	<i>lgt</i>	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	746,4377	29,58	45,218	4,89	[M]	COG0682	Sec	

D9SXL1	<i>Micau_1393</i>	Signal peptidase I	4162,99	64,29	23,637	4,87	[U]	COG0681	TM	
D9SXJ3	<i>ftsY</i>	Signal recognition particle receptor FtsY	752,742	19,44	41,919	4,93	[U]	COG0552	TM	
D9TDV7	<i>Micau_5334</i>	Succinate dehydrogenase	14275,96	57,77	70,374	5,83	[C]	COG1053		
D9T3A0	<i>Micau_2083</i>	Transport permease protein	2503,251	17	33,476	10,09	[G], [M]	COG1682	TM	
D9TEE9	<i>Micau_1316</i>	Uncharacterized protein	22963,26	44,51	17,613	10,14	-	-	Sec	
D9T8Y2	<i>Micau_0694</i>	Uncharacterized protein	6711,551	42,31	5,616	8,19	-	-	Sec	
D9TC78	<i>Micau_1064</i>	Uncharacterized protein	3736,053	38,57	22,782	6,32	-	-	Sec	
D9T5Q7	<i>Micau_2315</i>	Uncharacterized protein	2177,215	49,67	16,306	10,8	-	-	Sec	
D9T7H5	<i>Micau_0440</i>	Uncharacterized protein	1870,273	61,98	21,990	9,51	[S]	COG4894		
D9T4R3	<i>Micau_2229</i>	Uncharacterized protein	1228,177	55,69	17,282	4,34	-	-		
D9TEM3	<i>Micau_3378</i>	Uncharacterized protein	1037,965	32,13	37,699	7,71	-	-		
D9SY07	<i>Micau_3524</i>	Uncharacterized protein	982,7167	14,91	11,913	8,19	-	-	Sec	
D9TC42	<i>Micau_1027</i>	Uncharacterized protein	730,8719	32,17	32,246	4,89	-	-	Sec	+
D9T6R6	<i>Micau_2412</i>	Uncharacterized protein	672,9376	25,09	27,765	11,23	-	-	Sec	
D9TCT5	<i>Micau_5216</i>	Uncharacterized protein	630,6512	29,35	28,911	8,02	[S]	COG3595		
D9T3R7	<i>Micau_4233</i>	Uncharacterized protein	618,0241	14,65	16,550	4,86	[O]	COG1585, COG1030	Sec	
D9T7D9	<i>Micau_4619</i>	Uncharacterized protein	550,3555	8,73	25,190	11,64	-	-	TM	
Cytoplasme										
D9SZI1	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	1183,385	38,89	56,939	4,86	[O]	COG0459		
D9TEW2	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	867,5671	47,9	57,365	5,02	[O]	COG0459		
D9TBU0	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	1748,762	81,52	9,519	4,66	[C]	COG0355		
D9TBU3	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	3421,883	64,08	33,497	8,7	[C]	COG0224		
D9TBU4	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	8157,14	58,73	59,912	5	[C]	COG0056		
D9TBU5	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit delta	4453,672	54,58	29,038	5,38	[C]	COG0712		
D9T3R6	<i>Micau_4232</i>	Band 7 protein	12932,56	47,55	39,891	5,78	[O]	COG0330	Sec	
D9TDB6	<i>Micau_1192</i>	DSBA oxidoreductase	10340,05	41,6	25,597	6,84	[O]	COG2761, COG1651	TM	
D9TF62	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	1850,467	60,71	44,154	5,31	[U], [J]	COG2229, COG0050		

D9T495	<i>Micau_0094</i>	Forkhead-associated protein	1359,358	45,06	26,797	5,38	[T]	COG1716		
D9T7E1	<i>Micau_4621</i>	Glutamine synthetase	765,0633	30,59	53,373	5,23	[E]	COG0174		
D9T6M2	<i>Micau_0401</i>	NADH-quinone oxidoreductase	3973,355	48,71	87,753	5,23	[C]	COG1034		
D9T6L8	<i>nuoC</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	1015,659	27,57	27,051	4,97	[C]	COG0852	Sec	
D9T6L9	<i>nuoD</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	5222,472	70,07	49,205	5,33	[C]	COG0649, COG3261		
D9T6M0	<i>Micau_0399</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit E	914,6355	45,05	38,008	4,87	[C]	COG1905		
D9T6M1	<i>Micau_0400</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	2164,085	49,09	48,131	6,36	[C]	COG1894		
D9T788	<i>Micau_4568</i>	Response regulator receiver	2194,891	33,33	14,488	4,48	[K], [T]	COG3279		
D9TDV8	<i>Micau_5335</i>	Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur protein	7157,916	37,77	41,335	6,1	[C]	COG0633, COG0479		
D9T9Z1	<i>Micau_0794</i>	Uncharacterized protein	1907,381	44,94	34,979	4,13	-	-		
Paroi bactérienne										
D9T8P6	<i>Micau_0606</i>	Extracellular solute-binding protein family 5	16926,61	68,23	56,048	5,33	[E]	COG0747	Sec	+
D9TE31	<i>Micau_5408</i>	Extracellular solute-binding protein family 5	8169,807	44,97	59,071	4,85	[E]	COG4166	Sec	+
D9TCD2	<i>Micau_3101</i>	Extracellular solute-binding protein family 5	695,6727	40,5	60,904	6,39	[E]	COG0747	Tat	+
Extracellulaire										
D9T423	<i>Micau_6278</i>	Peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin	2228,877	50,59	69,831	7,22	[O]	COG1404	Sec	
D9T6P7	<i>Micau_0426</i>	M6 family metalloprotease domain protein	896,2578	26,58	88,606	4,93	[O]	COG4412	Sec	
Inconnue										
D9T9X2	<i>Micau_0774</i>	Basic membrane lipoprotein	1653,868	54,14	37,477	4,99	[M]	COG1744	Sec	+
D9T8U4	<i>Micau_0656</i>	DivIVA domain	2304,405	32,86	21,990	4,38	-	-	Sec	
D9T5Z9	<i>Micau_4391</i>	Extracellular ligand-binding receptor	8465,542	76,94	39,639	4,9	[E]	COG0683	Sec	+
D9TBK2	<i>Micau_5041</i>	Extracellular solute-binding protein family 1	6031,032	71,08	48,284	4,86	[G]	COG1653	Sec	+
D9SYR3	<i>Micau_1540</i>	Extracellular solute-binding protein family 3	9671,172	63,99	33,293	5,22	[E], [T]	COG0834	Sec	+
D9T5Z4	<i>Micau_4386</i>	Extracellular solute-binding protein family 3	606,5266	30,23	31,412	4,6	[E], [T]	COG0834	Tat	+
D9T4B3	<i>Micau_0112</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family 2	662,024	26,88	72,567	5,72	[M]	COG3023	Sec	
D9T6M4	<i>nuoI</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	1294,148	41,4	24,000	5,89	[C]	COG1143		
D9SZF4	<i>Micau_5723</i>	Phosphate-binding protein PstS	883,2556	20,71	37,963	5,28	[P]	COG0226	Sec	+
D9TE36	<i>Micau_5413</i>	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	2821,427	31,33	43,401	7,13	[I]	COG0688		

D9T4Y0	<i>Micau_4277</i>	Putative lipoprotein	2010,479	45,17	34,079	6,32	[O]	COG3591	Sec	
D9T0J7	<i>Micau_5863</i>	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system	1629,533	42,81	34,201	4,9	[E], [M]	COG0747, COG1732, COG1732	Sec	+
D9T0P7	<i>Micau_5914</i>	TAP domain protein	5542,046	41,05	63,510	8,74	[H], [R]	COG0596	Sec	
D9SXR3	<i>Micau_1446</i>	Uncharacterized protein	2536,116	46,17	41,537	10,89	[G]	COG2133	Sec	
D9SXU9	<i>Micau_3466</i>	Uncharacterized protein	1619,994	60,24	9,531	8,17	-	-		
D9T3W8	<i>Micau_6223</i>	Uncharacterized protein	1006,516	31,8	25,118	5,62	[S]	COG2013		
D9T557	<i>Micau_4354</i>	Uncharacterized protein	659,5745	42,05	33,089	6,31	-	-		
D9SZW8	<i>Micau_1695</i>	UspA domain-containing protein	1524,528	38,54	30,027	4,97	[T]	COG0589		

- Le Score représente les résultats de l'analyse PLGS contre la base de données SwissProt (Plus le score est élevé, plus l'identification est fiable).
- Taux de couverture de la séquence protéique par les peptides identifiés.
- Poids moléculaire calculé des protéines identifiées (kDa).
- Point isoélectrique théorique des protéines identifiées (en fonction de leur composition en acides aminés).
- Fonctions des différentes protéines identifiées (établies à partir des clusters des groupes de protéines orthologues, COGs), **COG fonctions** : **[E]** Transport et métabolisme des acides aminés, **[T]** Mécanismes de transduction du signal, **[G]** Transport et métabolisme des carbohydrates, **[M]** Biogenèse de la paroi cellulaire/membrane/enveloppe, **[D]** Control du cycle cellulaire, Division cellulaire, Réplication chromosomique, **[H]** Transport et métabolisme des Coenzymes, **[R]** Prédiction de la fonction générale seulement, **[V]** Mécanismes de défense, **[C]** Production et conversion d'énergie, **[P]** Transport et métabolisme des ions inorganiques, **[S]** Fonction inconnue, **[U]** Trafic intracellulaire, Sécrétion et transport vésiculaire, **[I]** Transport et métabolisme des lipides, **[F]** Transport et métabolisme des nucléotides, **[O]** Modification Post-traductionnelle, Turnover des protéines, Chaperons, **[K]** Transcription, **[J]** Traduction, Biogenèse et structure ribosomique.
- Prédiction *in silico* du signal peptide : signal Sec, signal Tat, SM : Segment transmembranaire (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/submit>).
- Prédiction *in silico* des lipoprotéines (<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-LIPO/>).

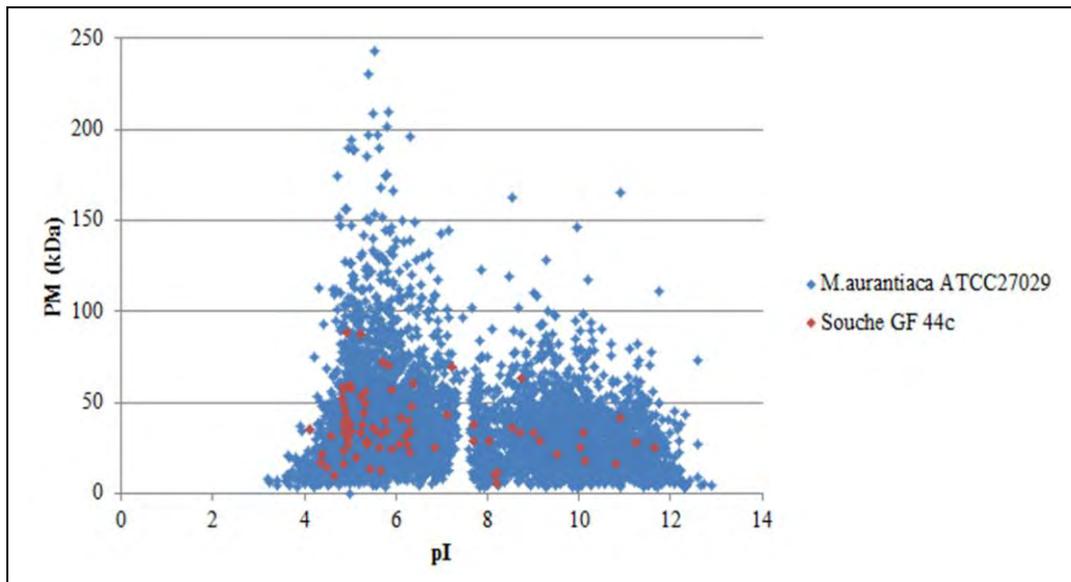


Figure 23. Distribution des protéines (vésicules/ protéome total) en fonction de leur poids moléculaire et leur point isoélectrique (pI).

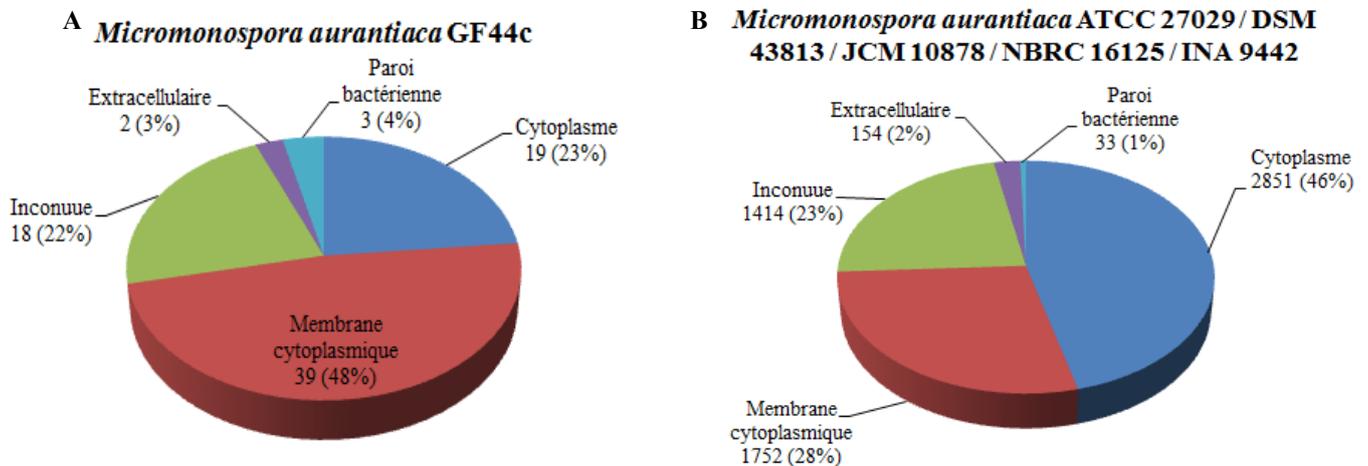


Figure 24. Localisations subcellulaires des différentes protéines vésiculaires identifiées par LC-MS/MS.

(A) Localisation subcellulaire des protéines vésiculaires produites par la souche *M.aurantiaca* GF44c. (B) Localisation subcellulaire de l'ensemble du protéome de la souche *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029, utilisée comme référence pour les analyses spectrométriques.

En comparaison avec la localisation des 6204 protéines constituant le protéome commun des souches *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442, qui a servi comme référence pour l'identification des protéines vésiculaires de notre extrait, on observe que la majorité des protéines sont de localisation cytoplasmique (46%), suivie des protéines membranaires (28%), les protéines extracellulaires représentent (2%), et ceux de la paroi cellulaire représentent 1%. Les protéines à localisation inconnue représentent (23%) (**Figure 24, B**). Ceci montre que les vésicules sont significativement enrichies en protéines membranaires en comparaison avec le protéome de la souche.

5.2. Classification fonctionnelle des protéines vésiculaires

Les protéines vésiculaires identifiées ont été classées en 14 groupes orthologues, selon leurs fonctions putatives, comme représenté sur la **figure 25(A)**.

Les 81 protéines vésiculaires présentent, 78 des 5840 définitions COG identifiées dans la base de données protéomique de la souche *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442 (**Figure 25, B**). Les plus importants groupes COG reconnus dans le protéome vésiculaire, sont impliqués dans les processus de production et de conversion de l'énergie (18 sur 254 COG définitions), modification post traductionnelle, turnover des protéines et les chaprones (10 sur 212), transport et métabolisme des acides aminées (9 sur 453), biogenèse de la paroi cellulaire/membrane/enveloppe (5 sur 257), trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire (5 sur 45), et les mécanismes de défense (5 sur 126).

Les rapports d'abondances relatives de ces groupes COG sont nettement plus élevés dans le protéome des vésicules membranaires, que dans l'ensemble du protéome de la souche qui a servi de référence *M.aurantiaca* ATCC 27029, en particulier pour les groupes : Production et conversion de l'énergie (24% contre 4%), modification post traductionnelle, turnover des protéines et chaprones (13% contre 4%), trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire (6% contre 1%). Ces résultats indiquent que le protéome vésiculaire de la souche *M.aurantiaca* GF44c peut présenter des fonctions spécifiques.

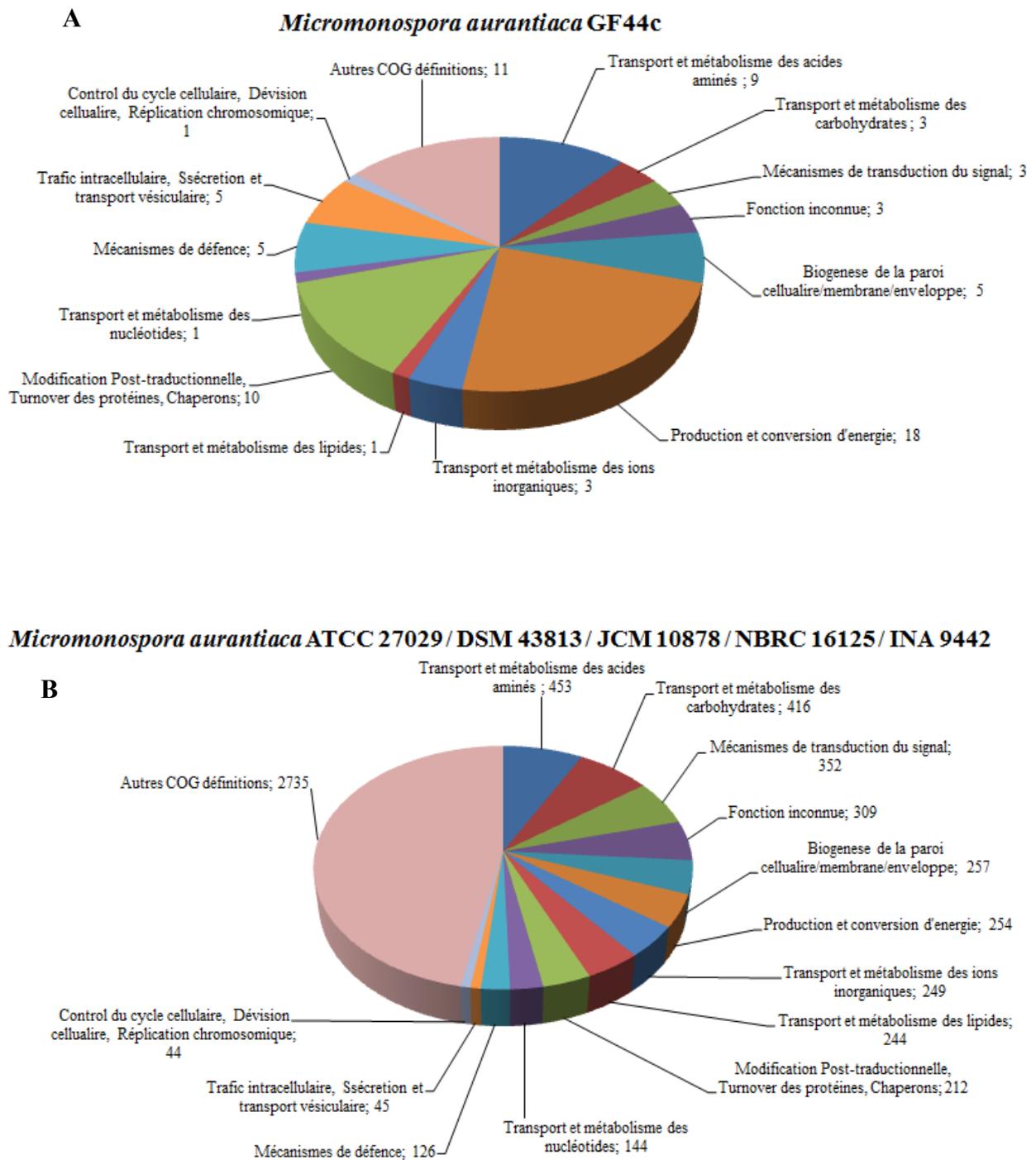


Figure 25. Classification fonctionnelle des protéines vésiculaires de la souche *M.aurantiaca* GF44c (A), et le protéome de *M.aurantiaca* ATCC 27029 (B).

Les séquences protéiques des 81 protéines identifiées par LC-MS/MS, ont été soumises pour une analyse *in silico*, en utilisant l'outil PRED-LIPO. Cet outil bioinformatique emploie un algorithme développé afin de prédire les lipoprotéines (**Tableau 8**). En utilisant cette approche, il a été démontré que 11 (13.6%) des protéines vésiculaires sont des lipoprotéines.

La prédiction d'un peptide signal chez les protéines identifiées a été possible grâce à l'application PRED-TAT. Les résultats montrent que plus de moitié (54%) des protéines ne présentent pas de signal peptide dans leurs séquences. 33% des protéines possèdent un peptide signal de type Sec, 3% présentent un signal peptide de type Tat, et 10% représentent des segments transmembranaires (**Tableau 8**).

6. Activités biologiques

6.1. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait vésiculaire de la souche GF44c a été testé à différentes concentrations (0.5, 0.25, et 0.125mg/mL) contre neuf souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus faecalis*, et *Salmonella enteritidis*), et deux souches de champignons filamenteux (*Aspergillus niger* CIP 1431, et *Fusarium oxysporum* CIP 625.72), en utilisant la technique de diffusion des disques sur gélose. Les résultats de ce test n'ont montré aucune activité visible contre les souches bactériennes ou fongiques testées (**Figure 26**).

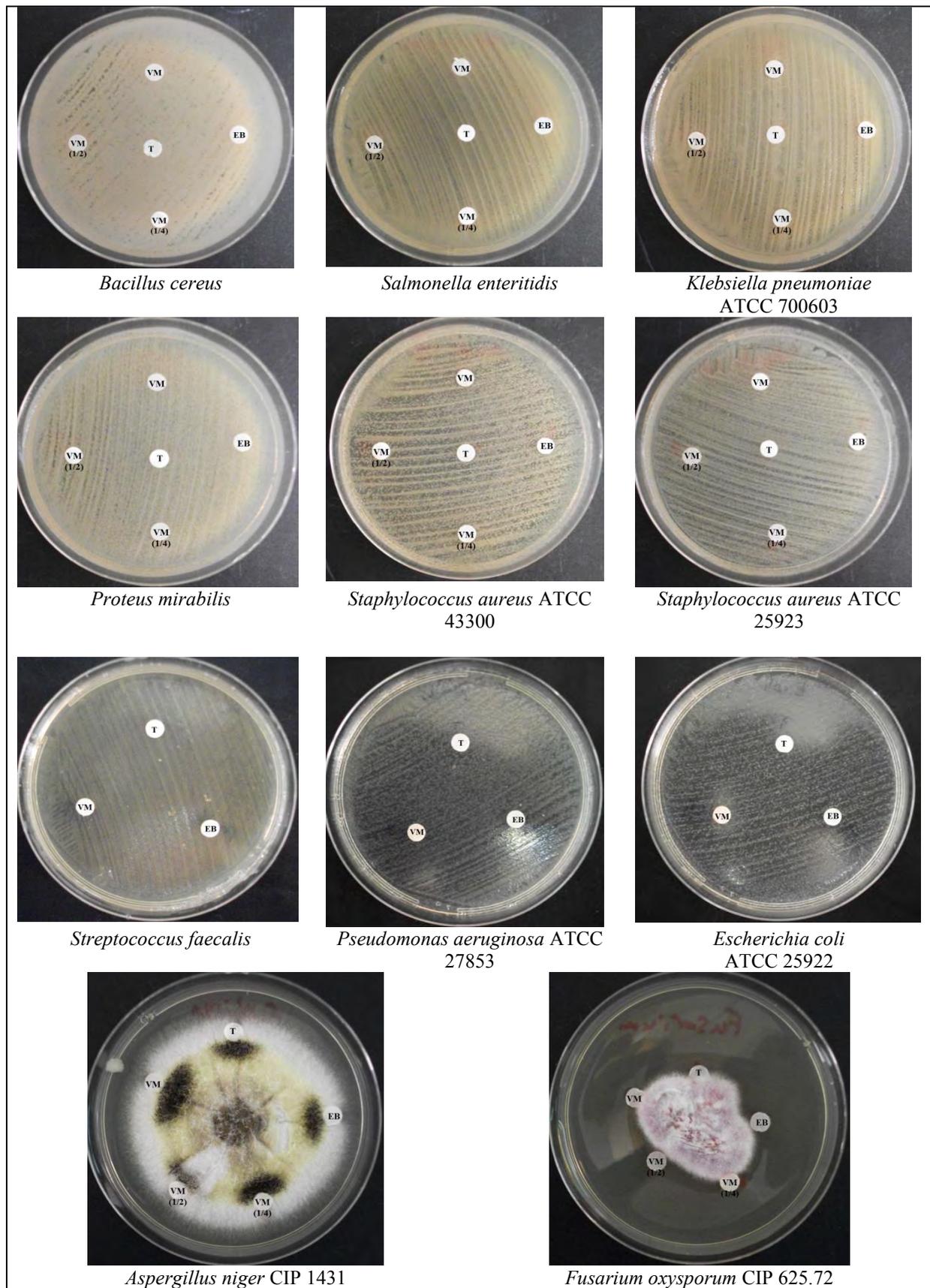


Figure 26. Test d'activité antimicrobienne de l'extrait vésiculaire de la souche GF44c (T : témoin, EB : extrait brut, VM : extrait vésiculaire 0.5mg/mL, VM1/2 : 0.25mg/mL, VM1/4 : 0.125mg/mL)

6.2. Activité immunomodulatrice

L'effet immunomodulateur des vésicules membranaires isolées à partir de la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c a été évalué *in vivo* sur des souris, par le test de clairance du carbone (carbon clearance test). Cette méthode permet d'évaluer l'action des phagocytes contre des particules de carbone (encre de Chine) injectée par voie intraveineuse à des souris. Cette activité exprimée par l'index phagocytaire (K) est déterminée par la mesure des particules de carbone en circulation dans le sang, dans un intervalle de temps précis.

Les résultats montrent que l'administration de cet extrait à des concentrations de 30, 50 et 100mg/Kg respectivement, augmentent de manière significative l'indice phagocytaire chez les groupes de souris traitées en comparaison avec le groupe témoin qui a reçu uniquement de l'eau physiologique ($p < 0.0001$) (**Figure 27, Annexe 7**). En effet, plus la dose de l'extrait administré est élevée plus la réponse phagocytaire augmente. Cette augmentation de l'indice phagocytaire est associée à une diminution du temps de demi-vie des particules de carbone dans le sang (**Figure 28**).

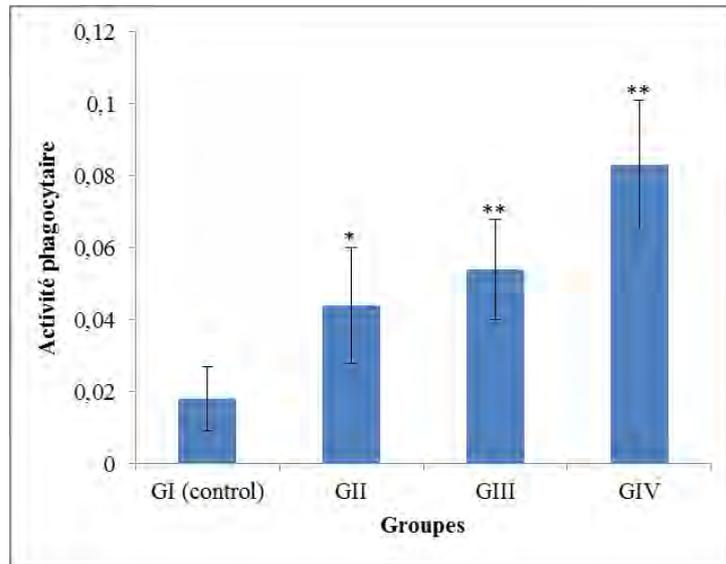
L'activité phagocytaire corrigée exprimée par unité de poids des organes actifs (foie et rate), confirme également la stimulation de l'ensemble du système réticulo-endothélial par les vésicules membranaires. La **figure 29** montre que l'indice phagocytaire corrigé est significativement plus élevé chez les groupes traités en comparaison avec le groupe témoin ($p < 0.005$), et la aussi on observe que l'indice corrigé dépend de dose administrée (plus la dose augmente plus l'indice corrigé augmente). Ces résultats montrent la relation entre certains organes tels que le foie et la rate avec l'activité phagocytaire.

L'augmentation de l'indice phagocytaire, de l'indice phagocytaire corrigé, et la diminution du temps de demi-vie des particules de carbone en circulation dans le sang indiquent que les vésicules membranaires de la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c possèdent un ou plusieurs facteurs capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris.

6.3. Activité enzymatique

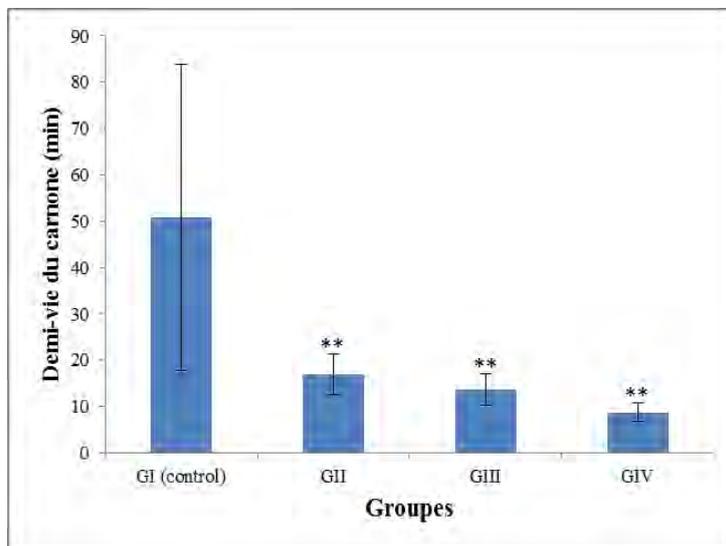
L'activité enzymatique de l'extrait vésiculaire de la souche *M.aurantiaca* GF 44c a été testée contre différents substrats (caséine, gélatine, pectine, cellulose, et chitine). Les résultats montrent l'apparition d'halos autour des puits sur milieu ISP₉ additionné de 0.5% de caséine, qui indiquent une activité protéolytique contre ce substrat, aussi bien par l'extrait brut que par

les vésicules membranaires (0.3mg/mL) (**Figure 30**). Aucune activité n'a été observée sur les autres substrats.



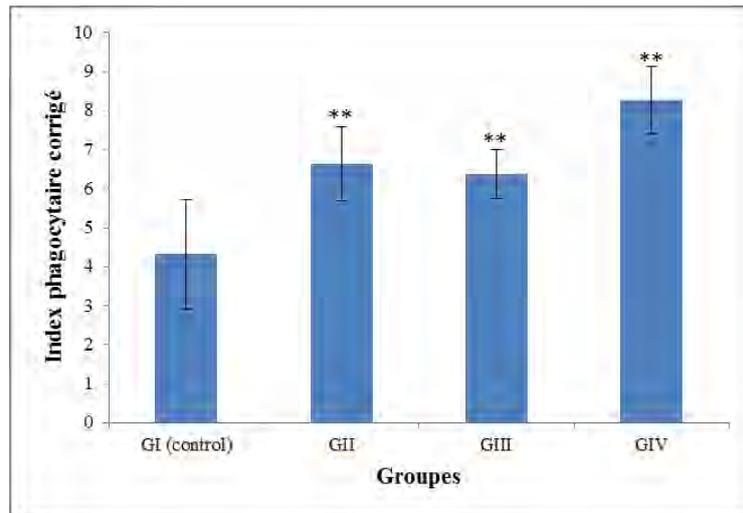
(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type, n=7, *P<0.05, **P<0.01 en comparaison avec le groupe control)

Figure 27. Effet des vésicules membranaires de la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c sur l'activité phagocytaire.



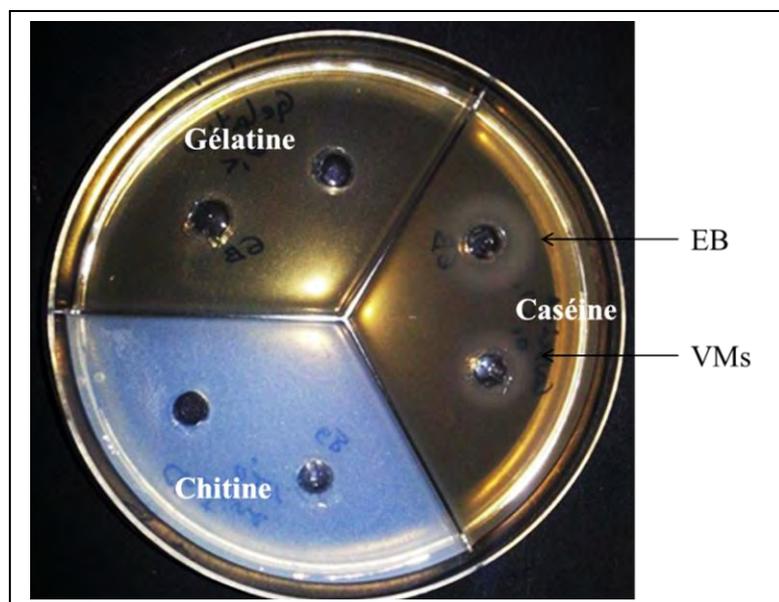
(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type, n=7, *P<0.05, **P<0.01 en comparaison avec le groupe control)

Figure 28. Effet des vésicules membranaires sur la demi-vie des particules de carbone dans le sang des souris



(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±écart type, n=7, *P<0.05, **P<0.01 en comparaison avec le groupe control)

Figure 29 . Effet des vésicules membranaires sur l’index phagocytaire corrigé.



EB: Extrait brut intracellulaire. VMs: Vésicules membranaires.

Figure 30. Activité caséinolytique des vésicules membranaires de la souche GF44c.

DISCUSSION GENERALE

1. Isolement, purification et caractérisation des lectines de la souche GF44c

Les lectines sont un groupe hétérogène de protéines capables de se lier avec les carbohydrates de manière sélective et réversible, sans induire des changements dans la structure chimique de ces derniers. Ces protéines se trouvent dans tous les systèmes vivants, des virus jusqu'aux humains, et jouent un rôle fondamental dans les processus de reconnaissance cellulaire (Lutsik *et al.*, 1981; Gilboa-Garber *et al.*, 1997; Sharon and Lis, 2003; Antonyuk, 2005). Les lectines présentent un intérêt constant ces dernières années ; notamment pour leur rôle dans la régulation d'une variété de processus biologiques, et leur potentiel utilisation en tant qu'agents pharmacologiques (Sharon and Lis, 2003; Sharon, 2007; Jiang *et al.*, 2010; Hamid *et al.*, 2013). Les mécanismes moléculaires qui déterminent l'activité physiologique des lectines restent cependant encore mal connus.

Des données considérables sur la production de lectines par les bactéries pathogènes, et de leur rôle dans l'initiation et le développement du processus pathologique ont été recueillies ces dernières années (Sharon, 2007). Cependant très peu de chercheurs se sont intéressés aux lectines produites par les bactéries non pathogènes. Les caractéristiques et le rôle biologique de ces protéines chez ce groupe de bactéries restent pratiquement inconnues et non caractérisées (Podgorskii *et al.*, 1992). Hormis la pathogénèse, les lectines bactériennes peuvent être impliquées dans une multitude d'autres processus physiologiques comme l'adhésion, la communication, la formation de biofilm et d'agrégats, la croissance et la division cellulaire, l'adaptation, la protection contre les facteurs de stress, l'acquisition de nutriments, la neutralisation des toxines, la défense contre d'autres bactéries, et d'autres fonctions de la microflore normale (Lutsik *et al.*, 1981; Rüdiger and Gabius, 2001; Antonyuk, 2005; Van Damme *et al.*, 2008; Lakhtin *et al.*, 2011). Par conséquent, l'étude des lectines produites par les bactéries non pathogènes sont d'un intérêt considérable, compte tenu des avantages biotechnologiques de la production de ces protéines en tant que molécules bioactives de nouvelle génération.

Il a été rapporté que la production de lectines chez les bactéries peut être influencée par plusieurs facteurs. La température, le pH, et surtout la composition de base du milieu de culture, sont autant de facteurs qui ont été pris en compte par plusieurs auteurs dans la recherche des lectines bactériennes (Gilboa-Garber, 1972, 1982, 1983; Chiba *et al.*, 2001; Podgorskii *et al.*, 2014). Une étude récente a démontré, qu'un changement dans le rapport entre les sources d'azote et de carbone (KNO_3 et Glucose, respectivement) dans la composition d'un milieu de culture, peut stimuler la synthèse de lectines extracellulaires chez

plusieurs souches appartenant au genre *Bacillus*. Si le rapport de ces deux composants passe de 1:1 à 1:3, puis à 1:8, la production de lectines augmente de manière significative (Podgorskii *et al.*, 2014). En plus de cela, il a été également démontré que le galactose, et le maltose ont le même effet stimulateur que celui du glucose. La même étude montre que la production de lectines dépend directement de la croissance cellulaire chez le genre *Bacillus*. La synthèse des lectines commence avec la phase exponentielle de croissance, et la production maximale est atteinte en phase de ralentissement. La transition vers la phase stationnaire entraîne une baisse significative de l'activité lectinomique (Podgorskii *et al.*, 2014).

Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*, l'addition de choline dans le milieu de culture augmente sensiblement la production des lectines PA-II et PA-III (Gilboa-Garber, 1972, 1982). La densité cellulaire et l'âge sont aussi des facteurs importants dans la production de lectines chez *P.aeruginosa* (Gilboa-Garber, 1983).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des lectines chez des bactéries actinomycétales, notamment celles appartenant à des genres rares (non *Streptomyces*), en utilisant trois milieux de cultures différents (ISP₂, Bennett, et PMY). Ces milieux différents par leur composition ainsi que les sources énergétiques qu'ils peuvent apporter. L'ISP₂ est un milieu préconisé pour la croissance et la sporulation des actinomycètes, il est majoritairement constitué d'extrait de malt, source de carbone riche en maltose (Shirling and Gottlieb, 1976). Le milieu Bennett (riche en glucose) lui aussi est préconisé pour la croissance des espèces appartenant aux genres : *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia* et *Streptomyces* (Jones, 1949). Le PMY est un milieu riche en glucose et en sources azotées, ce milieu proposé par Chiba *et al.*, favorise la production d'Actinohivine, lectine produite par la souche actinomycétale *Longispora albida* (Chiba *et al.*, 2001).

Dans le but d'optimiser la production des lectines, les souches actinomycétales ont été incubées à une température optimale de croissance pendant 6 jours. Les souches à croissance lente (GF 03, et GF 118b) ont été incubées pendant 10 jours. La période d'incubation coïncide avec la phase de ralentissement des souches testées.

La mesure de l'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (Goldstein and Poretz, 1986; Rüdiger, 1993). Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la

surface des érythrocytes. Les résultats montrent que sur l'ensemble des souches testées, la majorité (5/6 souches) produit des lectines extra et/ou intracellulaires. Le test d'hémagglutination nous a permis de sélectionner la souche *Micromonospora auratiaca* GF44c comme meilleure souche productrice de lectines (fraction protéique intracellulaire), et a été sélectionnée pour la suite de l'étude.

La mise en évidence des lectines chez les actinomycètes a été déjà décrite par d'autres auteurs. Singh *et al.*, ont démontré la présence d'activité hémagglutinante dans les extraits protéiques intra et extracellulaires de plusieurs souches de *Streptomyces*, la plupart de ces activités ont été observées avec les hématies de rat et de lapin, les même auteurs décrivent une faible activité hémagglutinante de la fraction intracellulaire de la souche *Micromonospora inositol*a avec les hématies de lapin. Ils ont expliqué cette spécificité, par la richesse de la surface des hématies des rongeurs (rat, lapin, et souris) en protéines hautement glycosylées, par rapport aux hématies de type humain (Singh *et al.*, 1993).

Il n'existe pas de protocole standardisé pour la purification des lectines, la principale raison pour cela, est l'extrême hétérogénéité fonctionnelle et structurelle de ces protéines qui sont généralement constituées de plusieurs sous unités qui forment des dimères ou des polymères macromoléculaires, en plus de cela, elles peuvent présenter des affinités complexes, qui varient en fonction du pH et de la composition du milieu (présence de glucides, ions métalliques) (Lutsik *et al.*, 1981; Van Damme *et al.*, 2008). La chromatographie d'affinité sur colonnes Sepharose couplées à différents sucres ou glycoprotéines est décrite par plusieurs auteurs comme la méthode la plus efficace et la plus rapide pour la purification de ces protéines (Naeem *et al.*, 2007; Kawsar *et al.*, 2008; Nagre *et al.*, 2010). Cependant, cette méthode n'est pas adaptée à tout les types de lectines. Dans certains cas, l'affinité de ces protéines pour leur ligand est tellement forte qu'il est impossible de les purifier par cette méthode sans les dénaturer (Podgorskii *et al.*, 2014). Des méthodes de fractionnement plus classiques, comme la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, la chromatographie échangeuse d'ions, et la chromatographie sur gel filtration sont de bonnes alternatives pour la purification de lectines dont l'affinité est inconnue ou complexe (Sova, 1985; Podgorskii *et al.*, 1992; Zhigis *et al.*, 1993).

Dans notre cas, l'utilisation de plusieurs colonnes d'affinités couplées à différents ligands (mucine, fetuine, N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine, fucose, mannose, galactose, et acide sialique), n'a donné aucun résultat avec notre extrait. Une purification sur 3 étapes comprenant une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, une chromatographie échangeuse d'ions sur résine DEAE-cellulose, suivie d'une chromatographie gel filtration sur colonne Sephadex G200, a permis de purifier notre échantillon avec un indice de purification de 3.05. L'élution de la fraction active dans le volume mort de la colonne Sephadex G200 (Domaine de fractionnement = 5 à 600 kDa), suggère la présence de macromolécules de haut poids moléculaire. Les lectines bactériennes peuvent se présenter sous forme de macromolécules constituées de plusieurs sous unités identiques ou différentes. Par exemple, une lectine isolée à partir de la souche *Streptomyces* SFL100-2 présente un poids moléculaire total d'environ 800kDa, cette lectine est constituée de 12 sous unités identiques, chacune de 68kDa (Matsui *et al.*, 1985; Matsui and Oishi, 1986). En fonction de cela on a suggéré que la fraction active exclue dans le volume mort de la colonne SephadexG200, contenait des lectines de taille macromoléculaire, probablement constituées de plusieurs sous unités. Il faut noter également, la possibilité de formation d'agrégats protéiques suite au traitement ultrasonique utilisé lors de l'extraction, bien que les lectines sont généralement décrites comme résistantes à ce genre de traitements (Gilboa-Garber, 1982, 1986).

Afin de mieux optimiser la purification de ces molécules hémagglutinantes, et de mieux les caractériser, une purification en une seule étape sur system AKTA FPLC a été réalisée. L'extrait brut intracellulaire de la souche GF44c a été directement chargé sur une colonne gel filtration de type Superose6. Le Superose est une matrice d'agarose hautement réticulé, avec un domaine de fractionnement allant de 5 à 5000kDa. Le profil chromatographique a révélé l'élution de 7 pics protéiques, et le test d'hémagglutination a montré que la fraction P1 est la seule fraction active, contenant probablement des lectines. Le test IHA montre que ces lectines sont inhibées uniquement en présence de certaines glycoprotéines (Ovalbumine, BSA, Caséine), avec une forte affinité pour l'Ovalbumine (CMI= 0.004 mg/mL). L'Ovalbumine est une protéine portant plusieurs chaînes de glycanes de type hybride, particulièrement riches en unités de mannose, [(Man)₅(GlcNAc)₅(Gal)₁] (Tai *et al.*, 1975; Harvey *et al.*, 2000). D'après nos résultats, l'utilisation du mannose sous forme monosaccharidique ne montre aucun effet inhibiteur sur l'activité de la fraction P1, ceci indique que les lectines contenues dans cette fraction possèdent uniquement une spécificité

pour les oligosaccharides riches en mannose. Les sites de liaison de ce genre de lectines sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour leur ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes, et se traduit par une forte affinité (Cioci, 2006).

De manière similaire, une lectine de 12.5kDa isolée à partir d'un genre rare d'actinomycètes *Longispora albida*, présente une affinité unique pour les glycoprotéines hautement riches en chaînes mannosylées comme l'Ovalbumine, la Thyroglobuline, la Ribonucléase B et la glycoprotéine HIV-gp120 (Chiba *et al.*, 2004). Il a été démontré que cette lectine monomérique possède la capacité d'inhiber le VIH par sa forte affinité pour la glycoprotéine virale gp120, d'où son appellation d'Actinohivine (Chiba *et al.*, 2001, 2004). Cette lectine est considérée actuellement comme une molécule antivirale à fort potentiel (Chiba *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2009; Hoorelbeke *et al.*, 2010). Par ailleurs, les activités antivirales d'un certain nombre de lectines possédant une affinité aux oligosaccharides et aux glycoprotéines riches en mannose ont été décrites par plusieurs auteurs (Ziółkowska and Wlodawer, 2006; Keyaerts *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que les lectines contenues dans la fraction (P1) de la souche GF44c peuvent présenter un potentiel antiviral très intéressant.

L'étude menée par Singh *et al.*, montre que les fractions de lectines de plusieurs souches de *Streptomyces* possèdent plusieurs spécificités qui varient d'une souche à l'autre. Cependant leur affinité pour la fétuine, semble être une caractéristique commune pour la plupart des fractions testées (Singh *et al.*, 1993). La fétuine est une glycoprotéine riche en chaînes glucidiques de type complexe, avec plusieurs sous unités d'acide sialique et de mannose (Chiba *et al.*, 2004).

Nos résultats montrent que les lectines contenues dans fraction P1 restent actives jusqu'à une température de 90°C, résistent bien à des pH hautement alcalins (pH=11), et ne sont pas inhibées en présence d'EDTA. Les lectines bactériennes sont désignées comme étant des protéines thermostables. Elles peuvent tolérer des températures élevées allant de 40 jusqu'à 100°C, et conservent leur activité après une incubation entre 60 à 80°C pendant 5h, et à 100°C pendant 5 à 10min (Podgorskii *et al.*, 1992). Elles restent également actives dans une large gamme de pH (de 2.5 à 9.0), et résistent bien à la protéolyse et à d'autres traitements dénaturants (Gilboa-Garber, 1982, 1986; Podgorskii *et al.*, 1992, 2014). La présence de molécules de carbohydrates contribuent grandement dans la stabilité de la structure des lectines, ce qui leur permet de tolérer les changements des conditions environnementales

(Gilboa-Garber, 1982, 1986; Podgorskii *et al.*, 2014). Par contre, il a été décrit que de nombreuses lectines bactériennes perdent leurs activités en présence de chélateurs comme l'EDTA. Les lectines de *P. aeuruginosa* (PA-IL et PA-IIL) par exemple nécessitent la présence d'ions bivalents (Ca^{+2} et Mg^{+2}), qui jouent un rôle cruciale dans la liaison avec glucides (Avichezer *et al.*, 1994).

Une étude récente montre que les lectines produites par différentes souches saprophytes de *Bacillus*, en plus d'être résistantes à des températures et à des pH extrêmes, elles restent actives en présence d'EDTA (Podgorskii *et al.*, 2014), de même pour l'Actinohivine qui reste active en présence d'une forte concentration d'EDTA, de sels, ou de certains détergents (Chiba *et al.*, 2004). Cette multi résistance suggère que les lectines peuvent avoir un rôle physiologique important dans la survie et l'adaptation des bactéries. Des études ont montré que les lectines végétales jouent un rôle important dans la protection et l'adaptation des plantes à leur milieu (Van Damme *et al.*, 2008). Cette résistance observée chez les lectines produites par la souche *M.aurantiaca* GF44c à des facteurs environnementaux (températures et pH) défavorables peut être le signe qu'elles jouent les mêmes fonctions que leurs homologues chez les végétaux.

La plupart des résultats que nous avons obtenus, concordent avec les caractéristiques des lectines produites par d'autres bactéries, et confirment la présence de lectines dans la fraction (P1) de la souche GF44c. Cependant, l'exclusion de la fraction P1 dans le volume mort de la colonne Superose 6 indique la présence de structures de taille macromoléculaire supérieure à 5000kDa, et soulève plusieurs questions sur la nature de ces macromolécules hémagglutinates, surtout que l'analyse SDS-Page de la fraction P1 révèle la présence de plusieurs bandes protéiques.

Dans un cas similaire au notre, Kataoka *et al.*, (2014), décrivent la purification d'un complexe protéique macromoléculaire présentant une activité kératinolytique à partir de la souche *Meiothermus ruber* H328. La purification de l'extrait brut extracellulaire de cette bactérie sur une colonne Sephacryl S1000 (domaine de fractionnement : 5 – 5000kDa), s'est résolu par l'exclusion de la fraction protéolytique active dans le volume morte de la colonne, et l' SDS-Page de cette fraction a révélé la présence de plusieurs bandes protéiques. Ces résultats ont conduit les auteurs à suggérer la présence de protéases associées à des structures de taille comparable à celle des virus. Ils ont conclu par la suite que ces structures sont des

vésicules membranaires riches en protéines, secrétées par la bactérie dans le milieu de culture (Kataoka *et al.*, 2014).

2. Mise en évidence de vésicules membranaires dans la fraction P1

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique rapide et efficace qui permet de mettre évidence la présence de complexes macromoléculaires. C'est une technique qui utilise des électrons de haute énergie (soumis à des fortes tensions d'accélération de 60 à 400 kV) pour former une image d'objets de faible épaisseur (de l'ordre de 50 à 200 nm). La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une autre technique très puissante pour caractériser les espèces macromoléculaires. Elle permet la détermination de nombreuses informations sur les particules diffusantes, telles que: la présence ou non d'agrégats, la polydispersité, l'homogénéité, la taille des particules en solution, etc... C'est une technique très efficace, rapide, précise, simple à réaliser où l'échantillon peut être récupéré. Les particules en solution présentent un mouvement aléatoire (mouvement Brownien) qui est lent pour les grosses particules et rapide pour les petites. La quantification de leur vitesse de diffusion par DLS permet ainsi d'en déduire leur rayon hydrodynamique (grandeur qui dépend notamment de leur masse et de leur forme). C'est grâce à l'utilisation combinée de ces deux techniques, qu'il a été possible de mettre en évidence, et de confirmer la présence de vésicules membranaires de taille nanométrique dans la fraction P1 de la souche GF44c.

Les vésicules membranaires sont des structures sphériques, constituées de protéolipides en bicouches, et hébergeant des sous-ensembles spécifiques de protéines bioactives, des lipides, des acides nucléiques et d'autres métabolites (Lee *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2014). La production de vésicules membranaires est un phénomène décrit chez les eucaryotes, les procaryotes et les archées (Brown *et al.*, 2015). Les vésicules peuvent agir comme un moyen de transport et de livraison, comme des agents de nucléation dans la formation des biofilms (communications bactériennes), et comme contributeurs à la survie et à la virulence bactérienne. Elles servent notamment à transporter des composés variés, y compris des facteurs de virulence, des adhésines, de l'ADN, ARN, des toxines, des immunomodulateurs et des facteurs nutritionnels (Brown *et al.*, 2015). Ces vésicules sont généralement associées à la cytotoxicité, l'invasion des cellules hôtes, la fusion membranaire,

le transfert d'ADN, et à la résistance des pathogènes aux antibiotiques (Schooling and Beveridge, 2006; Kulp and Kuehn, 2010; György *et al.*, 2011; EL Andaloussi *et al.*, 2013).

La découverte de la production de vésicules membranaires par les bactéries à Gram négatif, remonte à près de 40ans (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006; Lee *et al.*, 2008). Alors que chez les bactéries Gram positif, elles ont été mentionnées qu'en 1990, avec l'observation de structures sphériques vésiculaires à la surface de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, grâce à l'utilisation de la microscopie électronique (Dorward and Garon, 1990). Le manque d'intérêt des scientifiques pour les vésicules membranaires chez les Gram positif par rapport à ceux des Gram négatif, est principalement dû au fait, que l'épaisse paroi de peptidoglycane chez les Gram positif représente un obstacle pour la formation et la libération de vésicules, surtout qu'il a été démontré que la formation des vésicules membranaires chez les Gram négatif provenait du bourgeonnement de la membrane externe de ces dernières, tout en encapsulant les protéines et autres molécules présentes dans l'espace périplasmique (Costerton *et al.*, 1974; Beveridge, 1999; Ellis and Kuehn, 2010; Kulp and Kuehn, 2010; Kulkarni *et al.*, 2014). La présence de paroi cellulaire épaisse a entravé la recherche de vésicules membranaires chez les bactéries Gram positif, en raison de l'hypothèse selon laquelle les vésicules ne peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire à travers cette large barrière de peptidoglycane (Brown *et al.*, 2015).

En 2007, des vésicules ont été isolées et caractérisées à partir des biofilm de *Mycobacterium ulcerans*, ouvrant la voie pour l'étude de la vésiculogénèse chez les bactéries Gram positif (Rodrigues *et al.*, 2007). Plusieurs autres vésicules membranaires ont pu être purifiées, en utilisant des procédés d'extraction physiques, comme les traitements thermiques ou les ultrasons (Brown *et al.*, 2015).

Récemment, plusieurs études décrivent la formation de vésicules membranaires chez plusieurs espèces bactériennes à Gram positif, comme *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (Lee *et al.*, 2009, 2013), *Mycobacterium ulcerans* (Marsollier *et al.*, 2007), *Bacillus anthracis* (Rivera *et al.*, 2010), *Streptococcus pneumoniae* (Olaya-Abril *et al.*, 2014), *Streptococcus suis* (Haas and Grenier, 2015), *Streptomyces coelicolor* (Schrempf *et al.*, 2011), et *Streptomyces lividans* (Schrempf and Merling, 2015).

Dans notre étude, l'analyse MET et DLS, révèle la présence de vésicules membranaires d'une taille allant de 30 à 100nm, ces vésicules sont de taille similaire à celles décrites chez d'autres bactéries à Gram positif comme *S.aureus* (Lee *et al.*, 2009),

L. monocytogenes (Lee *et al.*, 2013), et *S. pneumoniae* (Olaya-Abril *et al.*, 2014). Cependant, ces vésicules sont plus petites que celles produites par *S. coelicolor* (Schrempf *et al.*, 2011) et *S. lividans* (Schrempf and Merling, 2015), dont la taille varie entre 20nm et 400nm. Cette variabilité de la taille des vésicules chez les Gram positif, suggère que la vésiculogénèse est un phénomène universel, et que les bactéries synthétisent et régulent la formation des vésicules de manières différentes.

Les mécanismes par les quelles les vésicules sont produites et libérées, restent encore largement inconnues chez les Gram positif (Olaya-Abril *et al.*, 2014). Plusieurs hypothèses ont été cependant postulées concernant ce sujet. L'une de ces hypothèses suggère que les vésicules peuvent être forcées à travers la paroi cellulaire par la pression de turgescence, après leur libération de la membrane plasmique et leur accumulation dans l'espace périplasmique. Dans ce cas, la formation des vésicules peut être régulée par la taille des pores de la paroi cellulaire ou son épaisseur (Rodrigues *et al.*, 2008; Vallejo *et al.*, 2012). La seconde hypothèse, stipule que les vésicules membranaires sont formées au cours de la division cellulaire. Les expériences préliminaires menées par Olaya-abril *et al.*, montrent que les vésicules produites par *streptococcus pneumoniae* peuvent s'échapper de la cellule au niveau du point de septation, durant le processus de division cellulaire (Olaya-Abril *et al.*, 2014).

Une dernière hypothèse, suggère l'association d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire avec les vésicules. L'action de ces enzymes sur la paroi cellulaire permet son assouplissement, ce qui facilite la libération des vésicules dans le milieu extracellulaire. Plusieurs de ces enzymes ont été trouvées dans le protéome vésiculaire de plusieurs bactéries Gram positif (Albuquerque *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Olaya-Abril *et al.*, 2014).

Cette hypothèse a été suggéré la première fois par Kadurugamuwa et Beveridge, afin d'expliquer la formation de vésicules membranaires contenant des protéines cytoplasmiques chez *Pseudomonas* (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995). Ce mécanisme implique une action localisée et transitoire d'hydrolases, qui affaiblie la couche de peptidoglycane juste à l'endroit où les vésicules se forment. Récemment Schrempf et Merling, ont réussi à observer pour la première fois la production *in vivo* des vésicules chez une souche de *Streptomyces lividans* (Schrempf and Merling, 2015). Ces auteurs décrivent l'apparition de protubérances contenant des vésicules membranaires, tout le long du mycélium de substrat pendant la fin de la croissance végétative de la souche. Ils ont démontré que la formation de ces vésicules se fait au niveau des sites où le peptidoglycane est moins réticulé, avec des niveaux moindres de

polymérisation (Schrempf and Merling, 2015). Ils ont également remarqué qu'un traitement à la vancomycine (antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane) conduit à la formation des mêmes protubérances contenant des vésicules sur une culture plus jeune. Ces auteurs ont conclu que les défauts dans la synthèse de la paroi cellulaire qui surviennent chez des cultures en fin de croissance, ou bien l'altération de la synthèse de la paroi, par des agents antibiotiques comme la Vancomycine, se traduisent par une altération des domaines lipidiques de la membrane cytoplasmique, ce qui facilite la formation et la libération des vésicules membranaires (Schrempf and Merling, 2015). Ces travaux confortent l'hypothèse selon laquelle les vésicules membranaires sont libérées suite à des altérations localisées de la paroi cellulaire, soit par l'action d'enzymes hydrolytiques, d'antibiotiques, ou des traitements physiques. En effet, Il a été clairement démontré que, la libération des vésicules est fortement induite par certains traitements physiques ou chimiques chez certaines souches. Un traitement aux ultrasons pendant une minute des cellules de *Bordetella pertussis* permet d'induire la formation des vésicules membranaires de manière accrue (Bottero *et al.*, 2012; Chatterjee and Chaudhuri, 2012). Ces résultats suggèrent que le traitement ultrasonique appliqué sur les cellules de la souche GF44c afin d'extraire la fraction cytosolique a probablement induit la libération de ces vésicules.

D'après la littérature, les procédures d'extraction et de purification des vésicules membranaires à partir des bactéries, reposent généralement sur des techniques d'ultracentrifugation, et de séparation sur gradient de densité (Klimentová and Stulík, 2015). Cependant, une étude décrit la purification avec succès des vésicules membranaires produites par *N.meningitidis* en utilisant une chromatographie sur colonne gel filtration de type Séphacryl S-500 (Post *et al.*, 2005). La purification de vésicules membranaires de la souche GF44c sur colonne Superose6, confirme que la chromatographie sur gel filtration est un moyen très rapide et facile à réaliser pour l'obtention de vésicules membranaires pures.

3. Analyse protéomique et fonctionnelle des vésicules membranaires de la souche GF44c

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant dans sa globalité, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire (ex: les protéines nucléaires, les protéines mitochondriales, les protéines membranaires...) (Kenyon *et al.*, 2002). L'approche protéomique vise aussi à établir

l'identité, la quantité et la fonction de ces protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Patterson and Aebersold, 2003).

La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse, a effectué un bond prodigieux depuis une décennie, comme en témoigne l'attribution du prix Nobel de chimie en 2002. La spectrométrie de masse appliquée à la biologie a pris tout son essor dans les années 90 grâce au développement de nouvelles sources d'ionisation MALDI et ESI adaptées à l'analyse de biomolécules. Les développements technologiques constants, aussi bien que le niveau de l'instrumentation en spectrométrie de masse proprement dite, que des techniques de séparation des protéines et des peptides en amont de leur analyse par spectrométrie de masse ont permis l'essor de l'analyse protéomique.

Des développements conjoints dans trois domaines sont à l'origine de l'ascension de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse : les développements instrumentaux de la spectrométrie de masse, les développements des méthodes séparatives des protéines et peptides, et les projets de séquençage de génomes à haut débit nourrissant les banques de séquence qui constituent la ressource de base pour l'identification des protéines avec les données de spectrométrie de masse. Ces trois domaines sont les clés des différentes étapes de l'analyse protéomique (Miguet, 2006).

L'analyse SDS-page a démontré que les vésicules membranaires contenues dans la fraction P1, sont très riche en protéines. Ces protéines vésiculaires ont été identifiées, par spectrométrie de masse de type (nanoLC-ESI-MS/MS). Dans le cas de la souche GF44c, dont le génome n'est pas encore séquencée, il a été possible d'identifier ces protéines grâce à la base de donnée protéomique de souches apparentées comme *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 / DSM 43813 / JCM 10878 / NBRC 16125 / INA 9442 (Proteome ID : UP000001908). Le **tableau 8** présente l'ensemble des 81 protéines qui ont été identifiées dans les vésicules de *Micromonospora aurantiaca* GF 44c.

Selon la littérature, la proportion des protéines contenues dans les vésicules membranaires par rapport au protéome théorique total varie d'un microorganisme à un autre dans une gamme de ~ 3-24%, cependant ce pourcentage ne dépasse pas 8% chez la majorité des microbes (Chernov *et al.*, 2014). Dans notre cas, cette valeur est de 1.30 %.

En comparaison avec le protéome totale de la souche *M.aurantiaca* ATCC 27029 on observe que ces vésicules sont spécialement enrichies en protéines membranaires (48% contre 28%). Cette prédominance est également décrite chez les vésicules membranaires d'autres bactéries Gram positif, comme *Clostridium perfringens* type A (Jiang *et al.*, 2014), *Bacillus subtilis* (Brown *et al.*, 2014), *Streptococcus pyogenes* (Biagini *et al.*, 2015), et *S.lividans* (Schrempf and Merling, 2015) . Cette abondance des protéines membranaires intervient sans doute dans la stabilité de la membrane vésiculaire.

La prédiction du signal peptide par analyse *in silico* montre que 33% des protéines identifiées possèdent un signal Sec, et 3% un system Tat. Plus de la moitié des protéines (54%) ne présentent aucun signal peptide. Chez les Actinomycètes, la majorité des protéines secrétées sont exportées à travers la membrane cytoplasmique via les deux systèmes Sec, et Tat, en fonction du peptide signal qu'elles portent. La particularité du system Sec est que les protéines sont secrétées sous leur forme linéaire et qu'elles acquièrent leur conformation finale après leur passage à travers la membrane cellulaire, tandis que le système Tat concerne la translocation de protéines déjà repliées et activées au sein du cytoplasme (Anné *et al.*, 2014). La prédominance de protéines dépourvus de peptide signal, démontre que les vésicules membranaires sont un moyen de transport et de sécrétion pour ces protéines dans le milieu extracellulaire. Wai *et al.*, ont décrit que les vésicules produites par les entérobactéries peuvent agir *in vivo* comme cargo pour le transport de toxines dépourvus de séquences signal (Wai *et al.*, 2003).

Une constatation frappante, est l'enrichissement de ces vésicules membranaires en protéines acides. Le pI moyen calculé est de 6.3 pour le protéome vésiculaire contre 7.0 pour le protéome totale de la souche *M.aurantiaca* ATCC 27029. L'abondance de protéines fortement anioniques dans les vésicules de la souche GF44c est due en partie à la présence d'oxydoréductases, et des sous unités d'ATPsynthase. Certaines analyses protéomiques d'OMVs produites par des bactéries Gram négatif, ont également révélé un enrichissement en protéines anioniques (Molloy *et al.*, 2001). D'autres ont montré le contraire, avec une abondance de protéines cationiques (Baik *et al.*, 2004; Post *et al.*, 2005).

L'analyse fonctionnelle montre que la plupart des protéines vésiculaires de la souche GF44c sont impliquées dans des processus métaboliques (production et conversion d'énergie, transport et métabolisme des acides aminées), et dans une multitude de processus cellulaires et de signalisation (modification post traductionnelle/turnover des protéines et les chaprones,

biogenèse de la paroi cellulaire/membrane/enveloppe, trafic intracellulaire/sécrétion et transport vésiculaire, mécanismes de défense). La même chose est observée chez les vésicules membranaires produites par *Clostridium perfringens* type A (Jiang *et al.*, 2014), *Campylobacter jejuni* (Jang *et al.*, 2014), et *Listeria monocytogenes* (Lee *et al.*, 2013). Cependant, il a été démontré de manière générale, que les proportions de ces groupes dans les vésicules membranaires varient énormément d'une souche à l'autre, ce qui indique l'extrême variété fonctionnelle que peuvent présenter ces vésicules (Vaughan *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Prados-Rosales *et al.*, 2011; Haas and Grenier, 2015).

De façon intéressante, beaucoup des protéines vésiculaires identifiées chez la souche *M.aurantiaca* GF44c, ont des homologues identifiés dans les vésicules membranaires d'autres bactéries à Gram positif (Lee *et al.*, 2009; Schrempf *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Olaya-Abril *et al.*, 2014; Biagini *et al.*, 2015; Schrempf and Merling, 2015). Sur les 81 protéines identifiées, beaucoup sont des enzymes (principalement des sous unités enzymatiques impliquées dans la chaîne respiratoire), des transporteurs ABC, et des lipoprotéines. Plusieurs protéines non caractérisées ont également été identifiées (18). Grâce à l'analyse fonctionnelle de ces protéines, et aux tests biologiques réalisés, plusieurs rôles peuvent être suggérer pour les vésicules membranaires de la souche GF44c.

- **Acquisition des nutriments**

Deux sérine protéases ont été identifiées dans le protéome vésiculaire de la souche GF44c, une métalloprotéase (D9T6P7) et une peptidase (D9T423), ces deux enzymes présentent un signal Sec qui permet leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. L'activité protéolytique de ces deux enzymes a été par ailleurs mise en évidence sur un milieu à base de caséine (**Figure 29**). Plusieurs protéases associées aux vésicules ont été décrites chez plusieurs espèces bactériennes (Dutson *et al.*, 1971; Thompson *et al.*, 1985; Bauman and Kuehn, 2006; Vasilyeva *et al.*, 2008; Schrempf *et al.*, 2011; Fulsundar *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Schrempf and Merling, 2015). Les vésicules membranaires de *P. aeruginosa* portent à leur surface des protéases (aminopeptidases) pouvant libérer dans l'environnement des acides aminés critiques pour la croissance bactérienne (Bauman and Kuehn, 2006).

L'analyse protéomique a également permis d'identifier plusieurs transporteurs ABC, et des lipoprotéines appartenant à la famille des (Substrat binding protein). Les systèmes de transport de type ABC, également appelés « trafic ATPases », constituent l'une des plus vastes familles de protéines retrouvée dans tout le règne vivant. Le terme ABC-transporteur

regroupe un ensemble de systèmes de transport phylogénétiquement proches et remarquablement bien conservés dans leur organisation. Ils sont caractérisés par leur structure comprenant au moins quatre domaines : deux domaines hydrophobes formant un canal de translocation et deux domaines hydrophiles impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport.

Ces transporteurs peuvent importer ou exporter une variabilité considérable de substrats allant des ions aux macromolécules. De par la grande variété de molécules prises en charge, les systèmes ABC peuvent exercer de nombreuses fonctions physiologiques chez les bactéries. Ils permettent notamment le transport de nutriments, la transduction de signaux, l'export de facteurs de virulence et sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques de nombreux agents pathogènes (Mourez *et al.*, 2012).

On distingue parmi les ABC transporteurs deux grandes classes : d'une part les systèmes dédiés à l'export que l'on retrouve chez les procaryotes et les eucaryotes et d'autre part les systèmes dédiés à l'import, présents uniquement chez les procaryotes. Ces derniers possèdent une protéine de fixation spécifique qui est responsable de la capture du substrat (SBP : Substrat binding protein). Chez les bactéries à Gram négatif, elle est sécrétée dans le périplasme (Neu and Heppel, 1965) alors que chez les bactéries à Gram positif, elle est transloquée vers la face externe de la cellule par la voie générale de sécrétion Sec, son peptide signal est clivé, pour être ensuite ancrée à la face externe de la membrane. Cet ancrage est permis par la présence d'une extension N-terminale lipidique hydrophobe (Gilson *et al.*, 1988). Les micrographes des vésicules membranaires de la souche GF44c, montrent bien des molécules attachées à la surface vésiculaire (**Figure 21, C**).

Les SPBs sont des chimiorécepteurs, responsables de la reconnaissance et la capture de différents substrats pour les systèmes de transports ABC. Ils sont également des initiateurs des voies de transduction de signaux (Tam and Saier, 1993). Les SBP sont constituées de deux domaines principaux reliés entre eux par deux segments, formant ainsi des lobes flexibles entre les quelles se fixe le substrat (Berntsson *et al.*, 2010).

Ces protéines sont regroupées en 8 familles en fonction de leur spécificité aux différents substrats (affinité aux métaux, aux carbohydrates, vitamines, acides aminées et oligopeptides). La famille 1 (regroupe les SPBs ayant une affinité pour les oligosaccharides, le glycerol 3-phosphate, et le fer). Famille 2 (galactose, ribose, arabinose, et de multiples monosaccharides). Les SPBs de cette famille sont des homologues à un certain nombre de

protéines régulatrices de transcription, incluant les répresseurs de lactose, galactose, et fructose chez *E.coli*. Famille 3 (histidine, lysine-arginine-ornithine, glutamine, octapine, nopaline, et d'autres acides aminés basiques). Famille 4 (leucine, et leucine-isoleucine-valine). Famille 5 (dipeptides, oligopeptides, et nickel). Famille 6 (sulfate, thiosulfate, et phosphate). Famille 7 (dicarboxylates, et tricarboxylates). Famille 8 (complexes de fer, vitamine B12) (Tam and Saier, 1993; Quioco and Ledvina, 1996; Berntsson *et al.*, 2010).

L'analyse fonctionnelle des trois protéines extracellulaires réceptrices appartenant à la famille 5 des SBPs (D9T8P6, D9TE3, D9TCD2) démontre que ces protéines sont des récepteurs de peptides homologues aux protéines de la famille bactérienne des Oligopeptide-binding proteins (OppA/ DdpA : COG4166 et COG0747). Cette famille de récepteurs a été également identifiée chez les vésicules de *S.lividans* (Schrempf and Merling, 2015). Les deux protéines SBP appartenant à la famille 3 (D9SYR3 et D9T5Z4) sont des récepteurs d'histidine (HisJ, COG0834). La protéine (D9T5Z9) présente un domaine d'affinité pour la leucine (LivK, COG0683), alors que la protéine SPB de la famille 1 (D9TBK2) présente une affinité pour les oligosaccharides (COG1653). Une protéine réceptrice de phosphate (D9SZF7), a été également identifiée.

Ces protéines interviennent dans la fixation et la capture de peptides, acides aminées, sucres et ions inorganiques, à partir du milieu extracellulaire et sont intégrées à un système de transport de type ABC spécialisé pour chaque substrat (Monnet, 2003). Plusieurs transporteurs ABC impliqués dans l'import de nutriments ont été par ailleurs identifiés (transporteurs ABC d'acides aminées : D9SYR4, D9TEW7, D9T5Z6, transporteurs ABC de carbohydrates : D9SZN3, et transporteurs ABC d'ions inorganique : D9T3U7, D9T1C7).

Il faut noter que l'activité des ABC transporteurs dépend fortement des molécules d'ATP, Ce qui explique l'identification d'un grand nombre d'enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire, et la synthèse d'ATP (ATP synthase, NADH-quinone oxidoreductase, Succinate dehydrogenase/ fumarate reductase, Cytochrome c oxidase).

La présence de protéases, SPBs, et transporteurs ABC dans les vésicules membranaires de la souche GF44c suggère qu'elles jouent un rôle important dans la nutrition (par capture et apport de différents substrats aux cellules). Le rôle des vésicules dans l'acquisition de nutriments a déjà été démontré chez certaines bactéries à Gram négatif. La production de vésicules membranaires associées à des enzymes de dégradation et des

récepteurs, contribuent significativement à la survie des souches *Pseudomonas fragi*, et *Pseudomonas aeruginosa* (Thompson *et al.*, 1985; Bauman and Kuehn, 2006).

Les amidases sont également des enzymes qui jouent un rôle important dans l'acquisition des nutriments. Il a été démontré que les vésicules membranaires de *P. aeruginosa* présentent des activités antibactériennes par l'action d'hydrolases de peptidoglycane. Cette action permet non seulement de réduire la compétition dans les environnements polymicrobiaux mais permet également d'apporter aux cellules lytiques des nutriments provenant des cellules lysées (Bauman and Kuehn, 2006). Bien qu'une N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (D9T4B3) ait été identifiée, les vésicules membranaires de la souche GF44c, n'ont montré aucune activité antibactérienne. La concentration de cette enzyme dans ces vésicules est probablement trop faible pour pouvoir inhiber les bactéries tests, ce qui suggère que cette dernière intervient uniquement dans la libération des vésicules, et non dans la lyse microbienne et l'acquisition de nutriments.

- Adhésion et hémagglutination

Les vésicules membranaires de *Flavobacterium psychrophilum* et *Porphyromonas gingivalis* ont été décrites pour leur capacités d'hémagglutination (Grenier and Mayrand, 1987; Møller *et al.*, 2005). Il a été démontré que les vésicules de *Porphyromonas gingivalis* présentent des complexes d'adhésines membranaires à leur surface qui leur permettent d'adhérer à la plaque dentaire, et les aident à la formation de biofilm (Grenier and Mayrand, 1987; Inagaki *et al.*, 2006).

Les protéines SBP sont décrites comme des adhésines membranaires permettant à certaines espèces bactériennes de se fixer sur des cellules eucaryotes comme *Campylobacter jejuni* (Leon-Kempis *et al.*, 2006), et *Lactobacillus mucosae* ME-340 (Watanabe *et al.*, 2010). L'identification de SPB de la famille 1 (spécifiques aux oligosaccharides) dans le protéome vésiculaire de la souche GF44c, corrèle avec les résultats du test IHA décrit précédemment, et confirme que ces protéines sont à l'origine de l'activité hémagglutinante des vésicules membranaires contenues dans la fraction P1. La présence de lectines à la surface des vésicules membranaires de la souche GF44c suggère qu'elles jouent un rôle important dans l'adhérence de ces vésicules à des cibles spécifiques.

- Modulation de la réponse immunitaire

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la capacité de l'extrait de lectines (vésicules membranaires) de la souche GF44c à stimuler la réponse phagocytaire chez les souris. La phagocytose est un processus important dans l'immunité cellulaire, elle fournit la première ligne de défense de l'hôte contre les microorganismes infectieux ; son principal rôle est l'élimination des microorganismes, des particules étrangères, et l'élimination des cellules mortes (Mukherjee *et al.*, 2010). La phagocytose est principalement réalisée par des phagocytes dits « professionnels », ce qualificatif vient de leur taux de phagocytose nettement plus élevé, ainsi que l'adaptation de leur machinerie moléculaire interne d'internalisation. Chez les organismes supérieurs il existe deux types de phagocytes professionnels : les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) comme les neutrophiles et les éosinophiles, et les phagocytes mononucléaires (monocytes et macrophages). Les macrophages jouent un rôle important dans l'immunomodulation. Plusieurs études suggèrent que la cible primaire de la plupart immunomodulateurs sont les macrophages, ces cellules initient une réponse immunitaire innée, qui à son tour orchestre la réponse adaptative (Singhal and Ratra, 2013).

Chez les animaux de laboratoire, le test de clairance du carbone, permet de déterminer l'influence des immunomodulateurs sur les changements de l'activité phagocytaire des macrophages, par le système réticulo-endothélial. Ce système se compose de la rate (sinus spléniques), thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le foie (cellules de Kppffer), les glandes surrénales, et l'hypophyse (Liu *et al.*, 2010; Erukainure *et al.*, 2011).

L'augmentation de l'indice phagocytaire et la diminution des particules de carbone reflètent l'amélioration de la fonction phagocytaire des macrophages et l'immunité non spécifique. Lorsque la suspension de carbone (encre de Chine) est injectée par voie intraveineuse, le taux d'élimination du carbone dans le sang par les macrophages est régi par une équation exponentielle (Biozzi *et al.*, 1953). L'efficacité des macrophages à éliminer les particules inertes est nettement renforcée par l'opsonisation de ces particules avec des anticorps et avec le complément C3b, conduisant à une élimination beaucoup plus rapide des particules qui circulent dans le sang (Nudo and Catap, 2011; Sidiq *et al.*, 2011; Benmebarek *et al.*, 2013).

Plusieurs rapports indiquent que le système réticulo-endothélial (RES) peut être stimulé par des bactéries vivantes, atténuées, et tuées. Il a été démontré que les lipopolysaccharides (LPS), les endotoxines, les lipoprotéines, et le peptidoglycane de plusieurs bactéries sont des immunostimulateurs du système RES (Patyar *et al.*, 2010; Kou *et al.*, 2014).

L'analyse protéomique des vésicules membranaires de la souche GF44c a identifiée 11 lipoprotéines, majoritairement composées de SBPs. Plusieurs études montrent que les lipoprotéines sont détectées par des récepteurs spécifiques de l'hôte de type Toll-like receptor (TLR2), cette reconnaissance induit l'activation de l'immunité innée, qui a son tour va contrôler l'immunité adaptative (Ozinsky *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2001, 2002; Alexopoulou *et al.*, 2002). L'identification de l'enzyme Prolipoprotein diacylglycerol transferase (D9T628) responsable de la maturation des lipoprotéines, indique qu'elle joue un rôle crucial dans ce phénomène.

La Phosphatidylserine decarboxylase (D9TE36), est une enzyme également décrite pour sa capacité à stimuler les cellules effectrices de l'immunité innée, notamment les macrophages (Thanawastien *et al.*, 2009). L'identification de ces protéines suggère qu'elles jouent un rôle important dans la stimulation phagocytaire observée dans nos résultats.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que les vésicules sont hautement immunogènes, et jouent un rôle important pour contourner la réponse immunitaire humorale de l'hôte. Elles sont utilisées comme leurres afin de permettre aux cellules bactériennes d'échapper au système immunitaire (Vidakovics *et al.*, 2010). L'agent pathogène des voies respiratoires *Moraxella catarrhalis* produit des vésicules qui peuvent interagir et activer les cellules B des amygdales. La présence de lipoprotéines dans ces vésicules se sont révélées être importantes pour l'activation des cellules B. Il a été suggéré que *Moraxella* évite l'interaction directe avec les cellules B de l'hôte, en redirigeant la réponse immunitaire humorale adaptative par la production de vésicules superantigéniques (Vidakovics *et al.*, 2010). Les vésicules de *N. meningitidis* sont également fortement immunogènes lorsque elles sont administrées par voie intra-nasale à des souris provoquant une réponse systémique d'anticorps bactéricides (Saunders *et al.*, 1999).

Plusieurs des protéines identifiées dans le protéome de la souche GF44c, comme les protéines chaperonnes GroEL (D9SZI1, D9TEW2), le facteur d'élongation EF-Tu (D9TF62), et la Préproteine translocase YajC (D9T5N3) sont décrites comme des molécules hautement immunogènes (Vemulapalli *et al.*, 1998; Tsugawa *et al.*, 2007; Noah *et al.*, 2010; Eddy *et al.*, 2014; Carrasco *et al.*, 2015).

- **Résistance et tolérance au stress**

L'identification de plusieurs protéines impliquées dans la tolérance au stress suggère que ces vésicules jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de la souche *M.aurantiaca* GF44c à des conditions défavorables.

Différents stress imposés aux cellules peuvent influencer le taux de sécrétion des vésicules membranaires ainsi que leur composition. Certaines conditions de stress affectant l'enveloppe cellulaire peuvent entraîner l'accumulation d'agrégats de protéines endommagées ou mal repliées. Les agrégats de protéines mal repliées peuvent devenir résistants au clivage protéolytique, et interférer avec les processus essentiels. Des études biochimiques et génétiques ont montré que les chaperonnes possèdent un rôle crucial dans l'inhibition de l'aggrégation des protéines endommagées, la désagrégation, la translocation des protéines, la protéolyse, la maturation des protéines, la transduction du signal, et le maintien de l'intégrité de la membrane cytoplasmique dans des conditions stressantes (Kandror *et al.*, 1994; Tsvetkova *et al.*, 2002; De Los Rios *et al.*, 2006; Tompa *et al.*, 2006). Les chaperonnes GroEL ont été largement étudiées pour leur rôle dans la résistance aux antibiotiques chez *A. baumannii* (Cardoso *et al.*, 2010). Deux de ces protéines (D9SZI1, D9TEW2) ont été identifiées dans les vésicules de la souche GF44c.

L'identification de la protéine UspA (D9SZW8), est un indicateur que ces vésicules ont été libérées en réponse à des conditions stressantes. UspA est une protéine qui appartient à la superfamille des protéines de stress (Universal Stress Protein). L'expression de cette protéine est déclenchée en cas de pénurie de source de carbone, d'azote, de phosphate, sulfate, ou d'acides aminées, ou en cas d'une exposition à la chaleur, à des oxydants, des métaux, à la polymyxine, la cycloserine, l'éthanol, et aux antibiotiques (Nyström and Neidhardt, 1994; Gustavsson *et al.*, 2002; Kvint *et al.*, 2003). Le rôle physiologique exacte de cette protéine est inconnu, mais il a été démontré que cette protéine est essentielle dans la formation de biofilm

chez *P.gingivalis* (Chen *et al.*, 2006), et joue un rôle important dans la survie de *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* dans des conditions d'anaérobiose, ou dans des environnements très acides comme les sucs gastriques (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Schreiber *et al.*, 2006). Ces protéines interviennent également dans la protection de l'ADN contre les UV (Gustavsson *et al.*, 2002), et dans la résistance au stress oxydatif (résistance à l'H₂O₂) (Nyström and Neidhardt, 1994).

Les multidrug-ABC transporteurs sont responsables de la résistance aux antibiotiques chez plusieurs bactéries (Chang, 2003). L'identification de plusieurs de ces protéines (D9TE00, D9TCT9, D9T184, D9TAU1) indique que les vésicules jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques.

La Préprotéine translocase YajC (D9T5N3) est une autre protéine impliquée dans la tolérance au stress chez les bactéries. Une étude récente montre qu'une induction thermique provoque une surexpression de cette protéine chez *E.coli*. Cette surexpression conduit à la formation d'un hydrogel, qui permet à la bactérie de bien résister au changement de température (Fang and Wei, 2011; Fang *et al.*, 2011).

Les CDFs (Cation diffusion facilitator family transporter) (D9TC10) sont des protéines principalement impliquées dans la résistance et la tolérance aux métaux. Il a été démontré qu'elles jouent un rôle essentiel dans l'hémostase des cellules bactériennes par efflux des cations métalliques bivalents (Sturr *et al.*, 1997; Xiong and Jayaswal, 1998; Grass *et al.*, 2005; Teramoto *et al.*, 2012). Ces protéines sont également décrites dans la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae* (Fang *et al.*, 2002).

L'identification de plusieurs protéines liées à la survie chez ces vésicules montre qu'elles jouent un rôle très important dans la capacité d'adaptation des bactéries. Les vésicules peuvent protéger les bactéries de la réponse du système immunitaire de l'hôte, activer la survie dans un environnement stressant, et aider à l'acquisition de nutriments, dans des environnements où le fer et les éléments nutritifs sont rares. Il faut noter que les protéines que nous avons citées ne représentent qu'une petite fraction du protéome vésiculaire ; plusieurs des protéines identifiées sont non caractérisées et leur fonction reste inconnue. La découverte des vésicules membranaires chez les bactéries Gram positif est un fait très récent, et beaucoup reste à découvrir.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail était de mettre en évidence la production de lectines chez les actinomycètes, et notamment les actinomycètes rares. Pour cela six souches ont été cultivées sur 3 milieux différents, et leurs fractions protéiques (Intra et extra cellulaires) ont été soumises à un test d'hémagglutination avec différents types d'érythrocytes.

La meilleure activité a été obtenue avec l'extrait intracellulaire de la souche *M.aurantiaca* GF44c cultivée sur milieu ISP₂. Les lectines contenues dans cette fraction montrent une forte affinité pour l'Ovalbumine, une glycoprotéine riche en oligosaccharides mannosylés. Ces lectines se caractérisent également par leur résistance à des températures très élevées (jusqu'à 90°C), et a des pH alcalins, et restent actives en présence de fortes concentration d'EDTA.

La purification de cet extrait de lectines sur une colonne de gel filtration (Superose6) conduit à l'exclusion de la fraction active dans le volume mort de la colonne. Cette exclusion suggère la présence de structures macromoléculaires. D'autant plus que l'analyse SDS-PAGE révèle plusieurs bandes protéiques.

La microscopie électronique et la diffusion dynamique de la lumière ont mis en évidence la présence de vésicules membranaires d'une taille comprise entre 30 à 100nm, capables d'induire en plus de l'hémagglutination des activités immunomodulatrices et protéolytiques. L'analyse protéomique de ces vésicules par spectrométrie de masse a permis d'identifier 81 protéines différentes, dont la majorité sont d'origine membranaire. Ces vésicules sont particulièrement enrichies en adhésines, enzymes, transporteurs ABC, et en lipoprotéines.

Les résultats des tests biologiques, et l'analyse fonctionnelle de ces protéines ont permis de suggérer plusieurs rôles importants de ces vésicules. Elles peuvent agir comme un moyen de transport et de livraison de certaines molécules et contribuent activement dans l'adaptation et la survie des bactéries dans des conditions de stress, notamment par l'acquisition de nutriments (acides aminées, glucides, et ions inorganiques), la résistance aux antibiotiques, et aux conditions environnementales défavorables, et la protection contre les défenses de l'hôte par modulation immunitaire. Ces vésicules membranaires jouent un rôle important dans le caractère saprophyte de la souche *M.aurantiaca* GF44c.

Cette étude est la première à décrire la production de vésicules membranaires chez le genre *Micromonospora*, et chez les actinomycètes rares en général. Les études sur vésicules membranaires chez les bactéries à Gram positif ne font que commencer, il est nécessaire de réaliser plusieurs autres études transversales afin de mieux comprendre les mécanismes de biogénèse de ces vésicules, les conditions qui induisent leur production, ainsi que leur rôle possible pour cette souche (GF44c), d'autant plus que plusieurs des protéines identifiées sont non caractérisées, et dont les fonctions sont inconnues. Plusieurs études protéomiques sont donc nécessaires afin d'établir un protéome définitif à ces vésicules, et une analyse lipidomique est également primordiale.

Par ailleurs, la richesse de ces vésicules en lectines spécifiques des oligosaccharides riches en mannose, leur confère la capacité de se lier à différentes glycoprotéines virales, il est donc intéressant de tester l'activité virale de ces vésicules. Leur capacité immunostimulatrice représente un autre volet intéressant à explorer, notamment dans le développement de nouveaux immunomodulateurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R. M., ... Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1695–710.
- Alencar, N. M. N., Cavalcante, C. F., Vasconcelos, M. P., Leite, K. B., Aragão, K. S., Assreuy, A. M. S., ... Vale, M. R. (2005). Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(7), 919–22.
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R. T., ... Flavell, R. A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature Medicine*, 8(8), 878–84.
- Allan, E. J., & Prosser, J. I. (1983). Mycelial Growth and Branching of *Streptomyces coelicolor* A3(2) on Solid Medium. *Microbiology*, 129(7), 2029–2036.
- Amano, K., Katayama, H., Saito, A., Ando, A., & Nagata, Y. (2012). *Aleuria aurantia* lectin exhibits antifungal activity against *Mucor racemosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 967–70.
- Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K., & Toda, A. (2001). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12468–72.
- Anné, J., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Van Impe, J., & Bernaerts, K. (2014). Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1750–1761.
- Antonyuk, V. O. (2005). Lektini ta ikh sirovinn? dzherela. In *Lectins and Their Raw Material Sources* (Kvart). Lvov.
- Appleyard, A. N. (2009). Abstracts of Papers of 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy. No. F1-1517. San Francisco.
- Avichezer, D., Gilboa-Garber, N., Garber, N. C., & Katcoff, D. J. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin gene molecular analysis and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218(1), 11–20.

B

- Bachhawat-Sikder, K., Thomas, C. J., & Surolia, A. (2001). Thermodynamic analysis of the binding of galactose and poly-N-acetyllactosamine derivatives to human galectin-3. *FEBS Letters*, 500(1-2), 75–9.

- Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E., & Tillequin, F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 403–412.
- Bagos, P. G., Nikolaou, E. P., Liakopoulos, T. D., & Tsirigos, K. D. (2010). Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(22), 2811–7.
- Bagos, P. G., Tsirigos, K. D., Liakopoulos, T. D., & Hamodrakas, S. J. (2008). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-positive bacteria with a Hidden Markov Model. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5082–93.
- Baik, S.-C., Kim, K.-M., Song, S.-M., Kim, D.-S., Jun, J.-S., Lee, S.-G., ... Rhee, K.-H. (2004). Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 949–55.
- Balzarini, J. (2006). Large-molecular-weight carbohydrate-binding agents as HIV entry inhibitors targeting glycoprotein gp120. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 1(5), 355–60.
- Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W., & De Clercq, E. (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication. *Antiviral Research*, 18(2), 191–207.
- Balzarini, J., Schols, D., Neyts, J., Van Damme, E., Peumans, W., & De Clercq, E. (1991). Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(3), 410–6.
- Bauman, S. J., & Kuehn, M. J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes and Infection*, 8(9-10), 2400–2408.
- Benmebarek, A., Zerizer, S., Laggoune, S., & Kabouche, Z. (2013). Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 9(1), 2.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Berger, E. A. (1973). Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(5), 1514–8.
- Berger, E. A., & Heppel, L. A. (1974). Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(24), 7747–55.
- Berntsson, R. P.-A., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., & Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Letters*, 584(12), 2606–17.

- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16): 4725–4733
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., ... McEver, R. (1991). Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67(2), 233.
- Bewley, C. A. (2001). Solution structure of a cyanovirin-N:Man alpha 1-2Man alpha complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120. *Structure (London, England : 1993)*, 9(10), 931–40.
- Bewley, C. A., Cai, M., Ray, S., Ghirlando, R., Yamaguchi, M., & Muramoto, K. (2004). New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. *Journal of Molecular Biology*, 339(4), 901–14.
- Biagini, M., Garibaldi, M., Aprea, S., Pezzicoli, A., Doro, F., Becherelli, M., ... Norais, N. (2015). The Human Pathogen *Streptococcus pyogenes* Releases Lipoproteins as Lipoprotein-rich Membrane Vesicles. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 14(8), 2138–49.
- Biozzi, G., Benacerraf, B., & Halpern, B. N. (1953). Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected; relationship between the weight of the organs and their activity. *British Journal of Experimental Pathology*, 34(4), 441–57.
- Bokesch, H. R., O'Keefe, B. R., McKee, T. C., Pannell, L. K., Patterson, G. M. L., Gardella, R. S., ... Boyd, M. R. (2003). A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. *Biochemistry*, 42(9), 2578–84.
- Botos, I., & Wlodawer, A. (2005). Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(2), 233–82.
- Bottero, D., Gaillard, M. E., Basile, L. A., Fritz, M., & Hozbor, D. F. (2012). Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1266–76.
- Bouras, N. (2005). *Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Bourne, Y., Rouge, P., & Cambillau, C. (1990). X-ray structure of a (alpha-Man(1-3)beta-Man(1-4)GlcNAc)-lectin complex at 2.1-Å resolution. The role of water in sugar-lectin interaction. *J. Biol. Chem.*, 265(30), 18161–18165.
- 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), 1000–9.

- Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O'Keefe, B. R., Mori, T., ... Henderson, L. E. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1521–30.
- Boyd, W. C., & Shapleigh, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science (New York, N.Y.)*, 119(3091), 419.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., & Zotchev, S. B. (2008). Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. *Marine Drugs*, 6(1), 12–24.
- Brown, L., Kessler, A., Cabezas-Sanchez, P., Luque-Garcia, J. L., & Casadevall, A. (2014). Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Molecular Microbiology*, 93(1), 183–98.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(10), 620–30.
- Bulina, T. I., Terekhova, L. P., & Tiurin, M. V. (1998). Use of electrical impulses for selective isolation of actinomycetes from soil. *Mikrobiologiya*, 67(4), 556–60.
- Burman, N. P. (1973). The occurrence and significance of actinomycetes in water supply. In Sykes and Skinner (Ed.), *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance* (Academic P, pp. 219–230). London.
- Bush, C. A., Martin-Pastor, M., & Imberty, A. (1999). Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 269–93.

C

- Cardoso, K., Gandra, R. F., Wisniewski, E. S., Osaku, C. A., Kadowaki, M. K., Felipach-Neto, V., ... Simão, R. D. C. G. (2010). DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*, 59(9), 1061–1068.
- Carrasco, S. E., Yang, Y., Troxell, B., Yang, X., Pal, U., & Yang, X. F. (2015). *Borrelia burgdorferi* elongation factor EF-Tu is an immunogenic protein during Lyme borreliosis. *Emerging Microbes & Infections*, 4(9), 54.
- Castiglione, F., Lazzarini, A., Carrano, L., Corti, E., Ciciliato, I., Gastaldo, L., ... Parenti, F. (2008). Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens. *Chemistry & Biology*, 15(1), 22–31.

- Cattoir, V., & Daurel, C. (2010). Quelles nouveautés en antibiothérapie? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 40, 135–154.
- Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters*, 555(1), 102–105.
- Charan, R. D., Munro, M. H., O’Keefe, B. R., Sowder RCII, McKee, T. C., Currens, M. J., ... Boyd, M. R. (2000). Isolation and characterization of *Myrianthus holstii* lectin, a potent HIV-1 inhibitory protein from the plant *Myrianthus holstii*(1). *Journal of Natural Products*, 63(8), 1170–4.
- Charland, N., Kellens, J. T., Caya, F., & Gottschalk, M. (1995). Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2220–1.
- Charungchitrak, S., Petsom, A., Sangvanich, P., & Karnchanatat, A. (2011). Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chemistry*, 126(3), 1025–1032.
- Chatterjee, S. N., & Chaudhuri, K. (2012). *Outer Membrane Vesicles of Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chen, W., Honma, K., Sharma, A., & Kuramitsu, H. K. (2006). A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 264(1), 15–21.
- Chernov, V. M., Mouzykantov, A. A., Baranova, N. B., Medvedeva, E. S., Grygorieva, T. Y., Trushin, M. V, ... Chernova, O. A. (2014). Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins. *Journal of Proteomics*, 110, 117–28.
- Chiba, H., Inokoshi, J., Nakashima, H., Omura, S., & Tanaka, H. (2004). Actinohivin, a novel anti-human immunodeficiency virus protein from an actinomycete, inhibits viral entry to cells by binding high-mannose type sugar chains of gp120. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), 203–10.
- Chiba, H., Inokoshi, J., Okamoto, M., Asanuma, S., Matsuzaki Ki, Iwama, M., ... Omura, S. (2001). Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(2), 595–601.
- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K., & Gho, Y. S. (2014). Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews*, 34(4), 474–90.
- Choi, K. I., Cha, J. H., Pae, A. N., Cho, Y. S., Chang, M. H., & Koh, H. Y. (1998). Studies on novel 3-isoxazolylvinyl-cephalosporins: I. Synthesis and biological activity of 7-[2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(alkoxy)-iminoacetamido] derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 51(12), 1117–21.
- Chun, J., Youn, H. D., Yim, Y. I., Lee, H., Kim, M. Y., Hah, Y. C., & Kang, S. O. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 492–498.

- Cioci, G. (2006). Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Thèse de l'université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Collins, M. D., Faulkner, M., & Keddie, R. M. (1984). Menaquinone Composition of Some Sporeforming Actinomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(1), 20–29.
- Conn, V. M., & Franco, C. M. M. (2004). Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1787–94.
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5603–8.
- Costerton, J. W., Ingram, J. M., & Cheng, K. J. (1974). Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38(1), 87–110.
- Couch, J. N. (1950). Actinoplanes, a new genus of the Actinomycetales. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 66, 87–92.
- Cross, T. (1981a). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *The Journal of Applied Bacteriology*, 50(3), 397–423.
- Cross, T. (1981b). The monosporic actinomycetes. In Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (Ed.), *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* (Springer, pp. 2091–2102). New York.
- Cross, T., & Attwell, R. W. (1974). Recovery of viable thermoactinomycete endospores from deep mud cores. In Barker, Gould and Wolf (Ed.), *Spore Research 1973* (Academic P, pp. 11–20). London.
- Czapla, T. H., & Lang, B. A. (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology (USA)*.

D

- Dam, T. K., & Brewer, C. F. (2002). Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical Reviews*, 102(2), 387–429.
- De Los Rios, P., Ben-Zvi, A., Slutsky, O., Azem, A., & Goloubinoff, P. (2006). Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6166–6171.
- Devos, S., Van Oudenhove, L., Stremersch, S., Van Putte, W., De Rycke, R., Van Driessche, G., ... Devreese, B. (2015). The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 298.

- Dong, C.-H., Yang, S.-T., Yang, Z.-A., Zhang, L., & Gui, J.-F. (2004). A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*, 265(2), 341–54.
- Donnelly, E. H., & Goldstein, I. J. (1970). Glutaraldehyde-insolubilized concanavalin A: an adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins. *The Biochemical Journal*, 118(4), 679–80.
- Dorward, D. W., & Garon, C. F. (1990). DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1960–1962.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(20), 9557–60.
- Drickamer, K. (1996). Ca(2+)-dependent sugar recognition by animal lectins. *Biochemical Society Transactions*, 24(1), 146–50.
- Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., & Adlouni, A. (2006). Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Investigation*, 24(6), 588–92.
- Dutson, T. R., Pearson, A. M., Price, J. F., Spink, G. C., & Tarrant, P. J. (1971). Observations by electron microscopy on pig muscle inoculated and incubated with *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology*, 22(6), 1152–1158.

E

- Eddy, J. L., Giolda, L. M., Caulfield, A. J., Rangel, S. M., & Lathem, W. W. (2014). Production of Outer Membrane Vesicles by the Plague Pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS ONE*, 9(9), e107002.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(5), 347–57.
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(1), 81–94.
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.*, 32, 185–219.
- Erikson, D. (1941). Studies on Some Lake-Mud Strains of *Micromonospora*. *Journal of Bacteriology*, 41(3), 277–300.
- Erukainure, O. L., Ajiboye, J. A., Adejobi, R. O., Okafor, O. Y., & Adenekan, S. O. (2011). Protective effect of pineapple (*Ananas cosmosus*) peel extract on alcohol-induced oxidative stress in brain tissues of male albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1(1), 5–9.

Euzeby, J. (2016). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Retrieved from <http://www.bacterio.cict.fr/m/micromonospora.html>

F

Fang, C.-T., Chen, H.-C., Chuang, Y.-P., Chang, S.-C., & Wang, J.-T. (2002). Cloning of a Cation Efflux Pump Gene Associated with Chlorhexidine Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 2024–2028.

Fang, J., & Wei, Y. (2011). Expression, purification and characterization of the *Escherichia coli* integral membrane protein YajC. *Protein and Peptide Letters*, 18(6), 601–8.

Fang, J., Zhang, X., Cai, Y., & Wei, Y. (2011). Small globular protein motif forms particulate hydrogel under various pH conditions. *Biomacromolecules*, 12(5), 1578–84.

Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H. P., & Sadee, W. (1999). The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS pharmSci*, 1(2), E2.

Fenical, W. (2006). Marine Pharmaceuticals: Past, Present, and Future. *Oceanography*, 19, 110–119.

Fulsundar, S., Kulkarni, H. M., Jagannadham, M. V, Nair, R., Keerthi, S., Sant, P., ... Chopade, B. A. (2015). Molecular characterization of outer membrane vesicles released from *Acinetobacter radioresistens* and their potential roles in pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, 83-84, 12–22.

G

Galatenko, O. A., & Terekhova, L. P. (1990). Isolation of antibiotic-producing Actinomycetes from soil samples exposed to UV light. *Antibiot Khimioter*, 35(11), 6–8.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology (2thEd)*. (Release 5.0, Ed.) (Springer-V). New York.

Gauthier, E. (2006). *Les antibiotiques : l'envers du miracle*. (L'Aquicole). Paris.

Georghiou, P. R., & Blacklock, Z. M. (1992). Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. *The Medical Journal of Australia*, 156(10), 692–7.

Gilboa-Garber, H. (1986). Lectins of *Pseudomonas aeruginosa*. Properties, effects and applications. In Mirelman D. (Ed.), *Microbial Lectins and Agglutinins. Properties and Biological Activity* (pp. 255–269). New York: John Wiley & Sons.

Gilboa-Garber, N. (1972). Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives. *FEBS Letters*, 20(2), 242–244.

- Gilboa-Garber, N. (1982). *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods in Enzymology*, 83, 378–85.
- Gilboa-Garber, N. (1983). The biological functions of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Lectins*, 3, 495–502.
- Gilboa-Garber, N., Avichezer, D., & Garber, N. C. (1997). *Glycosciences: Status and Perspectives*. (H. J. Gabius & S. Gabius, Eds.) (Chapman an). Weinheim.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J. P., Dudler, R., & Hofnung, M. (1988). Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *The EMBO Journal*, 7(12), 3971–4.
- Gokhale, A. B., Damre, A. S., & Saraf, M. N. (2003). Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyrea speciosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(1), 109–14.
- Goldstein, I. J., & Poretz, R. (1986). Isolation, physicochemical characterization, and carbohydratebinding specificity of lectins. In *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine* (pp. 33–248).
- Gonin, S., Arnoux, P., Pierru, B., Lavergne, J., Alonso, B., Sabaty, M., & Pignol, D. (2007). Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. *BMC Structural Biology*, 7, 11.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 401–15.
- Goodfellow, M., & Haynes, J. A. (1984). Actinomycetes in marine sediments. In Ortiz-Ortiz, Bojalil and Yakoleff (Ed.), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes* (Academic P, pp. 453–472). Orlando.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.
- Gottlieb, D. (1973). General consideration and implication of the actinomycetales. In Sykes and kinner (Ed.), *Actinomycetales characteristics and practical importance* (Academic p, pp. 512–516). London, New York.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., & Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, 183(1), 9–18.
- Grenier, D., & Mayrand, D. (1987). Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity*, 55(1), 111–7.
- Grootenhuis, P. D. J., & Van Boeckel, C. A. A. (1991). Constructing a molecular model of the interaction between antithrombin III and a potent heparin analog. *Journal of the American Chemical Society*, 113(7), 2743–2747.

- Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I., & Stackebrandt, E. (1999). *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp. nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 4, 1733–40.
- Guillot, J., Guerry, M., Kanska, G., Caldefieû• Chezet, F., Latour, M. de, & Penault-Llorca, F. (2004). Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation : cas des carcinomes mammaires. *Bulletin Du Cancer*, 91(2), 141–158.
- Gustavsson, N., Diez, A., & Nyström, T. (2002). The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology*, 43(1), 107–17.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., ... Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 68(16), 2667–88.

H

- Haas, B., & Grenier, D. (2015). Isolation, Characterization and Biological Properties of Membrane Vesicles Produced by the Swine Pathogen *Streptococcus suis*. *PloS One*, 10(6), e0130528.
- Hamid, R., Masood, A., Wani, I., & Rafiq, S. (2013). Lectins: Proteins with Diverse Applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(4), 93–104.
- Hansen, J. E., Nielsen, C. M., Nielsen, C., Heegaard, P., Mathiesen, L. R., & Nielsen, J. O. (1989). Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. *AIDS (London, England)*, 3(10), 635–41.
- Hardisson, C., & Suarez, J. E. (1979). Fine Structure of Spore Formation and Germination in *Micromonospora chalcea*. *Journal of General Microbiology*, 110(1), 233–237.
- Harvey, D. ., Wing, D. ., Küster, B., & Wilson, I. B. . (2000). Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(6), 564–571.
- Hayakawa, M., Kajiura, T., & Nonomura, H. (1991). New methods for the highly selective isolation of Streptosporangium and Dactylosporangium from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(5), 327–333.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), 501–509.
- Hirabayashi, J. (2004). Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconjugate Journal*, 21(1-2), 35–40.

- Hirsch, A. M., & Valdés, M. (2010). Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 536–542.
- Hirsch, C. F., & Christensen, D. L. (1983). Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 925–9.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2004). Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(2), 166–74.
- Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Ed)* (Wilkins, W). USA.
- Hoorelbeke, B., Huskens, D., Ferir, G., Francois, K. O., Takahashi, A., Van Laethem, K., ... Balzarini, J. (2010). Actinohivin, a Broadly Neutralizing Prokaryotic Lectin, Inhibits HIV-1 Infection by Specifically Targeting High-Mannose-Type Glycans on the gp120 Envelope. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3287–3301.
- Horan, A. C. (1999). Secondary metabolite production, actinomycetes, other than Streptomyces. In Drew and Flickinge (Ed.), *Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Wiley, pp. 2333–2348). New York.
- Hsu, S. C., & Lockwood, J. L. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, 29(3), 422–6.
- Hunter, J. C., Eveleigh, D. E., & Casella, G. (1981). Actinomycetes of a salt march. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. I*(11), 195–200.

I

- 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), 525–34.
- Imberty, A., & Varrot, A. (2008). Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(5), 567–76.
- Inagaki, S., Onishi, S., Kuramitsu, H. K., & Sharma, A. (2006). *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by *Fannerella forsythia*". *Infection and Immunity*, 74(9), 5023–8.

J

- Jacob, N., Niladevi, K. N., Anisha, G. S., & Prema, P. (2008). Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research*, 163(5), 538–44.

- Jaffé, W. G., & Seidl, D. (1992). *Toxicology of plant lectins in Food Poisoning*. (M. Dekker, Ed.). New York.
- Jang, K.-S., Sweredoski, M. J., Graham, R. L. J., Hess, S., & Clemons, W. M. (2014). Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Proteomics*, *98*, 90–8.
- Jensen, H. L. (1930). The genus *Micromonospora* Ørskov, a little known group of soil microorganisms. *Proc. Linnean Soc.*, *55*, 231–248.
- Jensen, L. E., Hiney, M. P., Shields, D. C., Uhlar, C. M., Lindsay, A. J., & Whitehead, A. S. (1997). Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*(1), 384–92.
- Jensen, P. R., Dwight, R., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(4), 1102–8.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J., & Fenical, W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, *7*(7), 1039–48.
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, *8*(8), 1124–33.
- Ji, X., Chen, Y., Faro, J., Gewurz, H., Bremer, J., & Spear, G. T. (2006). Interaction of human immunodeficiency virus (HIV) glycans with lectins of the human immune system. *Current Protein & Peptide Science*, *7*(4), 317–24.
- Jiang, S.-Y., Ma, Z., & Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 79.
- Jiang, Y., Kong, Q., Roland, K. L., & Curtiss, R. (2014). Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, *304*(3-4), 431–43.
- Johnston, D. W., & Cross, T. (1976). The occurrence and distribution of actinomycetes in lakes of the English Lake District. *Freshwater Biology*, *6*(5), 457–463.
- Jones, K. L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology*, *57*(2), 141–5.

K

- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of Bacteriology*, *177*(14), 3998–4008.
- Kalakoutskii, L. V., & Agre, N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*, *40*(2), 469–524.

- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M., & Goldberg, A. L. (1994). Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23575–23582.
- Kasai, H., Tamura, T., & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 1, 127–34.
- Kataoka, M., Yamaoka, A., Kawasaki, K., Shigeri, Y., & Watanabe, K. (2014). Extraordinary denaturant tolerance of keratinolytic protease complex assemblies produced by *Meiothermus ruber* H328. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), 2973–80.
- Kawamoto, I. (1989). Genus *Micromonospora* Ørskov. In S. and H. Williams (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4 (Williams a, pp. 2442–2450). Baltimore.
- Kawamoto, I., Oka, T., & Nara, T. (1981). Cell wall composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *Journal of Bacteriology*, 146(2), 527–34.
- Kawamoto, I., Oka, T., & Nara, T. (1982). Spore resistance of *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora sagamiensis* and related organisms. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 221–231.
- Kawamoto, I., Yamamoto, M., & Nara, T. (1983). *Micromonospora olivasterospora* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(1), 107–112.
- Kawsar, S. M. A., Fujii, Y., Matsumoto, R., Ichikawa, T., Tateno, H., Hirabayashi, J., ... Ozeki, Y. (2008). Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a d-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(4), 349–357.
- Kelemen, G. H., Cundliffe, E., & Financsek, I. (1991). Cloning and characterization of gentamicin-resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene*, 98(1), 53–60.
- Kenyon, G. L., DeMarini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., ... Sheahan, L. C. (2002). Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 1(10), 763–80.
- Keyaerts, E., Vijgen, L., Pannecouque, C., Van Damme, E., Peumans, W., Egberink, H., ... Van Ranst, M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, 75(3), 179–87.
- Kijne, J. W., Bauchrowitz, M. A., & Diaz, C. L. (1997). Root Lectins and Rhizobia. *Plant Physiology*, 115(3), 869–873.
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., & Gho, Y. S. (2015). Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 97–104.
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res*, 170, 1–9.

- Kline, K. A., Dodson, K. W., Caparon, M. G., & Hultgren, S. J. (2010). A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends in Microbiology*, 18(5), 224–32.
- Koch, C., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1996). 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 765–8.
- Kocourek, J., & Horejsi, V. (1981). Defining a lectin. *Nature*, 290, 188.
- Kontchou, C. Y., & Blondeau, R. (1992). Biodegradation of soil humic acids by *Streptomyces viridosporus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(3), 203–8.
- Kostlánová, N., Mitchell, E. P., Lortat-Jacob, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gilboa-Garber, N., ... Imberty, A. (2005). The fucose-binding lectin from *Ralstonia solanacearum*. A new type of beta-propeller architecture formed by oligomerization and interacting with fucoside, fucosyllactose, and plant xyloglucan. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27839–49.
- Kou, X., Chen, Q., Ju, X., Liu, H., Chen, W., & Xue, Z. (2014). A tolerant lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei*, and its immunoregulatory function. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(11), 729–36.
- Kroppenstedt, R. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In Minnikin & Goodfellow (Eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (Academic P, pp. 173–199). London.
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., & Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* s. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(4), 328–39.
- Kulkarni, H. M., Swamy, C. V. B., & Jagannadham, M. V. (2014). Molecular Characterization and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas syringae* Suggest a Possible Response to Environmental Conditions. *Journal of Proteome Research*, 13(3), 1345–1358.
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64, 163–84.
- Kumada, K. (1987). *Chemistry of soil organic matter*. (J. S. S. P. Tokyo, Ed.) *Dev. Soil Sci* (Elsevier). Amsterdam.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., & Nyström, T. (2003). The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 140–5.

L

- Lacey, J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, 4, 113–121.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.
- Lakhtin, M., Lakhtin, V., & Alyoshkin, V. (2011). Lectin and enzyme relationships in microbiology. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 1(1), 9–14.
- Larpent, J. P., & Sanglier, J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques* (Masson). Paris.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 78(3-4), 399–405.
- Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1970). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In Prauser (Ed.), *The Actinomycetales* (Gustav Fis, pp. 395–405). Jena.
- Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1981). The procaryotes. In Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel (Ed.), *The procaryotes* (Springer-V, pp. 1915–1922). Berlin.
- Lechevalier, M. P., De Bievre, C., & Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(4), 249–260.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel (Ed.), *The procaryotes* (Springer-V, pp. 1915–1922). Berlin.
- Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev*, 27(6), 535–555.
- Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., ... Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425–5436.
- Lee, J. H., Choi, C.-W., Lee, T., Kim, S. Il, Lee, J.-C., & Shin, J.-H. (2013). Transcription factor σ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PloS One*, 8(8), e73196.
- Lee, Y. C., & Lee, R. T. (1995). Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research*, 28(8), 321–327.
- Leon-Kempis, M. del R., Guccione, E., Mulholland, F., Williamson, M. P., & Kelly, D. J. (2006). The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1262–75.

- Li, Z.-T., Zhang, R.-L., Bi, X.-G., Xu, L., Fan, M., Xie, D., ... Zhang, K.-X. (2015). Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. *Microbial Pathogenesis*, *81*, 46–52.
- Lin, F., Marchenko, G., & Cheng, Y. R. (1994). Cloning and sequencing of an endo-beta-1,4-glucanase gene *mcenA* from *Micromonospora cellulolyticum* 86W-16. *Journal of Industrial Microbiology*, *13*(6), 344–50.
- Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, *98*(2), 637–674.
- Liu, Y. Z., Cao, Y. G., Ye, J. Q., Wang, W. G., Song, K. J., Wang, X. L., ... Deng, X. M. (2010). Immunomodulatory effects of proanthocyanidin A-1 derived in vitro from *Rhododendron spiciferum*. *Fitoterapia*, *81*(2), 108–14.
- Locci, R., & Sharples, G. P. (1984). Morphology. In S. T. Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams (Ed.), *Biology of Actinomycetes* (pp. 165–199).
- Lombardi, P., & Crisanti, A. (1997). Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacology & Therapeutics*, *76*(1-3), 125–33.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., & Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1383*(1), 9–36.
- Loris, R., Stas, P., & Wyns, L. (1994). Conserved waters in legume lectin crystal structures. The importance of bound water for the sequence-structure relationship within the legume lectin family. *J. Biol. Chem.*, *269*(43), 26722–26733.
- Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K.-E., & Wyns, L. (2003). Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, *331*(4), 861–70.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Bruce, D., Goodwin, L., ... Woyke, T. (2010). Complete sequence of *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/37957>
- Lutsik, M. D., Panasyuk, V. M., & Lutsik, A. D. (1981). *Lektiny (Lectins)* (Vishcha Sh). Lvov.

M

- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M., & Sherman, D. H. (2004). Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7520–9.
- Mäki-Arvela, P., Salmi, T., Holmbom, B., Willför, S., & Murzin, D. Y. (2011). Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses--a review. *Chemical Reviews*, *111*(9), 5638–66.
- Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Korduláková, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., ... Cole, S. T. (2007). Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathogens*, *3*(5), 0582–0594.

- Mashburn-Warren, L. M., & Whiteley, M. (2006). Special delivery: Vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 61(4):839-46.
- Matsui, I., & Oishi, K. (1986). Carbohydrate-binding properties of L-fucose, D-mannose-specific lectin (SFL 100-2) particles produced by *Streptomyces* sp. *Journal of Biochemistry*, 100(1), 115–21.
- Matsui, I., Oishi, K., Kanaya, K., & Baba, N. (1985). The morphology of L-fucose, D-mannose specific lectin (SFL 100-2) produced by *Streptomyces* No. 100-2. *Journal of Biochemistry*, 97(2), 399–408.
- Merritt, E. A., & Hol, W. G. (1995). AB5 toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(2), 165–71.
- Mier, J. W., & Gallo, R. C. (1982). The purification and properties of human T cell growth factor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 128(3), 1122–7.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal Death during Colony Development in *Streptomyces antibioticus* : Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 515–525.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (2000). Streptomycetes: a new model to study cell death. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3(3), 153–8.
- Miguélez, E. M., Martín, C., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1993). Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: tool for the analysis of hyphal growth in liquid cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 109(2-3), 123–9.
- Miguet, L. (2006). *Nouvelles méthodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse: application à la recherche de biomarqueurs dans le cadre des leucémies*. These de l'université Louis Pasteur.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5005–5011.
- Misono, K. S. (2002). Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 230(1-2), 49–60.
- Mizuochi, T., Spellman, M. W., Larkin, M., Solomon, J., Basa, L. J., & Feizi, T. (1988). Structural characterization by chromatographic profiling of the oligosaccharides of human immunodeficiency virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese hamster ovary cells. *Biomedical Chromatography : BMC*, 2(6), 260–70.
- Møller, J. D., Barnes, A. C., Dalsgaard, I., & Ellis, A. E. (2005). Characterisation of surface blebbing and membrane vesicles produced by *Flavobacterium psychrophilum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(3), 201–9.

- Molloy, M. P., Phadke, N. D., Maddock, J. R., & Andrews, P. C. (2001). Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis*, 22(9), 1686–96.
- Monnet, V. (2003). Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 60(10), 2100–14.
- Moreira, K. A., Albuquerque, B. F., Teixeira, M. F. S., Porto, A. L. F., & Lima, J. L. (2002). Application of protease from *Nocardiopsis* sp as a laundry detergent additive. *World J Microbiol Biotechnol*, 18(4), 307–312.
- Mori, T., O’Keefe, B. R., Sowder, R. C., Bringans, S., Gardella, R., Berg, S., ... Boyd, M. R. (2005). Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9345–53.
- Mourez, M., Jéhanno, M., Hofnung, M., & Dassa, E. (2012). Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *médecine/sciences*, 16(3), 386.
- Mukherjee, D., Khatua, T. N., Venkatesh, P., Saha, B. P., & Mukherjee, P. K. (2010). Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 490–4.
- Mulligan, C., Geertsma, E. R., Severi, E., Kelly, D. J., Poolman, B., & Thomas, G. H. (2009). The substrate-binding protein imposes directionality on an electrochemical sodium gradient-driven TRAP transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1778–83.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., & Tenover, R. H. (1999). *Manual of Clinical Microbiology (7th ed.)* (ASM). Washington.

N

- Naeem, A., Ahmad, E., & Khan, R. H. (2007). An alternate high yielding purification method for *Clitoria ternatea* lectin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(4), 481–6.
- Nagre, N. N., Chachadi, V. B., Eligar, S. M., Shubhada, C., Pujari, R., Shastry, P., ... Inamdar, S. R. (2010). Purification and Characterization of a Mitogenic Lectin from *Cephalosporium*, a Pathogenic Fungus Causing Mycotic Keratitis. *Biochemistry Research International*, 2010, 1–6.
- 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 : JMR*, 25(11), 527–41.
- Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., ... Hughson, F. M. (2006). Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing. *Cell*, 126(6), 1095–1108.

- Neu, H. C., & Heppel, L. A. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(9), 3685–92.
- Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., ... Capitani, G. (2005). Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *The EMBO Journal*, 24(12), 2075–86.
- Noah, C. E., Malik, M., Bublitz, D. C., Camenares, D., Sellati, T. J., Benach, J. L., & Furie, M. B. (2010). GroEL and lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain synergistically activate human macrophages. *Infection and Immunity*, 78(4), 1797–1806.
- Nonomura, H., & Ohara, Y. (1969). Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation of Microbispora and Streptosporangium in soil. *J. Ferment. Technol*, 47, 463–469.
- Nudo, L. P., & Catap, E. S. (2011). Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 613–20.
- Nunes, E. dos S., de Souza, M. A. A., Vaz, A. F. de M., Santana, G. M. de S., Gomes, F. S., Coelho, L. C. B. B., ... Correia, M. T. dos S. (2011). Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 159(1), 57–63.
- Nunes, E. S., Souza, M. A. A., Vaz, A. F. M., Silva, T. G., Aguiar, J. S., Batista, A. M., ... Correia, M. T. S. (2012). Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 59(7-8), 667–71.
- Nyström, T., & Neidhardt, F. C. (1994). Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 11(3), 537–44.

O

- O'Keefe, B. R., Beutler, J. A., Cardellina, J. H., Gulakowski, R. J., Krepps, B. L., McMahon, J. B., ... Boyd, M. R. (1997). Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 245(1), 47–53.
- Oestergaard, P. R., & Sjoeholm, C. (2001). Use of acid-stable proteases in animal feed. *PCT Int. Appl*, 49.
- Okami, Y., & Okazaki, T. (1978). Actinomycetes in marine environments. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 6*, 145–152.

- Olaya-Abril, A., Prados-Rosales, R., McConnell, M. J., Martín-Peña, R., González-Reyes, J. A., Jiménez-Munguía, I., ... Rodríguez-Ortega, M. J. (2014). Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteomics*, *106*, 46–60.
- Olson, J. B., Harmody, D. K., Bej, A. K., & McCarthy, P. J. (2007). *Tsukamurella spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deep-water marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(7), 1478–1481.
- Ottinger, C. A., Johnson, S. C., Ewart, K. V., Brown, L. L., & Ross, N. W. (1999). Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, *123*(1), 53–9.
- Ottow, J. C., & Glathe, H. (1968). Rose bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Applied Microbiology*, *16*(1), 170–1.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., ... Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(25), 13766–71.
- P**
- Palleroni, N. J. (1980). A chemotactic method for the isolation of Actinoplanaceae. *Archives of Microbiology*, *128*(1), 53–55.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., & Lan, C. Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(1), 1–13.
- Patterson, S. D., & Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, *33* Suppl, 311–23.
- Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D. S. P., Prakash, A., Medhi, B., & Das, B. K. (2010). Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, *17*(1), 21.
- Perry, D. A., Tone, J., & Maeda, H. (1990). Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). *Brit. UK Pat. Appl*, 28.
- Phillips, J. W., Goetz, M. A., Smith, S. K., Zink, D. L., Polishook, J., Onishi, R., ... Singh, S. B. (2011). Discovery of kibdelomycin, a potent new class of bacterial type II topoisomerase inhibitor by chemical-genetic profiling in *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology*, *18*(8), 955–65.
- Podgorskii, V. S., Kovalenko, E. A., Karpova, I. S., Sashchuk, E. V., & Get'man, E. I. (2014). Extracellular lectins from saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *50*(3), 228–234.

- Podgorskii, V. S., Kovalenko, E. A., & Simonenko, I. A. (1992). *Lektiny bakterii (Bacterial Lectins)* (Nauk. Dumk). Kiev.
- Post, D. M. B., Zhang, D., Eastvold, J. S., Teghanemt, A., Gibson, B. W., & Weiss, J. P. (2005). Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38383–38394.
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L. R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraraghavan, U., ... Casadevall, A. (2011). Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1471–83.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., & Dusart, J. (2003). *Microbiologie* (De Boeck U).
- Pusztai, A. (1991). *Plant lectins - Chemistry and pharmacology of natural products*. (GBR, Ed.) (Cambridge).

Q

- Quioco, F. A., & Ledvina, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Molecular Microbiology*, 20(1), 17–25.

R

- Rahbé, Y., & Febvay, G. (1993). Protein toxicity to aphids: an in vitro test on *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 67(2), 149–160.
- Raty, K., Kantola, J., Hautala, A., Hakala, J., Ylihonko, K., & Mintsy, P. (2002). Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*, 293(1-2), 115–122.
- Redenbach, M., Scheel, J., & Schmidt, U. (2000). Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 78(3-4), 227–235.
- Rivera, J., Cordero, R. J. B., Nakouzi, A. S., Frases, S., Nicola, A., & Casadevall, A. (2010). *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 19002–19007.
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67.

- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., ... Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, 6(1), 48–59.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., & Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 203(1), 173–9.
- Rüdiger, H. (1993). Purification of plant lectins. In H. J. G. Gabius (Ed.), *Lectins and Glycobiology* (Springer, pp. 31–46). Berlin.
- Rüdiger, H., & Gabius, H. J. (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589–613.

S

- Sá, R. A., Santos, N. D. de L., da Silva, C. S. B., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Cavada, B. S., ... Paiva, P. M. G. (2009). Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 149(3), 300–6.
- Sacchettini, J. C., Baum, L. G., & Brewer, C. F. (2001). Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*, 40(10), 3009–15.
- Sato, Y., Morimoto, K., Hirayama, M., & Hori, K. (2011). High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(2), 291–6.
- Saunders, N. B., Shoemaker, D. R., Brandt, B. L., Moran, E. E., Larsen, T., & Zollinger, W. D. (1999). Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infection and Immunity*, 67(1), 113–9.
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5945–57.
- Schreiber, K., Boes, N., Eschbach, M., Jaensch, L., Wehland, J., Bjarnsholt, T., ... Schobert, M. (2006). Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 659–68.
- Schrempf, H., Koebisch, I., Walter, S., Engelhardt, H., & Meschke, H. (2011). Extracellular *Streptomyces* vesicles: Amphorae for survival and defence. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 286–299.
- Schrempf, H., & Merling, P. (2015). Extracellular *Streptomyces lividans* vesicles: composition, biogenesis and antimicrobial activity. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 644–58.

- Seong, C. N., Choi, J. H., & Baik, K. (2001). An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *Journal of Microbiology*, 39(1), 17–23.
- Sharon, N. (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 408, 1–8.
- Sharon, N. (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753–64.
- Sharon, N., & Lis, H. (2003). *Lectins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11):53-62.
- Sharon, N., & Ofek, I. (2000). Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconjugate Journal*, 17(7-9), 659–664.
- Shenoy, S. R., Barrientos, L. G., Ratner, D. M., O'Keefe, B. R., Seeberger, P. H., Gronenborn, A. M., & Boyd, M. R. (2002). Multisite and multivalent binding between cyanovirin-N and branched oligomannosides: calorimetric and NMR characterization. *Chemistry & Biology*, 9(10), 1109–18.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1976). Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomy criteria. In T. Arai (Ed.), *Actinomycetes the boundary microorganisms* (pp. 9–42). Tokyo.
- Shukle, R. H., & Murdock, L. L. (1983). Lipoxygenase Trypsin Inhibitor, and Lectin from Soybeans: Effects on Larval Growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology*, 12(3), 787–791.
- Sidiq, T., Khajuria, A., Suden, P., Sharma, R., Singh, S., Suri, K. A., ... Johri, R. K. (2011). Possible role of macrophages induced by an irridoid glycoside (RLJ-NE-299A) in host defense mechanism. *International Immunopharmacology*, 11(1), 128–35.
- Singh, J., Ahluwalia, J., Kamboj, S. S., & Singh, S. (1993). Occurrence and characterization of lectins in actinomycetes. *Journal of Basic Microbiology*, 33(3), 207–11.
- 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, R. S., & Walia, A. K. (2014). Microbial lectins and their prospective mitogenic potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(4), 329–47.
- Singh, S., C P S, Y., & 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), 433–7.
- Singhal, M., & Ratra, P. (2013). Investigation of Immunomodulatory Potential of Methanolic and Hexane Extract of *Musa acuminata* Peel (Plantain) Extracts. *Global J Pharmacol*, 1, 69–74.

- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., ... Breakefield, X. O. (2008). *Glioblastoma* microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, *10*(12), 1470–6.
- Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A., & Donadio, S. (2000). Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. *Molecular and General Genetics MGG*, *264*(3), 213–221.
- Soto, G. E., & Hultgren, S. J. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, *181*(4), 1059–71.
- Sova, O. (1985). Autofocusing — a method for isoelectric focusing without carrier ampholytes. *Journal of Chromatography A*, *320*(1), 15–22.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actino bacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology*, *47*(2), 479–491.
- Sturr, M. G., Ablooglu, A. J., & Krulwich, T. A. (1997). A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cations. *Gene*, *188*(1), 91–94.
- Suarez, J. E., Barbes, C., & Hardisson, C. (1980). Germination of spores of *Micromonospora chalcea*: physiological and biochemical changes. *Journal of General Microbiology*, *121*(1), 159–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166728>
- Suzuki, S., Takahashi, K., Okuda, T., & Komatsubara, S. (1998). Selective isolation of *Actinobispora* on gellan gum plates. *Canadian Journal of Microbiology*, *44*(1), 1–5.
- Szvoboda, G., Lang, T., Gado, I., Ambrus, G., Kari, C., Fodor, K., & Alfoldi, L. (1980). Fusion of *Micromonospora protoplasts*. In Ferenczy and Farkas (Ed.), *Advances in Protoplast Research* (Pergamon P, pp. 235–240). Oxford, UK.

T

- Taechowisan, T., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(4), 381–385.
- Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., ... Kobata, A. (1975). Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo-beta-N-acetylglucosaminidase specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, *250*(21), 8569–75.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., ... Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*, *13*(7), 933–40.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., ... Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(1), 10–4.

- Takizawa, M., Colwell, R. R., & Hill, R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 997–1002.
- Tam, R., & Saier, M. H. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiological Reviews*, 57(2), 320–46.
- Tanaka, H., Chiba, H., Inokoshi, J., Kuno, A., Sugai, T., Takahashi, A., ... Omura, S. (2009). Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15633–8.
- Tasumi, S., Yang, W.-J., Usami, T., Tsutsui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., ... Suzuki, Y. (2004). Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(4), 325–35.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33–6.
- Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2012). *Corynebacterium glutamicum* Zur acts as a zinc-sensing transcriptional repressor of both zinc-inducible and zinc-repressible genes involved in zinc homeostasis. *FEBS Journal*, 279(23), 4385–4397.
- Thanawastien, A., Montor, W. R., LaBaer, J., Mekalanos, J. J., & Yoon, S. S. (2009). *Vibrio cholerae* Proteome-Wide Screen for Immunostimulatory Proteins Identifies Phosphatidylserine Decarboxylase as a Novel Toll-Like Receptor 4 Agonist. *PLoS Pathogens*, 5(8), e1000556.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., & Kudo, T. (2004). *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand. *Actinomycetologica*, 18(1), 8–14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., & Kudo, T. (2005). *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4), 229–234.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. I., & Kudo, T. (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 417–422.
- Thompson, S. S., Naidu, Y. M., & Pestka, J. J. (1985). Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidase-antiperoxidase reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 1038–1042.
- Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 108–32.
- Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 256–94.
- Tomita, K., Hoshino, Y., Ohkusa, N., Tsuno, T., & Miyaki, T. (1992). *Micromonospora chersina* sp. nov. *Actinomycetologica*, 6(1), 21–28.

- Tompa, P., Dosztányi, Z., & Simon, I. (2006). Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *Journal of Proteome Research*, 5(8), 1996–2000.
- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostàlovà, Z., Sanz, L., & Calvete, J. J. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30(4-5), 217–24.
- Trujillo, M. E., Fernández-Molinero, C., Velázquez, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2005). *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 2), 877–80.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P., & Martínez-Molina, E. (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 12), 2799–804.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L., & Martínez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 10), 2381–5.
- Tsugawa, H., Ito, H., Ohshima, M., & Okawa, Y. (2007). Cell adherence-promoted activity of *Plesiomonas shigelloides* GroEL. *Journal of Medical Microbiology*, 56(1), 23–29.
- Tsvetkova, N. M., Horváth, I., Török, Z., Wolkers, W. F., Balogi, Z., Shigapova, N., ... Vigh, L. (2002). Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13504–13509.
- Tziveleka, L.-A., Vagias, C., & Roussis, V. (2003). Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(13), 1512–35.

U

- Utarabhand, P., Rittidach, W., & Paijit, N. (2007). Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *merguiensis*. *ScienceAsia*, 33, 41–46.

V

- Valdés, M., Pérez, N.-O., Estrada-de Los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J. J., Normand, P., & Hirsch, A. M. (2005). Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 460–6.
- Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Longo, L. V. G., Ganiko, L., Lopes, F. G., Matsuo, A. L., ... Puccia, R. (2012). Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PloS One*, 7(6), e39463.

- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Mazard, A.-M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., ... Peumans, W. J. (1999). Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *European Journal of Biochemistry*, 259(1-2), 135–142.
- Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., & Peumans, W. J. (2008). Plant Lectins. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 48, pp. 107–209).
- Van Keulen, G., Jonkers, H. M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., & Westen, H. A. B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1455–1458.
- Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., & Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183(2), 258–64.
- Vasilyeva, N. V., Tsfasman, I. M., Suzina, N. E., Stepnaya, O. A., & Kulaev, I. S. (2008). Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS Journal*, 275(15), 3827–3835.
- Vaughan, T. E., Skipp, P. J., O'Connor, C. D., Hudson, M. J., Vipond, R., Elmore, M. J., & Gorrington, A. R. (2006). Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. *Vaccine*, 24(25), 5277–5293.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... Kreft, J. (2001). *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584–640.
- Vemulapalli, R., Duncan, A. J., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., Toth, T. E., & Schurig, G. G. (1998). Cloning and sequencing of yajC and secD homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with B. abortus RB51. *Infection and Immunity*, 66(12), 5684–91.
- Vetlugina, L. A., Adiatova, Z. F., Khozhamuratova, S. S., Rymzhanova, Z. A., Trenozhnikova, L. P., & Kopytina, M. N. (1990). Isolation of Actinomycetales from the soil of Kazakhstan on selective media with antibiotics. *Antibiotiki I Khimioterapiia Antibiotics and Chemotherapy Sic Ministerstvo Meditsins o I Mi ro biologiches o Promyshlennosti SSSR*, 35(2), 3–5.
- Vidakovics, M. L. A. P., Jendholm, J., Mörgelin, M., Månsson, A., Larsson, C., Cardell, L.-O., & Riesbeck, K. (2010). B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000724.
- Vobis, G. (1992). The genus Actinoplanes and related genera. In Balows, Trüper, Dworkin, Harder and Schleifer (Ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*, 2nd edn, vol. 2 (pp. 1029–1060).
- Vyas, N. K. (1991). Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(5), 732–740.

W

- Wagman, G. H., & Weinstein, M. (1980). Antibiotic from *Micromonospora*. *Annu. Rev. Microbiol.*, *34*, 537–557.
- Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., ... Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, *115*(1), 25–35.
- Waksman, S. A. (1950). *The actinomycetes: their nature, occurrence, activities and importance*. (C. B. Company, Ed.) (Waltham). Mass.
- Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (pp. 609–614). New York, NY.
- Watanabe, M., Kinoshita, H., Nitta, M., Yukishita, R., Kawai, Y., Kimura, K., ... Saito, T. (2010). Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(3), 927–35.
- Watson, E. T., & Williams, S. T. (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biology and Biochemistry*, *6*(1), 43–52.
- Weyland, H. (1969). Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature*, *223*(5208), 858.
- Weyland, H. (1981). Distribution of actinomycetes on the sea floor. In *International Symposium on Actinomycete Biology 1979 : Cologne*.
- Wiley, D. C., & Skehel, J. J. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry*, *56*, 365–94.
- Wilkinson, A. J. (2002). *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. (B. Holland, K. Kuchler, S. P. Cole, & C. Higgins, Eds.) (Elsevier S). London.
- Wood, S. D. (1995). *Crystallographic Studies of Molecules of Biological and Chemical Interest*. Liverpool John Moores University, England.

X

- Xiong, A., & Jayaswal, R. K. (1998). Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *180*(16), 4024–9.
- Xu, L., Li, Q., & Jiang, C. (1996). Diversity of soil actinomycetes in yunnan, china. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 244–8.

Y

Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., ... Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(13), 1608–15.

Z

Zenova, G. M., Gracheva, T. A., & Likhacheva, A. A. (1994). Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in terrestrial ecosystems. *Microbiology*, 63, 313–317.

Zenova, G. M., Zakalyukina, Y. V., Selyanin, V. V., & Zvyagintsev, D. G. (2004). Isolation and growth of acidophilic soil actinomycetes from the *Micromonospora* genus. *Eurasian Soil Sci*, 37, 737–742.

Zerizer, H., Scolat, B. La, Raoult, D., Dalichaouche, M., & Boulahrouf, A. (2013). Isolation and polyphasic characterization of aerobic actinomycetes genera and species rarely encountered in clinical specimens. *African Journal of Microbiology Research*. 7(28), 3681-3689.

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), 259–65.

Zhi, X.-Y., Li, W.-J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 3), 589–608.

Zhigis, L. S., Ivanov, A. E., Rapoport, E. M., Kovalenko, E. A., Getman, E. I., & Zubov, V. P. (1993). Purification of sialic acid binding protein from saprophytic bacteria by hydrophobic-interaction chromatography on butyl-toyopearl and polymer-coated porous glass. *Biotechnology Techniques*, 7(9), 667–670.

Ziółkowska, N. E., & Włodawer, A. (2006). Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochimica Polonica*, 53(4), 617–26.

Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2005). Nocardiosis and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, 156(10), 984–93.

Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., ... Labeda, D. P. (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1377–1381.

ANNEXES

ANNEXE 1**Milieux de culture****Milieu ISP₂**

Extrait de levure4g
Extrait de malt10g
D-Glucose4g
Agar20g
Eau distillée 1000 ml
pH = 7,3
Stérilisation : 110°C – 30mn.

Milieu Bennett

Glucose.....10g
Extrait de levure.....1g
NZ amine (caséine digest).....2g
Extrait de viande de boeuf.....1g
Agar.....15g
Eau distillée.....1000ml
PH : 7,3
Stérilisation : 110°C – 30mn.

Milieu PMY

Glucose20g
Polypeptone4g
Extrait de levure1g
Extrait de viande4g
NaCl2.5g
pH : 7,0
Stérilisation : 110°C – 30mn.

Milieu Sabouraud

Glucose.....40g
Peptone.....10g
Agar.....15g
Eau distillée.....1000ml
PH : 7,0
Stérilisation : 110°C – 30mn.

Milieu Muller-Hinton

Extrait de viande.....2g
Hydrolysate acide de caséine.....17,5g
Amidon.....1,5g
Agar.....10g
Eau distillée.....1000ml
PH : 7,4 Stérilisation : 115°C -15mn.

ANNEXE 2

Tampons

Solution A : Tris [1M]	Solution B : HEPES [1M]	Solution C : NaCl [5M]
24.22g Tris dans 200mL H ₂ O, - ajuster le pH à 7.5 avec du HCl à 6N	47.66g HEPES dans 200mL H ₂ O, - ajuster le pH à 7.5 avec du HCl à 1N)	58.44g NaCl dans 200mL H ₂ O

Tampon Tris-HCl, pH 7.5 (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl)

Pour un volume de 1 litre : 20mL solution A+ 20mL solution C+ 960mL H₂O

Tampon HEPES, pH 7.2 (20mM HEPES, 150mM NaCl)

Pour un volume de 1 litre : 20mL solution B+ 20mL solution C+ 960mL H₂O

Tampon PBS 0.01 M

NaCl.....8.00 g.
KCl.....0.20 g.
Na₂HPO₄.....1.15 g.
KH₂PO₄.....0.20 g.
Eau distillée.....1000mL.
pH 7.2

ANNEXE 3

Préparation de la suspension d'hématies à 4% (v/v) pour le test d'hémagglutination

Les prélèvements de sang de rongeurs (lapin, rat et souris), et humains (ABO), ont été respectivement obtenues à partir de l'animalerie de l'université des frères Mentouri-Constantine, et du service d'hématologie-CHU de Constantine.

Les prélèvements sanguins sont soumis à une centrifugation de 800 x g pendant 10min. les surnageant sont ensuite jetés, et les culots d'hématies sont lavées 3 fois avec de l'eau physiologique. Une suspension de 4% d'hématies (v/v) est finalement préparée dans de l'eau physiologique. Cette suspension d'hématies peut être conservée jusqu'à 5 jours, à une température de 4°C.

ANNEXE 4

Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G-250.....100 mg.

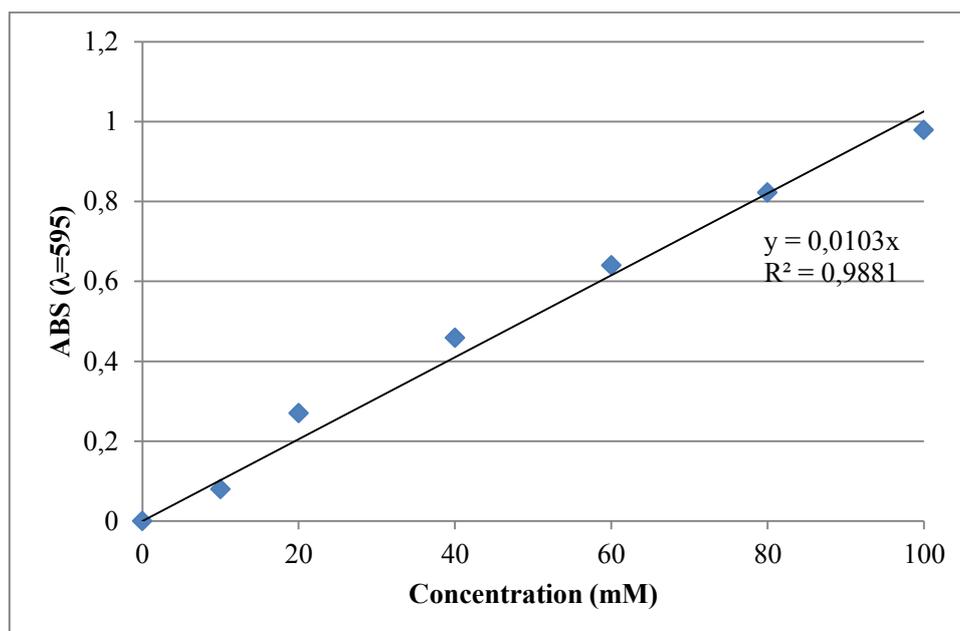
Ethanol absolu.....50 mL.

Acide phosphorique à 85%.....100 mL.

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

Elaboration de la courbe d'étalonnage

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



ANNEXE 5

Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
								0	31	62	95	129	164	201	239	279
									0	31	63	97	132	168	205	244
										0	32	65	99	134	171	209
											0	32	66	101	137	174
												0	33	67	103	139
													0	34	68	105
														0	34	70
															0	35
																0

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

ANNEXE 6

Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (Lammeli, 1970)

Tampon de séparation (pH 8.8)

Tris-HCl0.15M.
 SDS.....0.4g.
 Compléter à 100ml avec l'eau distillée.

Tampon de concentration (pH 6.8)

Tris-HCl0.05M.
 SDS.....0.4g.
 Compléter à 100ml avec l'eau distillée.

Gel de séparation (Running gel) à 15%

Acrylamide 30%2.5 mL.
 Tampon de séparation (pH 8.8).....1.3 mL.
 Eau distillée.....1.1 mL.
 APS 10 %50µL.
 SDS 10%.....50µL.
 TEMED.....2µL.
 Volume totale.....5mL.

Tampon d'échantillon (5X)

Tris-HCl pH 6.8.....2.5mL.
 SDS.....1g.
 Glycérol.....5mL.
 Bleu de bromophénol.....5mg.
 DTT.....772mg.
 Compléter à 10mL avec l'eau distillée.

Tampon de migration (10X)

Tris (base).....30g.
 Glycine.....144g.
 SDS.....10g.
 Compléter à 1000mL avec l'eau distillée.

La solution de coloration

Méthanol20mL.
 Acide acétique glaciale.....5mL.
 BBC R-2500.02g.
 Eau distillée.....50mL.

La solution de décoloration

Méthanol125mL.
 Acide acétique glaciale.....50mL.
 Eau distillée.....500mL.

ANNEXE 7 - Activité immunomodulatrice (Test de clairance de carbone)

Lots de Souris	Dose	N°	Poids (g)		Volume de lectines à injecter (mL/souris)	Volume d'ancre à injecter (mL/souris)	$\lambda = 675$		K	Poids humide (g)		
			Avant injection	Après injection			5 min	15min		Foie	Rate	Thymus
GI Bleu (Control)	0.5mL	1	28.9	28.1	/	0.281	0.188	0.158	0.017	1.135	1.265	0.030
		2	31.4	30.3	/	0.303	0.179	0.131	0.031	1.575	0.133	0.034
		3	28.0	27.4	/	0.274	0.097	0.091	0.006	1.882	0.139	0.031
		4	30.0	29.3	/	0.293	0.184	0.139	0.028	1.390	0.100	0.030
		5	31.1	30.8	/	0.308	0.109	0.086	0.023	1.523	0.156	0.030
		6	30.8	31.5	/	0.315	0.128	0.112	0.013	1.882	0.139	0.030
		7	28.1	27.6	/	0.276	0.129	0.116	0.010	1.403	0.133	0.031
GII Rouge	30mg/kg	1	28.3	27.6	0.283	0.283	0.152	0.093	0.049	1.488	0.058	0.014
		2	28.4	27.3	0.284	0.284	0.175	0.125	0.033	1.496	0.061	0.022
		3	30.6	29.4	0.306	0.306	0.155	0.103	0.040	1.512	0.075	0.037
		4	30.2	29.7	0.302	0.302	0.132	0.087	0.041	1.582	0.082	0.040
		5	32.4	31.0	0.324	0.324	0.358	0.160	0.080	1.460	0.089	0.033
		6	30.0	28.1	0.3	0.300	0.160	0.116	0.034	1.361	0.070	0.032
		7	31.2	29.7	0.312	0.312	0.289	0.205	0.034	1.337	0.063	0.033
GIII Vert	50mg/kg	1	28.2	29.5	0.282	0.282	0.196	0.084	0.084	1.546	0.127	0.032
		2	27.8	29.5	0.278	0.278	0.171	0.100	0.053	1.632	0.162	0.031
		3	27.9	29.6	0.279	0.279	0.214	0.127	0.052	1.472	0.146	0.030
		4	30.0	30.3	0.300	0.300	0.126	0.072	0.055	1.520	0.132	0.030
		5	30.4	32.5	0.304	0.304	0.101	0.060	0.052	1.606	0.122	0.020
		6	26.5	27.4	0.265	0.265	0.140	0.086	0.048	1.452	0.122	0.033
		7	28.5	30.1	0.285	0.285	0.141	0.099	0.035	1.541	0.136	0.022
GIV Noir	100mg/kg	1	33.2	31.8	0.332	0.332	0.282	0.086	0.118	1.635	0.120	0.040
		2	31.7	29.6	0.317	0.317	0.276	0.121	0.082	1.348	0.100	0.028
		3	31.4	29.2	0.314	0.314	0.242	0.099	0.089	1.608	0.093	0.027
		4	28.8	27.9	0.288	0.288	0.200	0.114	0.056	1.267	0.171	0.022
		5	32.0	31.4	0.320	0.320	0.158	0.074	0.075	1.559	0.097	0.016
		6	32.2	31.8	0.322	0.322	0.297	0.123	0.088	1.655	0.124	0.023
		7	31.3	30.6	0.313	0.313	0.259	0.121	0.076	1.780	0.102	0.023

ANNEXE 7- (suite)

Activité immunomodulatrice (Indice phagocytaire (K)/ Temps de demi-vie du carbone)

Groupes	Dose	Nombre de souris	Indice phagocytaire K	Moyenne (K)	Temps de demi-vie (t _{1/2} ,min)	Moyenne (t _{1/2} ,min)
GI (Control)	0.5ml	7	0.017 0.031 0.006 0.028 0.023 0.013 0.010	0,018±0.009	40.76 22.35 115.5 24.75 30.13 53.30 69.30	50.87±33.04
GII	30mg/kg	7	0.049 0.033 0.040 0.041 0.080 0.034 0.034	0.044±0.016*	14.14 21.00 17.32 16.90 8.66 20.38 20.38	16.96±4.41**
GIII	50mg/kg	7	0.084 0.053 0.052 0.055 0.052 0.048 0.035	0.054±0.014**	8.25 13.07 13.32 12.6 13.32 14.43 19.8	13.54±3.39**
GIV	100mg/kg	7	0.118 0.082 0.089 0.056 0.075 0.088 0.076	0.083±0.018**	5.87 8.45 7.78 12.37 9.24 7.87 9.11	8.67±1.98**

(n=7, *P<0.05, **P<0.01 en comparaison avec le groupe control)

ANNEXE 7 (suite) - Activité immunomodulatrice (Indice phagocytaire corrigé (α))

Groups	Dose	Nombre de souris	Poids Corporel (g)	Poids humide des organes (g)			Poids Corporel Poids (Foie+Rate)	Indice phagocytaire corrigé (α)	Moyenne (α)
				Foie	Rate	(Foie+Rate)			
GI (Control)	0.5ml	7	28.9	1.135	1.265	2,400	12,041	3,096	4.32±1.394
			31.4	1.575	0.133	1,708	18,384	5,775	
			28.0	1.882	0.139	2,021	13,854	2,517	
			30.0	1.390	0.100	1,490	20,134	6,113	
			31.1	1.523	0.156	1,679	18,522	5,267	
			30.8	1.882	0.139	2,021	15,239	3,583	
			28.1	1.403	0.133	1,536	18,294	3,941	
GII	30mg/kg	7	27.6	1.488	0.058	1,546	17,852	6,532	6.64±0.951**
			27.3	1.496	0.061	1,557	17,533	5,623	
			29.4	1.512	0.075	1,587	18,525	6,335	
			29.7	1.582	0.082	1,664	17,848	6,154	
			31.0	1.460	0.089	1,549	20,012	8,622	
			28.1	1.361	0.070	1,431	19,636	6,361	
			29.7	1.337	0.063	1,400	21,214	6,872	
GIII	50mg/kg	7	28.2	1.546	0.127	1,673	16,855	7,381	6.39±0.628**
			27.8	1.632	0.162	1,794	15,496	5,820	
			27.9	1.472	0.146	1,618	17,243	6,435	
			30.0	1.520	0.132	1,652	18,159	6,905	
			30.4	1.606	0.122	1,728	17,592	6,566	
			26.5	1.452	0.122	1,574	16,836	6,118	
			28.5	1.541	0.136	1,677	16,994	5,558	
GIV	100mg/kg	7	33.2	1.635	0.120	1,755	18,917	9,278	8.27±0.865**
			31.7	1.348	0.100	1,448	21,892	9,510	
			31.4	1.608	0.093	1,701	18,459	8,241	
			28.8	1.267	0.171	1,438	20,027	7,662	
			32.0	1.559	0.097	1,656	19,323	8,148	
			32.2	1.655	0.124	1,779	18,100	8,050	
			31.3	1.780	0.102	1,882	16,631	7,044	

(n=7, *P<0.05, **P<0.01 en comparaison avec le groupe control)

Abstract

Lectins are ubiquitous proteins, non-immune origin, presenting several biological properties, due to their unique ability to read the biological information codified in the three-dimensional structure of sugars and glycoproteins. In this work, 6 strains of actinomycetes, which 5 belonging to rare genus were tested for their production of lectins. The hemagglutination test was used to select the strain *Micromonospora aurantiaca* GF 44c as best producing strain of these molecules. The study of the lectins contained in the intracellular fraction of strain *Micromonospora aurantiaca* GF44c led to the discovery of membrane vesicles of nanometric size similar to those found in other Gram-positive bacteria (30 to 100nm) through the use of different technical (FPLC Purification on Superose 6, transmission electron microscopy and dynamic light scattering). These vesicles have the ability to induce, in addition to hemagglutination, immunomodulatory and proteolytic activities. The SDS-PAGE shows that these vesicles are very rich in diverse proteins. The proteomic analysis by mass spectrometry of these membrane vesicles identified 81 different proteins, mainly adhesins and membrane transporters (Substrate binding proteins and ABC transporters), enzymes (metalloprotease, peptidase, succinate dehydrogenase, Prolipoprotein diacylglycerol transferase, DCSA oxidoreductase, Glutamine synthetase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase), and lipoproteins. Functional analysis of these vesicular protein, suggest that these vesicles play an important role in the survival of the bacterium in a stressful particular biological environment, by the nutrient acquisition (amino acids carbohydrates and inorganic ions), the resistance to stress factors through the action of several enzymes, and redirect the immune system of the host by a strong immunostimulation. This study describes for the first time the production of membrane vesicles in the genus *Micromonospora*, and the possible roles of these vesicles.

Key words:

Actinomycetes, *Micromonospora aurantiaca*, Lectins, Membrane vesicles, Proteomic.

Thème :

Extraction, purification, et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c, et tests biologiques.

Résumé

Dans ce travail, six souches actinomycétales, dont cinq appartenant à des genres rares ont été testées pour leur production de lectines. Le test d'hémagglutination a permis de sélectionner la souche *Micromonospora aurantiaca* GF 44c comme meilleure souche productrice de ces molécules. L'étude des lectines contenues dans la fraction intracellulaire de la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c a conduit à la découverte de vésicules membranaires de taille nanométrique semblables à celles retrouvées chez d'autres bactéries Gram positif (30 à 100 nm), grâce l'utilisation de différentes techniques (Purification FPLC sur Superose 6, Microscopie électronique à transmission et Diffusion dynamique de la lumière). Ces vésicules possèdent la capacité d'induire, en plus de l'hémagglutination, des activités immunomodulatrices et protéolytiques. L'SDS-PAGE montre que ces vésicules sont très riches en protéines diverses.

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse de ces vésicules membranaires a permis d'identifier 81 protéines différentes, principalement des adhésines et des transporteurs membranaires (Substrat binding proteins et transporteurs ABC), des enzymes (Métalloprotéase, Peptidase, Succinate déshydrogénase, Prolipoprotein diacylglycerol transferase, DSBA oxidoreductase, Glutamine synthetase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase), et des lipoprotéines. L'analyse fonctionnelle de ces protéines vésiculaires, et l'origine clinique de la souche GF44c, suggèrent que ces vésicules jouent un rôle important dans la survie de la bactérie notamment dans un environnement stressant, par l'acquisition des nutriments (acides aminées, glucides et ions inorganiques), la résistance aux facteurs de stress via l'action de plusieurs enzymes, et redirection de la réponse du système immunitaire de l'hôte par une forte immunostimulation.

Mots clés :

Actinomycètes, *Micromonospora aurantiaca*, Lectines, Vésicules membranaires, Protéomique.

Membres du jury :

Président :	Mr. BOULAHROUF A.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. NECIB Y.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. ARHAB R.	Professeur	U. Larbi Ben M'hidi-OEB
Examineur :	Mr. ABDENNOUR C.	Professeur	U. Badji-Mokhtar-Annaba
Examineur :	Mr. KHELILI K.	Professeur	U. Badji-Mokhtar-Annaba

