

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri de Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie
Département de Microbiologie



N° de série :

N° d'ordre :

Thèse

Présentée pour l'obtention du **Diplôme de Doctorat LMD**
En Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement

Par

Khaled Boulahrouf

Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par des souches pures d'actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de *Lactuca sativa*, *Vicia fabae*, *Prunus domestica* et *Pinus halepensis*. Tests biologiques des lectines caractérisées.

Soutenu : le 26/ 06 / 2016

Devant le jury

Président : Khelifi Douadi

Pr. Université des Frères Mentouri, Cne

Directeur de thèse : Necib Youcef

Pr. Université des Frères Mentouri, Cne

Examinateurs

Hamidechi M^{ed} Abdelhafid

Pr. Université des Frères Mentouri, Cne

Arhab Rabah

Pr. Université Larbi Ben M'hidi, OEB

Ouldjaoui Abdallah

MC/A Université Larbi Ben M'hidi, OEB

Année universitaire 2015/2016

Je dédie affectueusement cette thèse

*À mon père et ma mère
À mes sœurs et mon frère*

J'adresse à tous un grand merci pour tout.

Remerciements

Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur Youcef NÉCIB, pour m'avoir guidé et conseillé et pour ses précieux conseils qui m'ont été tout le temps fructueux. Monsieur NÉCIB, merci pour m'avoir supporté et m'avoir guidé pendant six ans vous méritez Professeur ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

C'est avec un grand plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance au Professeur Abderrahmane BOULAHROUF qui m'a ouvert son laboratoire au cours de ma thèse avec beaucoup d'hospitalité. Monsieur BOULAHROUF, je vous remercie beaucoup pour votre contribution à ce travail qui était fructueux, et pour vos idées et vos remarques pertinentes que vous n'avez jamais hésité à me les donner avec un grand cœur généreux, vous méritez Professeur tout mon profond respect et toute ma reconnaissance.

Mes sincères, vifs et chaleureux remerciements sont adressés au Professeur KHÉLIFI Douadi de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et, qui tout au long de mes recherches, n'a cessé de m'encourager.

Mes remerciements vont, également, aux Professeurs Hamidechi M^{ed} Abdelhafid , et Arhab Rabah et au Docteur Ouldjaoui Abdallah qui ont accepté d'examiner et de juger mon travail.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide, et particulièrement à mon collègue Fateh Merouane

Liste des abréviations

BSA	Bovine serum albumine
Cas	Caséine
CH ₃ CN	Acétonitrile
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
EB	Extrait brut
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acide
ELLA	Enzyme Linked Lectin Assay
Esi	Electrospray ionization (ionization par électronébuliseur)
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HA	Hémagglutination
HCOOH	Acide formique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine ethane sulfonique
HIV	Human Immunodeficiens Virus
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
<i>ISP₂</i>	<i>International Streptomyces Project</i>
K	Indice phagocytaire
LC	Chromatographie liquide
Man	Mannose
MS	Spectrométrie de masse
MS/Ms	Spectrométrie de masse en tandem
NeuAc	Acide sialique
Ova	Ovalbumine

Liste des abréviations

PBS	phosphate buffered saline
PLGS	Protein Lynx Global Server
PM	Poids moléculaire
RES	Système réticulo-endothélial
SA	Sulfate d'ammonium
SHA	Activité hémagglutinante spécifique
Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl) propane-1,3-diol
UH	Unité hémagglutinante
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography

Liste des figures

Figure 1: rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.

Figure 2: représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl Lewis^X (PDB 1G1T) (Somers *et al.*, 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

Figure 3: tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre *et al.*, 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

Figure 4: repliement général de la lectine du micronème TgMIC1 chez *Toxoplasma gondii* (gauche, PDB 2JH1). Zoom dans le site de fixation du complexe TGMIC1-6-sialylgalactosamine (droite, PDB 2JH7) (Blumenschein *et al.*, 2007).

Figure 5: différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008) .

Figure 6: les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002) .

Figure 7: cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985)

Figure 8: le test d'hémagglutination sur microplaque de titration.

Figure 9: Représentation schématique des différentes étapes d'extraction, purification et caractérisation des lectines de la souche Pru16.

Figure 10: identification protéique par spectrométrie de masse.

Figure 11: test d'hémagglutination (extrait intracellulaire de la souche Pru16, cultivée sur milieu *ISP*₂, en présence d'érythrocytes de rat, lapin et souris.

Figure 12: purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche Pru16.

Chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-75).

Figure 13: test d'agglutination des deux pics .

Figure 14: purification par affinité de lectine *Streptomyces champavati* Pru16 sur colonne Sepharose-4B Mucine. Les fractions 1,0 ml ont été prélevées et analysées pour la teneur en protéines et en titre .

Figure 15: test d'hémagglutination avec le sang de rat des extraits protéiques des pics 1 et 2 (après purification sur colonne mucine sépharose 4B).

Figure 16: test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction P2.

Figure 17: Effet de la température et du pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction 33 Pic2.

Figure 18: Effet de l'EDTA sur l'hémagglutination de fraction 33 Pic 2.

Figure 19: gel SDS-page (15%) de la fraction F33 après coloration au bleu de coomassie.

MM : marqueurs moléculaires, EB : extrait brut intracellulaire (après filtration et ultrafiltration >10kDa), P1 : fraction (F33).

Figure 20: test d'activité antimicrobienne de l'extrait P2 de la souche Pru16(T : témoin ; EB : extrait brut ; LC : lectine 0,3 mg/mL ; LC1/2 : 0,15 mg/mL ; LC1/4 : 0.075 mg/mL)

Figure 21: Effet de l'extrait brut sur l'index phagocytaire corrigé .

Figure 22: Effet de l'extrait brut de Vic8 sur la demi-vie des particules de carbone dans le sang des souris

Figure 23: Effet de l'extrait brut sur l'index phagocytaire corrigé.

Liste des tableaux

Tableau 1: principaux glycanes associés au cancer (Guillot <i>et al.</i> , 2004).....	7
Tableau 2: lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie.....	9
Tableau 3: récapitulatif des lectines répertoriées.....	10
Tableau 4: souches actinomycétales utilisées.....	29
Tableau 5: activité hémagglutinante des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocyte utilisé.....	46
Tableau 6: activité hémagglutinante spécifique des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocyte utilisé.....	47
Tableau 7: caractéristiques de l'extrait brut et des lectines après purification préliminaire de la souche <i>S. champavati</i> Pru16.....	50
Tableau 8: caractéristiques de l'extrait brut et de la lectine après purification sur colonne Mucine 4B de la souche <i>S. champavati</i> Pru16.....	52
Tableau 9: Effet des différents sucres, glycoprotéines et protéines sur l'activité hémagglutinante de la fraction 33 Pic 2 (test d'inhibition de l'hémagglutination).....	53
Tableau 10: Identification des protéines par spectrométrie de masse tandem (bande protéique majoritaire sur gel d'électrophorese ≈ 16.2 kDa).....	57

Résumé

Les lectines sont présentes dans tous les organismes vivants et sont utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Actuellement, les lectines microbiennes suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leurs diverses activités biologiques.

Des souches d'actinomycètes rhizosphériques promotrices de croissance de plantes et antagonistes des mycètes et des bactéries pathogènes de ces mêmes plantes ont été retenues pour mettre en évidence la production des lectines, de les purifier, de les caractériser et d'étudier leurs activités biologiques. Les six souches, étudiées, ont été identifiées aux genres : *Streptomyces* et *Nocardopsis*. Les souches ont été cultivées sur deux milieux liquides (Bennet et *ISP2*). Le pouvoir agglutinant des extraits extracellulaire et intracellulaire des deux milieux de culture est mis évidence en présence de sept types d'érythrocytes.

Les deux extraits des six souches, quel que soit le milieu, n'ont agglutiné aucun érythrocyte humain. Les plus fortes agglutinations ont été obtenues avec les extraits intracellulaires en présence d'érythrocytes de rats et de lapins. Le milieu *ISP2* favorise mieux la production des lectines. Les fractions intracellulaires agglutinant fortement les érythrocytes de rats ont été retenues. Celle de la souche Pru16 pour purification et caractérisation et celle de la souche Vic8 pour l'étude de l'effet immuno-modulateur.

Les lectines, de la fraction intracellulaire de la souche Pru16 a subi une première purification primaire par du sulfate d'ammonium et filtration sur gel G75. La précipitation différentielle a montré que les trois premières fractions présentent une activité hémagglutinante. Après filtration, deux pics ont été observés (pics A et B). Le pic B ne présente aucune activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 8,37 UH/mg, et elle est passée à 14,95 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 20 UH/mg (picA).après filtration sur gel G75. L'activité hémagglutinante de cette fraction persiste à des pH alcalins et à des concentrations importantes en EDTA.

Après chromatographie sur colonne mucine sépharose 4B (deuxième purification), deux pics sont observés. La fraction proteique 33 du pic 2 présente une forte activité hémagglutinante spécifique environ douze fois plus importante que celle observée pour l'extrait brut (111,49 contre 8,37 UH/mg), en revanche celle du pic 1 ne présente aucune activité hémagglutinante. Le test d'affinité conduit avec la fraction proteique 33 du pic 2 a montré que la la souche Pru16 se lie spécifiquement aux proteines. L'analyse SDS-page a

démontré que les hémagglutinines contenues dans la fraction 33 du pic P2 se situées dans la bande 16kDa

L'identification des protéines de la bande 16kDa, après digestion et élution des peptides par LC, s'est faite par spectrométrie de masse tandem en comparant avec la base de données protéomiques de souches apparentées. L'analyse a permis d'identifier 6 protéines similaires différentes, cependant une seule présente un score assez élevé, avec un poids moléculaire similaire à celui de la bande protéique. Il s'agit du lysozyme C qui lui n'a pas d'activité hémagglutinante. Notre protéine de 16kDa ne présente d'activité antimicrobienne.

L'augmentation de l'indice phagocytaire, de l'indice phagocytaire corrigé, et de la diminution du temps de demi-vie des particules de carbone en circulation dans le sang indiquent que l'extrait brut de la souche Vic8 possède un ou plusieurs facteurs capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris. Cet effet est comparable à celui exercé par les lectines pures.

Les mots clés: *Actinobacteria*, actinomycètes aérobies, rhizosphère, lectines glycoconjugués, fermentation, purification des protéines, immunostimulation

المخلص :

تتواجد اللكتينات lectines في جميع الكائنات الحية وتستخدم كأدوات في البحث وفي قطاع الطب الحيوي. وفي الوقت الراهن، تثير اللكتينات الميكروبية المزيد من الاهتمام بسبب أنشطتها البيولوجية المتنوعة. تم الحصول على سلالات *actinomycètes rhizosphérique* المروجة لنمو النباتات و العدائية للفطريات الناقصة *mycète* و البكتريا المسببة لأمراض نفس النباتات لتوضيح إنتاج اللكتينات lectines من تنقيتها ، توصيفها و دراسة أنشطتها البيولوجية . تم التعرف على السلالات الستة المدروسة إلى نوعين هما *Streptomyces* و *Nocardiosis* . تمت تنمية السلالاتين علي وسطي نمو سائلين هما Bennet و *ISP2* . وضح الكشف عن القدرة الألتصاقية للمستخلصات الداخل خلوية و الخارج خلوية لوسطي النمو في وجود سبعة أنواع من كريات الدم الحمراء. لم يعمل مستخلصي السلالات الستة مهما كان وسط النمو على تجميع أو ترصص أي كريات دم حمراء بشرية. تم الحصول على أقوى ترصص مع المستخلصات الداخل خلوية في وجود خلايا الدم الحمراء للفئران و الأرانب. تشجع البيئة *ISP2* أفضل إنتاج اللكتينات . الأجزاء الداخل خلوية ترصص بقوة كريات الدم الحمراء للفئران. تستخدم سلالة *Pru16* للتنقية و التوصيف و سلالة *Vic8* لدراسة التأثير المناعي . خضعت لاكتينات جزء الداخل خلوية للسلالة *Pru16* لتنقية الابتدائية أولية مع كبريتات الأمونيوم الترشيح على هلام الترشيح *G75* . أظهر الترسيب الجزئي أن الأجزاء الثلاثة الأولى تمثل نشاط ترصص دموي *hémagglutinante* . بعد عملية الترشيح، لوحظت قمتين *A* و *B* . لا تمثل الذروة *B* أي نشاط ترصص دموي . ومع ذلك، كان النشاط النوعي للمستخلص الخام *HU / 8.37* ملغ، وارتفع إلى *UH / 14.95* ملغ بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم، و *UH / 20* ملغ (عند القمة *A*). نشاط الترصص الدموي له الجزء يقاوم درجة الحموضة القلوية والتركيزات العالية من *EDTA* .

لوحظ بعد عملية الفصل الكروماتوغرافي على العمود *mucine sépharose 4B* (التنقية الثانية) . يمثل الجزء البروتيني 33 للذروة الثانية نشاط أكثر أهمية من تلك الملاحظة من الترصص الدموي حوالي اثني عشر مرات أكبر من تلك التي لوحظت لاستخراج النفط الخام (*UH / 8.37* ضد *UH / 111.49* ملغ)، ولكن الذروة 1 لا تظهر أي نشاط للترصص . أظهر اختبار التقارب الذي أجري مع الجزء البروتيني 33 للذروة 2 أن سلالة *Pru16* ترتبط نوعيا مع البروتين. أظهر تحليل الهجرة الكهربائية *SDS-PAGE* أن الراصة الدموية الواردة في الجزء 33 من ذروة *P2* يقع في البند *16 kDa*. تحديد البروتينات للبند *16 kDa* ، وبعد عملية الهضم و شطف البيبتيدات بواسطة الفصل الكروماتوغرافي *LC* ، تم بعملية القياس الطيفي الكتلي بالمقارنة مع قاعدة المعطيات البروتينية *protéomiques* للسلالات الظاهرة . سمح التحليل بتحديد ستة بروتينات متشابهة مختلفة ، على الرغم من أن واحد فقط يمثل مجمع مرتفعا بوزن جزيئي مماثلة للبند البروتيني . و الذي يمثل الليزوزوم *C* الذي لم يمثل أي نشاط ترصص دموي . البند البروتيني *16 kDa* لا يمثل نشاط مضاد للميكروبات. زيادة مؤشر البالعات *phagocytaire* و مؤشر البالعات المصحح ، وانخفاض وقت نصف الحياة لجزيئات الكربون في الدم تشير إلى أن المستخلص الخام لسلالة *Vic8* يمتلك واحد أو العديد من العوامل القادرة على التنبيه بصفة معنوية لنشاط البالعات و نظام *réculo-endothélial* عند الفئران. هذا التأثير مشابه لذلك الممارس من قبل اللكتينات النقية.

الكلمات المفتاحية : ليكتين ، *actinomycètes rhizosphérique*، التخثير، الكروماتوغرافي، تنشيط المناعة

Abstract

Lectins are present in all living organisms and are used as tools in research and in the biomedical sector. Currently, the microbial lectins are attracting more and more of interest because of their diverse biological activities.

Some strains of actinomycetes Rhizospheric promoters of plant growth and antagonistic fungi and pathogens of these plants were chosen to highlight the production of lectins to purify characterize and study their biological activities. The six strains studied were identified to genera *Streptomyces* and *Nocardopsis*. The strains were cultured on two liquids (Bennet and ISP2). The adhesive strength of the extracellular and intracellular extracts of the culture media is evidence placed in the presence of seven types of erythrocytes.

Both extracts of six strains, in any case of the medium, have no agglutinate human erythrocytes. Strongest agglutination was obtained with the presence of intracellular extracts and rat erythrocytes of rabbits. The ISP2 environment better promotes the production of lectins. Intracellular fractions strongly caking rat erythrocytes were retained. That of Pru16 strain for purification and characterization and that of the Vic8 strain to study the immunomodulatory effect.

Lectins, the intracellular fraction of strain Pru16 underwent a first primary purification with ammonium sulphate and gel filtration G75. Differential precipitation showed that the first three fractions exhibit HA activity. After filtration, two peaks were observed (peaks A and B). Peak B shows no HA activity. However, the specific activity of the crude extract was 8.37 HU / mg, and it increased to 14.95 UH / mg after ammonium sulfate precipitation, and 20 UH / mg (picA) .after G75 gel filtration. The HA activity of this fraction remains at alkaline pH and high concentrations of EDTA.

After column chromatography mucin sepharose 4B (second purification), two peaks are observed. The proteic fraction 33 peak 2 has a high specific HA activity about twelve times greater than that observed for the crude extract (8.37 111.49 against UH / mg), however the first peak shows no HA activity. The affinity test conducted with the proteic fraction 33 of Peak 2 showed that the Pru16 strain binds specifically to protein. The SDS-PAGE analysis showed that the hemagglutinin contained in the portion 33 of the P2 peak is located in the band 16kDa

The identification of proteins 16kDa band, after digestion and elution of peptides by LC, was top by tandem mass spectrometry proteomics comparing with the database related strains.

The identified analysis of 6 different proteins similar, one of them has a high score, with a molecular weight similar to that for protein band. This is the lysozyme C who did him no HA activity. Our protein of 16kDa presents antimicrobial activity.

The enhancement of the phagocytic index of the corrected phagocytic index, and decreased half-life time in circulation of carbon particles in the blood indicate that the Vic8 strain of the crude extract possess one or more factors able to significantly boost the phagocytic activity of macrophages and reticuloendothelial system in mice. This effect is comparable to that exerted by the pure lectins.

Keywords : Actinobacteria , actinomycetes aérobies , rhizosphere , lectins glycoconjugates , fermentation, purification of proteins , immunostimulatory

Tables des matières

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé en Français	
Résumé en Arabe	
Résumé en Anglais	

Introduction	1
1. Les lectines.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Généralités.....	4
1.3. La spécificité et l'affinité des lectines.....	5
1.4. Intérêt des lectines pour l'homme.....	6
1.5. Distribution des lectines dans le monde vivant.....	10
1.5.1. Lectines de vertébrés.....	11
1.5.2. Lectines d'invertébrés.....	12
1.5.3. Lectines de plantes.....	13
1.5.4. Lectines de microorganismes.....	15
2. Les actinomycètes.....	18
2.1. Caractéristiques générales.....	18
2.1.1. Morphologie.....	18
2.1.2. Physiologie et écologie.....	20
2.1.3. La reproduction chez les actinomycètes (exemple type <i>Streptomyces</i> sp.).....	21
2.2. Classification des actinomycètes.....	22
2.2.1. La classe " <i>Actinobacteria</i> ".....	22
2.2.2. Les clés d'identification des genres et des espèces de l'ordre <i>Actinomycetales</i>	23
a. Caractères morphologiques.....	23
b. Caractères chimiotaxonomiques.....	23
c. Les acides nucléiques.....	24
2.3. Rôle des actinomycètes en biotechnologie.....	24
2.3.1. Amélioration de la qualité de sol agricole.....	24
2.3.2. Production d'antibiotiques.....	25
2.4. Rhizosphère et microflore.....	25
2.4.1. La rhizosphère et les exsudats racinaires.....	25
2.4.2. Microflore rhizosphérique Microorganismes et actinomycètes rhizosphériques ...	26

Matériel et Méthodes	28
1 Souches actinomycétales.....	28
1.1. Mise en évidence des lectines et sélection de la meilleure souche productrice.....	29
1.1.1. Fermentation.....	29
1.1.2. Extraction des lectines.....	30
a) Les lectines extracellulaires	30
b) Les lectines intracellulaires	30
1.1.3. Test d'héماغglutination et mise en évidence des lectines.....	31
1.1.4. Dosage des protéines (Bradford,1976).....	32
2. Purification des lectines de la souche Pru16 et Vic8.....	32
2.1. Préparation de l'extrait brut	32
2.2. Purification préliminaire	33
2.2.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium	33
2.2.2. Dialyse	33
2.2.3. Chromatographie	34
a) Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75).....	34
b) Purification sur une colonne Mucine Sépharose 4B.....	34
3. Caractérisation des lectines de la souche Pru16.....	35
3.1. Test d'héماغglutination	35
3.2. Test d'héماغglutination du lysozyme C	35
3.3. Test d'inhibition de l'héماغglutination.....	35
3.4 . Effet de la température, du pH , et de l'EDTA sur l'héماغglutination.....	36
3.5. Electrophorèse SDS-PAGE.....	37
4. Étude protéomique et spectrométrie de masse	37
4.1. Nano HPLC Q-excavative plus et analyse par spectrométrie de masse LC-MS	39
4.2. Traitement bioinformatique des données	39
4.3. NanoLC-ESI-MS/MS	40
4.4 . Traitement bioinformatique et identification des protéines	40
5. Activités biologiques de la fraction active	42
5.1. Activité antimicrobienne.....	42
5.1.1. Les souches tests	42
5.1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	42
5.1.3. Mise en évidence de l'activité antifongique	42
5.2 Activité immunomodulatrice <i>in vivo</i> de l'extrait intracellulaire de la souche Vic8	43
5.2.1. Test de clairance de carbone.....	43

5.2.2. Animaux	43
5.2.3. Indice phagocytaire	44
5.2.4. L'analyse Statistique	44
Résultats	45
1. Mise en évidence de l'activité hémagglutinante et sélection de la meilleure souche.	45
2. Purification.	47
2.1. Purification préliminaire	47
2.2. Purification sur colonne Mucine sépharose 4B	50
3. Caractérisation des molécules hémagglutinantes de la fraction P2.	52
3.1 Inhibition de l'hémagglutination.....	52
3.2. Effet de la Température, du pH et de l'EDTA sur l'hémagglutination.....	54
3.3. SDS-PAGE et spectrométrie de masse (nanoLC-ESI)	55
6. Activités biologiques.....	58
6.1. Activité antimicrobienne.....	58
6.2 . Activité immunomodulatrice	58
Discussion générale	62
1. Souches et milieux de production des lectines.....	62
2. Test d'hémagglutination.....	63
3. Purification primaire.	64
4. Chromatographie sur colonne Mucine Sépharose 4B.....	65
5. Caractéristiques physico-chimique de la fraction 33 du pic P2.	68
6. SDS Page et protéomique.....	69
7. Activité antimicrobienne.	69
8. Modulation de la réponse immunitaire.....	69
Conclusion -Perspectives	72

Références Bibliographique

Annexes

Introduction

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. Les lectines suscitent, ces dernières années, de plus en plus d'intérêt chez les scientifiques notamment pour leur rôle dans la régulation d'une variété de processus biologiques, et leur potentiel utilisation en tant qu'agents pharmacologiques (**Hamid et al., 2013**). Les mécanismes moléculaires qui déterminent l'activité physiologique des lectines restent cependant encore mal connus.

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. L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire. La plupart des lectines présentent plusieurs sites de liaison pour les glucides. Elles peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules. Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires (**Varki, 1993**).

Les propriétés biologiques des lectines végétales ont fait l'objet, depuis de nombreuses années, de la plupart des études. Également, 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**. Le rôle biologique de ces protéines chez ce groupe de bactéries reste pratiquement inconnu et non caractérisé (**Podgorskii et al., 2014**). Hormis la pathogénèse, les lectines bactériennes peuvent être impliquées dans une multitude d'autres processus physiologiques comme l'adhésion, la communication, la

formation de biofilms 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 (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.

Les actinomycètes, isolés de la rhizosphère, constituent donc une source intéressante pour l'étude des lectines, d'autant plus que très peu d'études se sont intéressées à l'étude de ces molécules chez ces bactéries. Les actinomycètes sont des bactéries Gram-positif, caractérisés par un génome à teneur élevée en GC%. La plupart des membres de ce groupe sont saprophytes. Le sol est leur principal réservoir et sont abondants dans la rhizosphère (Khamna *et al.*, 2009). Plusieurs actinomycètes ont été isolés à partir de sols algériens. Certains d'entre eux appartiennent aux genres rares tels que *Actinomadura*, *Nanomuraea*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (Badji *et al.*, 2007).

Les actinomycètes synthétisent les deux tiers des antibiotiques microbiens dont environ 80% sont isolés du genre *Streptomyces*. Ils constituent la source de substances antibactériennes, antifongiques antitumorales, antiparasitaire, antivirales, insecticides, pesticides et herbicides. Ils sont, également, les fournisseurs des substances pharmacologiques comme les immuno-modulateurs (substances immunosuppressives et immunostimulantes), les substances vaso-actives et les agents neurologiques. Les enzymes sont les plus importants produits des *Streptomyces* après les antibiotiques comme les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases et les xylanases.

Les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs de substances biologiquement actives avec les *Streptomyces* qui produisent toujours la plus grande partie. Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (Hopwood, 2007).

La recherche des actinomycètes producteurs de nouveaux antibiotiques en Algérie a été menée dans divers environnements tels que les lacs, les sebkhas et le sol Saharien (Kitouni *et al.*, 2005). La rhizosphère est considérée comme une source riche pour

Introduction

l'isolement des agents de biocontrôle et des promoteurs de croissance des plantes. Ainsi, des actinomycètes isolés dans la région semi-aride à partir de différentes rhizosphères (cultures maraîchères, céréalières, d'arbres fruitier et forestier), a mis en évidence l'abondance de ces bactéries dans la rhizosphère et démontré leur activité antifongique, antibactérienne et promotrice de croissance des plantes. L'étude des caractères morphologiques, physiologiques, moléculaires et environnementaux ont permis l'affiliation des isolats à leurs espèces correspondantes, comme suit : *Streptomyces griseus* Lac1, *Streptomyces rochei* Lac3, *Streptomyces anulatus* Pru14, *Streptomyces champavatii* Pru16, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 et *Nocardiopsis alba* Pin10 (Aouar et al, 2012).

Notre objectif principal est l'isolement de nouvelles lectines à partir des actinomycètes rhizosphériques dont l'activité antagoniste (antifongique et antibactérienne) et promotrice de la croissance des plantes laissent supposer leur présence effective, d'autant plus que ces bactéries ont fait l'objet de très peu d'études.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à :

- mettre en évidence la production de lectines par six souches d'actinomycètes appartenant aux genres *Streptomyces* et *Nocardiopsis*, en utilisant différents milieux de cultures,
- sélectionner les meilleures souches productrices de lectines,
- purifier et caractériser ces molécules,
- étudier leurs activités biologiques.

1. Les lectines

1.1. Définition

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 (**Lis et Sharon, 1998**). L'expression « d'origine non immunitaire » peut être discutée, puisque certaines lectines sont impliquées dans la défense immunitaire innée. Cette expression sert principalement à souligner la différence entre les lectines et les anticorps du système immunitaire acquis. Les lectines sont aussi identifiées chez les bactéries et les êtres vivants primitifs qui ne possèdent pas de système immunitaire.

Les lectines sont présentes dans toutes les branches du règne vivant. L'abondance des ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

1.2. Généralités

La première lectine a été découverte par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient des érythrocytes (**Sharon et Lis, 2004**). À partir de ce moment là, d'autres substances d'origine végétale possédant une activité hémagglutinante ont été découvertes.

En 1954, Boyd & Sharpleigh ont démontré la propriété de ces protéines d'agglutiner sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe sanguin donné. Cette notion de spécificité est la base de l'étymologie du nom lectine dérivée du mot latin *légère* qui veut dire « sélectionner ».

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 érythrocytes résulte en l'agrégation d'un grand nombre de ces cellules. Cette caractéristique est typique des lectines. Elle est aussi classiquement utilisée pour leur détection (**Rüdiger, 1993**) et leur caractérisation (**Goldstein et al., 1980**). Lorsque certains sucres sont ajoutés lors de l'interaction des lectines avec les érythrocytes, leur activité hémagglutinante est inhibée ce qui permet de déterminer leur spectre de spécificité (**Van Damme et al., 1998**).

Les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Ces molécules sont constituées d'une partie glucidique (mono ou oligosaccharide) associée de façon covalente à une partie non glucidique (aglycone) de protéines ou de lipides et jouent un rôle primordial dans la vie sociale des cellules (**Varki ,1993**). Les interactions protéine/glucide sont impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. La Figure 1 donne une vue schématique des interactions lectines-glucides.

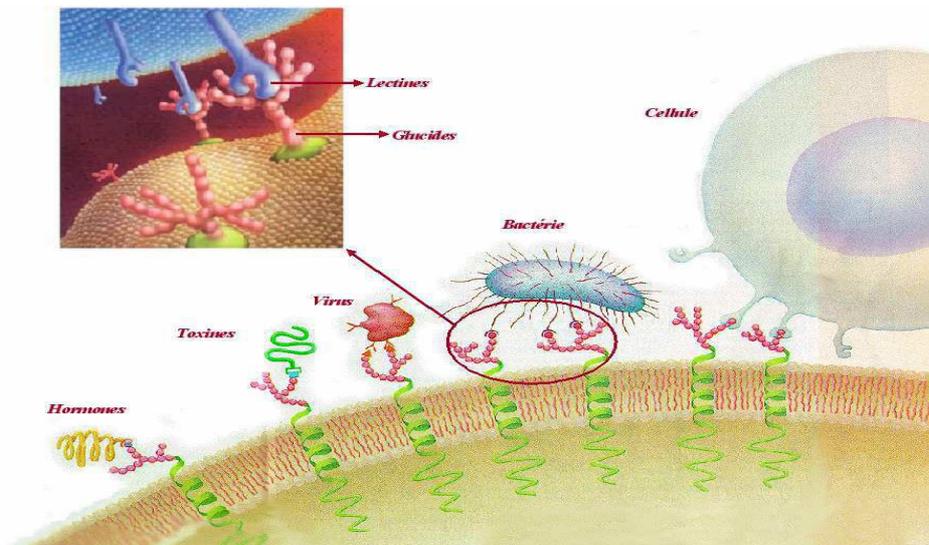


Figure 1 : rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides.

1.3. La spécificité et l'affinité des lectines

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité: le mannose (Man), le galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique) (**Lis and Sharon, 1998**). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides.

La constante de dissociation pour les monosaccharides est de l'ordre du millimolaire (mM), en revanche, pour les oligosaccharides elle est de l'ordre du micromolaire (mM) (**Dam and Brewer, 2002**). Enfin, certaines lectines telles que PHA-L et PHA-E de *Phaseolus vulgaris* reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (**Cummings and Kornfeld, 1982**).

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le galactose (Gal) se lient aussi au N-acétylgalactosamine (GalNAc)

Certaines lectines peuvent reconnaître le mannose et le fucose telles que DC-SIGN de mammifère (**van Liempt et al., 2006**) ou PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* (**Imberty et al., 2004**). Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en C1 de monosaccharides tels que l'a-methyl-galactoside et le b-methyl-galactoside.

La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (**Park et al., 2008**). La spécificité d'une lectine peut être déterminée en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » (glycochips avec différents mono et oligosaccharides). Ces techniques sont simples, rapides et requièrent de quantités réduites de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (**Lee and Lee, 1995**). Dans la plupart des cas, les systèmes biologiques utilisent des interactions faibles mais multivalente plutôt qu'une seule interaction forte. Ainsi, ils peuvent assurer une haute spécificité et affinité entre ces récepteurs et les surfaces cellulaires des systèmes biologiques.

1.4. 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 et 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 immobilisée 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 et 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**).

Certaines lectines purifiées à partir d'invertébrés terrestres ou marins sont employées comme marqueurs histo-chimiques puisque certaines maladies tel le cancer (**Tableau 1**) sont associées à une modification des glycanes présents sur les cellules (**Guillot et al., 2004**).

Tableau 1 : principaux glycanes associés au cancer (Guillot *et al.*, 2004).

Non de l'antigène	Séquence glycanique
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Tn	SA α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
T	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Lea	SA α 1-3Galb1-3GlcNAcb1-3Gal- α 1-4 Fuc
Le ^x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Sialyl- Le ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Le ^y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1-3 Fuc
N-acétyllactosamine	Gal β 1-4GlcNAc
Séquenceb 1-6-branchée	GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β - (oligosaccharides N-liés)

Le tableau 2 décrit les principales lectines isolées de plantes ou d'invertébrés qui sont employées pour la mise en évidence de glycotopes oncologiques ou, plus généralement, en histopathologie. Les lectines sont utilisées en fonction des structures glycaniques associées aux états pathologiques (**Guillot *et al.*, 2004**). De par leur spécificité, les lectines se lient préférentiellement à un monosaccharide soit situé au bout de la chaîne soit placé dans une position non terminale des oligosaccharides complexes.

Tableau 2 : lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	<i>Lycopersicum esculentum</i>	D-GlcNAc
PWL	<i>Phytolacca americana</i>	D-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare (wheat germ)</i>	D-GlcNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	D-GlcNAc
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-GlcNAc β 1-6Man α 1- 6Man β -
GSI-B4	<i>Griffonia(Bandeira)simplicifolia</i>	D-Gal
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	D-Gal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	D-GalNAc
LBL	<i>Phaseolus lunatus (Lima bean)</i>	D-GalNAc
RCA-1	<i>Ricinus communis</i>	D-GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	D-GalNAc
HAA	<i>Helix aspersa</i>	D-GalNAc
HPA	<i>Helix pomatia</i>	D-GalNAc
VVA-B4	<i>Vicia villosa</i>	D-GalNAc
WFA	<i>Wistaria floribunda</i>	D-GalNAc
ECA	<i>Erythrina crista-galli</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
PSL	<i>Laetiporus sulfureus</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
GSI-A4	<i>Griffonia(Bandeira)simplicifolia</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
ABL	<i>Agaricus bisporus</i>	D-Gal β 1-3GalNAc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
JAC	<i>Artocarpus integrifolia</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
LDL	<i>Lactarius deliciosus</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
VGA	<i>Vicia graminea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
EEA	<i>Euonymus europaeus</i>	D-Gal α 1-3(L-Fuc α 1- 2)D-Gal β 1-3/4D- GlcNAc

1.5. Distribution des lectines dans le monde vivant

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants. Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd’hui la structure tridimensionnelle d’environ 770 lectines.

Le laboratoire de CERMAV a développé une base de données des structures 3-D des lectines qui rassemble les informations structurales de ces protéines (la base de données des lectines est accessible sur: <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines>).

La banque de lectines comprend ainsi 48 familles structurales différentes dont 6 d’origine végétale, 10 d’origine bactérienne, 18 d’origine animale, 5 familles d’origine virale, 8 d’origine fongique et 1 famille d’algues (**Tableau 3**).

Tableau 3 : récapitulatif des lectines répertoriées

Origine	Exemples de Lectines	Native	Complexé	Total
Plantes	ConA Ricine	106	201	307
Bactéries	PA-IL de <i>Pseudomonas</i> Toxine de cholera	37	79	116
Animaux	E-selectin <i>Helix pomatia</i> agglutinin	80	152	232
Virus	Hemagglutinin de virus Capside de rotavirus	43	25	68
Champignons	lectine de mousseron	17	23	40
Algues	Griffithsin	2	7	9
Total		285	487	772

1.5.1. Lectines de vertébrés

Les lectines animales sont réparties dans des familles très différentes. Les trois familles les plus étudiées sont les *galectines*, les lectines de *type C* et les *siglecs*.

Les structures de *galectines* sont relativement simples. Ces protéines sont spécifiques pour le β -galactose et plus précisément pour le lactose β (Gal1-4Glc) et le N-acetylgalactosamine (β Gal1-4GlcNAc) (**Leffler et al., 2004**). La première structure tridimensionnelle d'une galectine humaine (la galectin-7/hGal-7) a été obtenue dans sa forme native et complexée avec le galactose, le galactosamine, le lactose, et le N-acétylgalactosamine (**Leonidas et al., 1998**).

Les lectines du *type C* présentent un CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) bien conservé qui implique un atome de calcium dans l'interaction protéine-sucre (**Drickamer, 1993**). Les lectines de type-C sont soit en circulation dans le plasma, soit attachées aux surfaces cellulaires par la présence d'un segment transmembranaire. Un exemple de la structure 3-D d'une lectine du type C est la E-selectine en complexe avec le Sialyl Lewis^X (PDB 1G1T) (**Somers et al., 2000**) (**Figure 2**).

Les *Siglecs*, ou lectines de type I, constituent une famille de lectines qui reconnaissent l'acide sialique (**Crocker, 2002**). Elles sont membres de la superfamille immunoglobuline (Ig) et adoptent un repliement de type immunoglobuline.

Les autres classes de lectines animales comprennent :

-les lectines du *type P* qui sont formées par les lectines qui fixent le mannose-6-phosphate, comme la lectine bovine CD-MPR (**Roberts et al., 1998**),

-les *pentraxines* sont une famille des lectines capables de se lier à des ligands Ca^{2+} dépendant (**Emsley et al., 1994**),

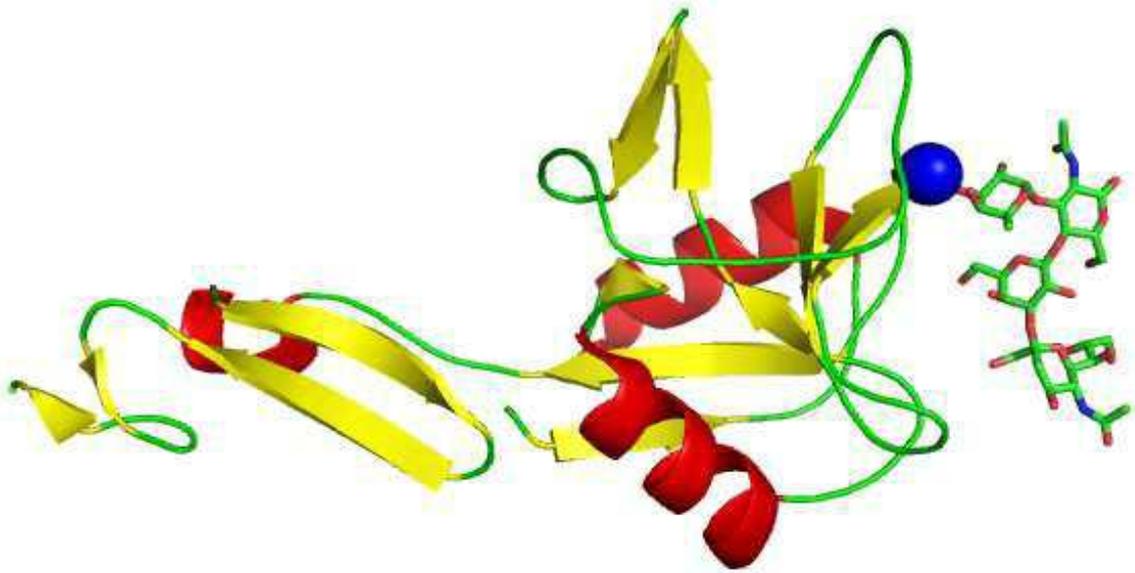


Figure 2 : représentation graphique de la structure de la E-selectine humaine en complexe avec le Sialyl Lewis^X (PDB 1G1T) (Somers *et al.*, 2000). Le calcium est représenté par une sphère bleue et le ligand par des bâtonnets.

-*calnexines-calreticuline* comme la lectine calnexine de l'espèce *Canis familiaris* (Schrag *et al.*, 2001).

-les ficolines (Garlatti *et al.*, 2007) ont, récemment, été mises en évidence.

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

1.5.2. Lectines d'invertébrés

La présence de lectines a été démontrée chez les invertébrés terrestres ou marins. Ces protéines font souvent partie d'un système d'immunité innée et présentent donc des spécificités pour les glucides présents à la surface d'organismes pathogènes (Vasta, 1992).

Chez les invertébrés, les lectines sont distribuées dans toutes les classes et sous-classes étudiées. À titre d'exemple :

- les gastéropodes avec la lectine d'escargot CHA-II de *Cepaea hortensis* (**Gerlach et al., 2002**).
- les échinodermes avec l'hémagglutinine de l'oursin *Hemicentrotus pulcherrimus* (**Yamada and Aketa, 1982**).
- les crustacés avec la lectine du crabe *Charybdis japonica* (**Umetsu et al., 1991**),
- les insectes avec la lectine du sphinx du tabac *Manduca sexta* (**Yu and Kanost, 2000**).

Ces lectines présentent des localisations variées : système digestif, appareil de reproduction, hémolymphe ou branchies. Un nombre limité de lectines d'invertébrés a été cristallisé. La codakine purifiée à partir des branchies de la palourde blanche *Codakia orbicularis* est une lectine de type C qui a une forte spécificité pour des N-glycannes biantennés (**Gourdine et al., in press**). D'autres exemples de lectines de type C sont la lectine de tunicier *Polyandrocarpa misakiensis* (**Poget et al., 1999**) et la lectine I (CEL-I) du concombre de mer *Cucumaria echinata* (**Sugawara et al., 2004**). Les structure 3D de lectines de type ricine ont, aussi, été obtenues telles que la lectine III (CEL-III) du même concombre (**Uchida et al., 2004**) et la lectine du vers de terre *Lumbricus terrestris* (**Suzuki et al., 2004**), ces deux lectines présentant une spécificité pour le galactose. La limule, *Tachypleus tridentatus*, est un fossile vivant qui présente un grand nombre de lectines impliquées dans l'immunité innée. Les structures de la tachylectine 2, un b-propeller (**Beisel et al., 1999**) et de la tachylectine 5A, une protéine de type fibrinogène (**Kairies et al., 2001**), ont été résolues en complexe avec le GlcNAc. La structure de la lectine extraite de l'escargot *Helix pomatia* (HPA) (**Sanchez et al., 2006**) a permis de définir une nouvelle famille de lectines.

1.5.3. Lectines de plantes

Les lectines végétales d'une même famille taxonomique (e.g., les lectines de légumineuses, de céréales, etc.) présentent des homologies de séquence et des similarités structurales. Historiquement, les lectines de légumineuses telle que la concanavaleine A (ConA) ont été les premières à être caractérisées. La première structure cristallographique d'une lectine de légumineuses (la ConA) a été déterminée en 1972 (**Edelman et al., 1972**). Les lectines de légumineuses adoptent toutes un repliement typique appelé «b jelly roll » formé par deux feuillets b superposés bien conservés dans les nombreuses structures résolues. Les monomères s'associent deux à deux de 7 manières différentes ce qui permet de former une variétés d'assemblage macromoléculaires sous la forme de dimères ou de

tétramères (**Sinha et al., 2007**). La Figure 3 représente un tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* (PDB 2CY6) complexée avec le tréhalose (**Delatorre et al., 2006**). La géométrie du site de fixation est fixée par la présence d'un ion manganèse et d'un ion calcium qui sont proches du ligand glucidique mais qui n'interagissent pas directement avec lui. Les variations en acides aminés autour du site de reconnaissance apporte la spécificité pour différents monosaccharides et oligosaccharides (**Loris et al., 1998**).

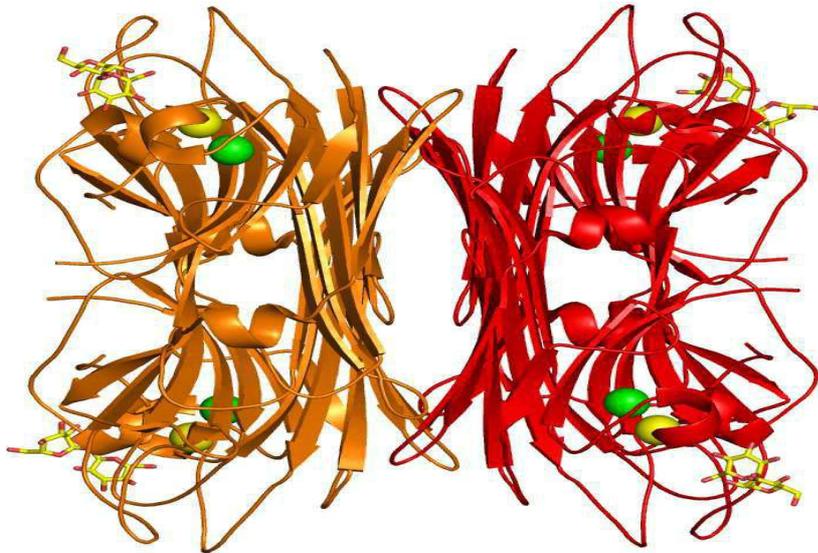


Figure 3 : tétramère de la protéine ConM de *Canavalia maritima* complexée avec le tréhalose (code PDB 2CY6) (Delatorre et al., 2006). Les cations sont représentés par des sphères (Calcium en jaune et Manganèse en vert) et les ligands par des bâtonnets.

Une autre grande famille de lectines d'origine végétale qui a pu être caractérisée est la famille des Gramineae (céréales) à laquelle appartient la lectine de germe de grain de blé (WGA). Les lectines de céréales présentent des domaines structuraux conservés riches en cystéine qui sont aussi appelés domaine hévéine. La première structure cristallographique déterminée dans cette famille a été celle de la WGA (**Wright C. S., 1980**).

La famille des monocotylédones présente des lectines spécifiques pour le mannose, la première structure 3-D a été la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) (**Wright C.S. and Hester , 1996**).

La famille de Moraceae est formée par les lectines qui fixent le galactose telle que la jacaline isolée des graines d'*Artocarpus integrifolia* (**Sankaranarayanan et al., 1996**).

La famille Amaranthaceae contient la lectine ACA de *Amaranthus caudatus* qui a été cristallisée avec le Galb1-3GalNAc (**Transue et al., 1997**).

La famille Euphorbiaceae englobe les lectines qui présentent une grande toxicité, un exemple de lectine de cette famille est la lectine RCA isolée des graines de ricin *Ricinus communis*. La ricine est un hétérodimère où la chaîne B constitue les domaines lectines qui reconnaissent le galactose (**Rutenber et al., 1991**).

La famille Solanaceae englobe les lectines de pommes de terre et des tomates mais aucune structure n'a encore été déterminée.

Les lectines de plantes semblent être impliquées dans la défense contre les phytopathogènes et les prédateurs, certaines ayant des activités insecticides (**Chrispeels and Raikhel, 1991 ; Rudiger and Gabius, 2001**).

1.5.4. Lectines de micro-organismes

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôtes. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (**Imberty et Varrot, 2008 ; Sharon, 1996**).

L'exemple le plus marquant de lectines de virus est l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza virus). Cette hémagglutinine interagit avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, l'acide 5-N-acétylneuraminique (l'acide sialique). Sa structure 3-D a été résolue en complexe avec son récepteur naturel et avec 12 analogues de ligands (**Weis et al., 1990**).

Les lectines bactériennes connues peuvent être classées en trois familles principales : les lectines *fimbriaes* (pili et flagelles), les *toxines* et les lectines *solubles* (**Imberty et al., 2005**).

Les lectines fimbriaes sont trouvées dans des organelles de surface des bactéries (pili et flagelles) qui présentent diverses fonctions telles que la reconnaissance des glycannes de l'hôte et l'adhésion sur les surfaces de cellules cibles. Il existe trois types de pili : les types IV, les types I et les types P. Par exemple, la PapG est une adhésine du pili de type P trouvée chez les souches uropathogènes de la bactérie *Escherichia coli*. PapG présente une grande importance dans la phase d'adhésion sur les globosides (GbO4) des cellules humaines du rein lors des infections urinaires et la structure en complexe avec la partie tetrasaccharide du

GbO4 a été résolue (**Dodson et al., 2001**). Les lectines de cette famille ont une structure allongée avec un repliement de type b-sandwich.

La famille des toxines est constituée par des protéines secrétées par les bactéries et qui exercent une activité toxique sur les cellules de l'hôte. Les toxines du type AB₅ sont secrétées par différentes bactéries comme *Shigella dysenteriae*, *Borderella pertussis* et *Vibrio cholerae*.

Le domaine lectine de la toxine sécrétée par le *Vibrio cholerae* est un b-pentamère et sa structure a été résolue complexée avec le pentasaccharide GM1 qui est un ganglioside présent sur les epithelia (**Merritt et al., 1994**).

La famille de lectines *solubles* comprend des protéines cytoplasmiques telles que PA-II et PA-III de *Pseudomonas aeruginosa* respectivement spécifiques pour le α -D-galactose et le α -L-fucose. Elles présentent des structures tétramériques ou deux ions calciums respectivement sont impliqués dans le site de reconnaissance du sucre (**Imberty et al., 2004**).

Les protozoaires possèdent aussi des lectines. La surface de l'amibe pathogénique *Entamoeba histolytica* présente deux lectines reconnaissant respectivement le GlcNAc et le Gal/GalNAc (**Mirelman et al., 1996**). Des lectines ont été isolées à partir du merozoïde de *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable de la malaria (**von Itzstein et al., 2008**) et de *Trypanosoma cruzi* qui cause la maladie de Chagas (**Marcipar et al., 2003**). Seule la structure tridimensionnelle de la lectine TgMIC1 identifiée dans le micronème du protozoaire *Toxoplasma gondii* a été démontrée complexée avec 6-siallylgalactosamine (PDB 2JH7) et 3-siallylactosamine (**Figure 4**). Des protéines du micronème (MIC) sont libérées à la surface du parasite juste avant l'invasion des cellules hôtes et jouent des rôles importants dans l'identification, l'attachement et la pénétration de la cellule hôte (**Blumenschein et al., 2007**).

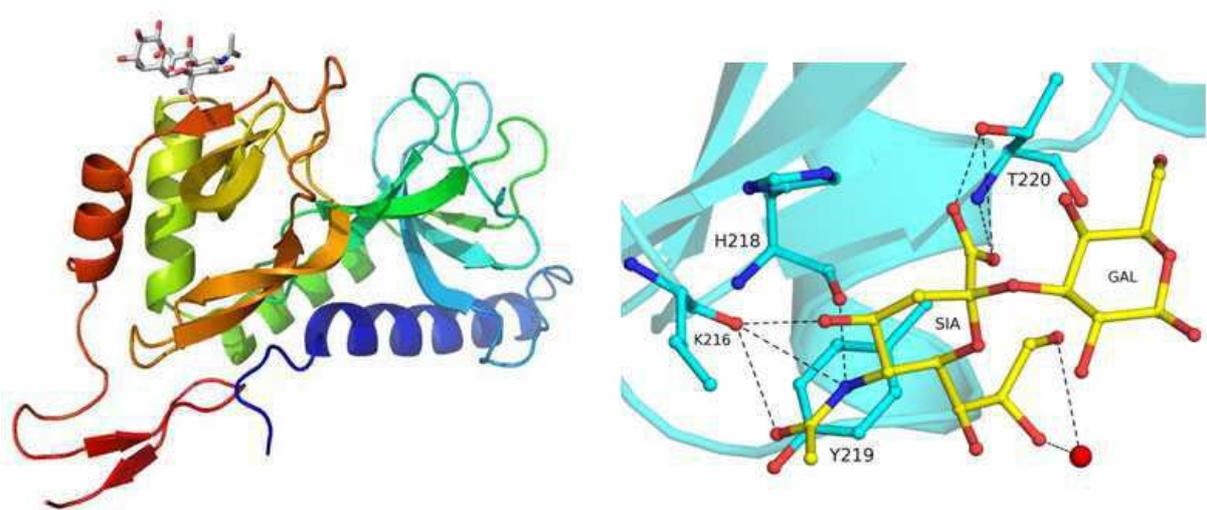


Figure 4: repliement général de la lectine du micronème TgMIC1 chez *Toxoplasma gondii* (gauche, PDB 2JH1). Zoom dans le site de fixation du complexe TGMIC1-6-siallylgalactosamine (droite, PDB 2JH7) (Blumenschein *et al.*, 2007).

2. Les Actinomycètes

2.1. Caractéristiques générales

2.1.1. Morphologie

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifiés. Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**). Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu,
- des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides,
- des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges tel que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

Les spores peuvent, selon les genres, 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, flexibles ou en spirales (**Figure 5**). De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien. 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 (**Errakhi, 2008**).

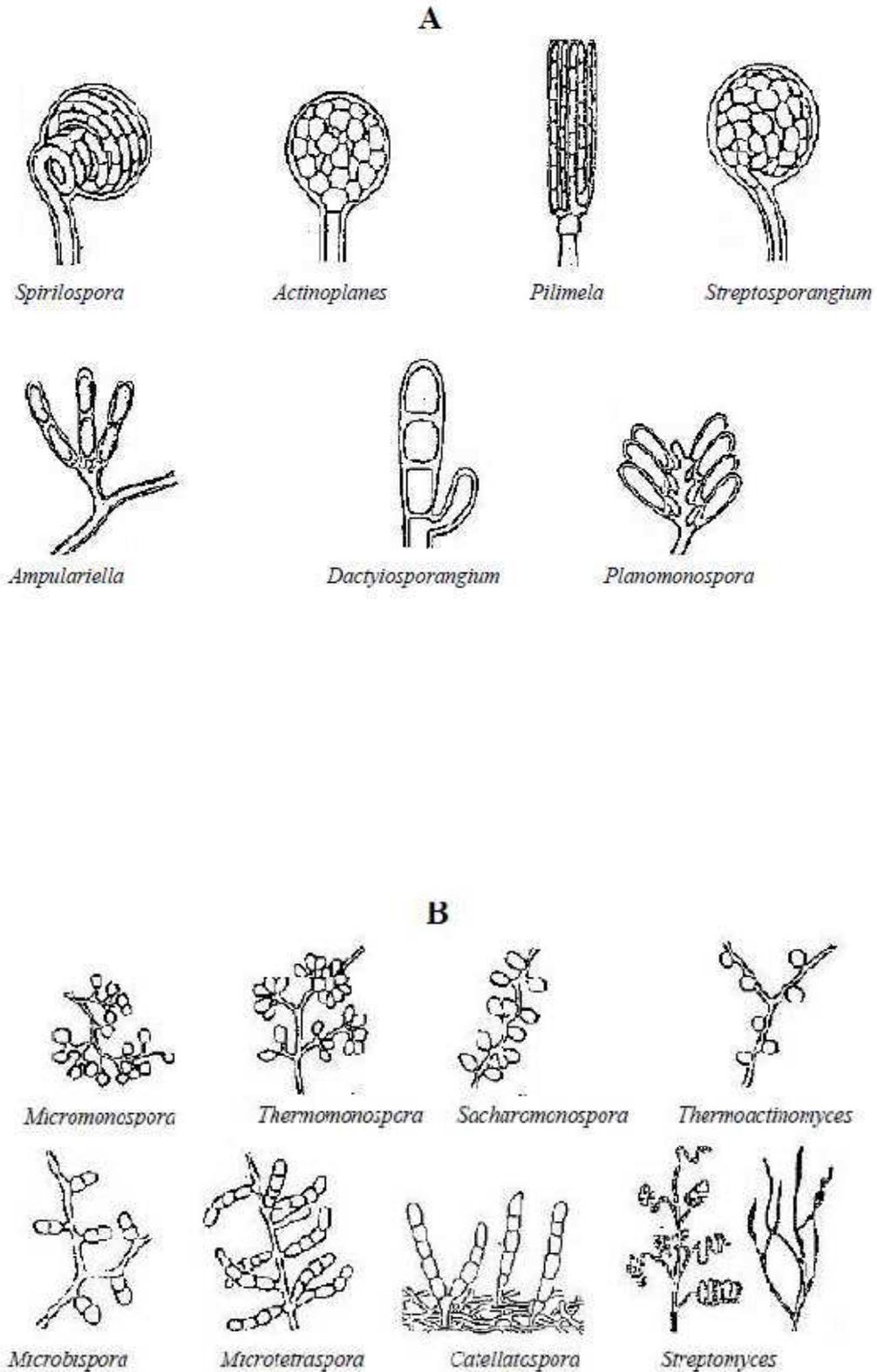


Figure 5: différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008).

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**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 des pellets (**Figure 6**).

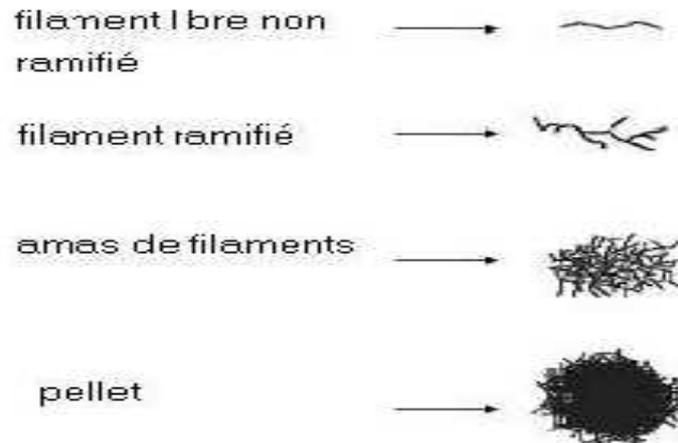


Figure 6: les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (**Pamboukian *et al.*, 2002**).

2.1.2. Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**).

En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air (**Reponen *et al.*, 1998**). Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Mincer *et al.*, 2002 ; Zaitlin *et al.*, 2003**).

Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts (**lacey, 1997 ; Song *et al.*, 2001**). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpent et Larpent-Gourgau, 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi *et al.*, 1992 ; Thirupl *et al.*, 2001**).

En général, les actinomycètes sont des chimo-organotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent a des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides (**Alexander, 1977**).

Ce groupe de bactéries joue un rôle significatif dans la dégradation de la cellulose et la lignine (**Kuster, 1978**). Parmi les genres appartenant à ce groupe, le genre *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires tels que l'acide indol-acétique (**Khamna et al., 2009**), les toxines, les pigments et les antibiotiques. D'ailleurs l'odeur caractéristique du sol humide provient des matériaux volatiles produits par ces microorganismes tels que la géosmine et les 2 méthyle isoborneol responsables de l'odeur de l'humus (**Wellington et al., 1987**).

2.1.3. La reproduction chez les actinomycètes (exemple type *Streptomyces* sp.)

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes, mais un cycle biologique semblable à certains champignons (**Floyd et al., 1987 ; Sanglier et Trujillo, 1997**). Le cycle de développement des *Streptomyces* débute par la germination des spores, il comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*, puis le tube de germination croit et donne des hyphes non séptés et plurinuclées, ramifiés et ancrés dans le milieu solide appelés le mycélium primaire, de substrat ou végétatif. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien ou secondaire composé d'hyphes dressés sur le mycélium de substrat, leurs extrémités se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées comme le montre la **figure 7** (**Hopwood et al., 1985**).

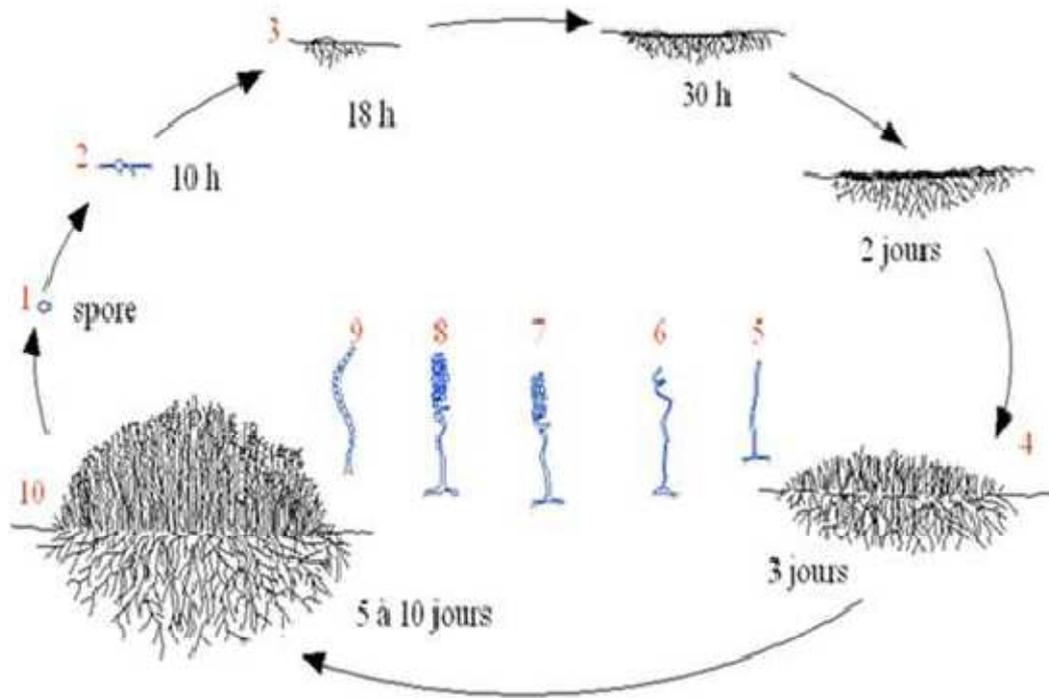


Figure 7: cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

2.2. Classification des actinomycètes

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al.*, 2004), Le **Phylum *Actinobacteria*** (bactéries à Gram positif et GC % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Celle-ci a été décrite par (Stackebrandt *et al.*, 1997).

2.2.1. La classe "*Actinobacteria*"

Stackebrandt *et al.* (1997) ont proposé une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui repose uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit 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 nous trouvons un résidu uracile à la position 955).

Les descriptions des espèces et des genres, basées sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, s'est avérée qu'elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ ARNr 16S (Stackebrandt *et al.*, 1997).

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordre: *Actinomycineae*, *Micrococcinea*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Frankinea*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae* et *Glycomycineae* (Stackebrandt *et al.*, 1997 ; Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2000).

2.2.2. Les clés d'identification des genres et des espèces de l'ordre *Actinomycetales*

a) Caractères morphologiques

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, à l'abondance et à la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, et la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata.

b) Caractères chimiotaxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

- **Acides aminés**

Les *Streptomyces* et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres *Actinomycetales*.

- **Glucides**

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora*.

- **Acides gras**

Les acides gras les plus communs, chez les actinomycètes appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*.

c) Les acides nucléiques

Les déterminations portent sur le GC%, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN, sur le taux d'hybridation ADN – ADN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Au-delà de 70 % de similitude, deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**).

2.3. Rôle des actinomycètes en biotechnologie

2.3.1. Amélioration de la qualité de sol agricole

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole. En effet, ils contribuent à la fertilisation du sol. Ils contribuent aux processus de recyclage et de la biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux (**Goodfellow et al., 1984**). Les Actinomycètes ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement dégradables ou non, par les autres microorganismes, comme les polymères complexes: les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines avec plus de 200 espèces d'angiospermes, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi et al., 1992; Thirupl et al., 2001; Pawlowski et Sirrenberg, 2003**).

Ces bactéries contribuent également au maintien d'une bonne structure du sol. En effet, leur structure filamenteuse ainsi que la production des polysaccharides permettent le maintien entre les particules du sol (**Kennedy, 1999**). Ils améliorent aussi l'infiltration de l'eau dans le sol et permettent ainsi une bonne aération du sol (**Mckenna et al., 2002**).

Outre la structure et la fertilité du sol, les actinomycètes augmentent le pouvoir suppressif du sol. **Mazzola (2002)** a montré qu'un sol riche en actinomycètes est suppressif aux maladies phytopathogènes qu'un sol pauvre de ces bactéries (**Errakhi, 2008**).

2.3.2. Production d'antibiotiques

En effet les actinomycètes constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle (**Takahashi et Omura, 2003 ; Hayakawa et al., 2004**). Plus de 70% des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (**Gundliffe, 2006**). Les actinomycètes produisent un grand nombre d'antibiotiques de structures chimiques très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, macrolides, etc...) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (**Okami et Hotta, 1988**).

Le genre *Streptomyces* a été largement exploré pour la sélection des agents de biocontrôle (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b**) et 75% des antibiotiques sont produits par les membres de ce genre. Récemment, les chercheurs se sont focalisés à la recherche des actinomycètes rares (autres que *Streptomyces* sp.) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Ainsi, plusieurs antibiotiques antifongiques, produits par des actinomycètes non-*Streptomyces*, ont été purifiés.

2.4. Rhizosphère et microflore

2.4.1. La rhizosphère et les exsudats racinaires

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (**Campbell et Greaves 1990; Westover et al., 1997**). Elle se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines, et elle est, généralement, divisée en deux parties:

- La rhizosphère au sens strict correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.
- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines (**Soufiane, 1998**).

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire (**Lesuffleur et al., 2007**). Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de

photosynthèse passent dans le système racinaire (**Whipps, 1990**). Les exsudats représentent la partie la plus importante des substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale.

Ils sont généralement composés de sucres, d'acides aminés, de facteurs de croissance, de vitamines, d'enzymes et d'acides organiques. Ils représentent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique) (**Soufiane, 1998**).

2.4.2. Microflore rhizosphérique Microorganismes et actinomycètes rhizosphériques

Les interactions entre les micro-organismes sont nombreuses et très intenses au niveau de la rhizosphère qui est une zone riche en matière organique et où les populations microbiennes sont très abondantes. Ces interactions sont catalysées **par** les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de micro-organismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (**Curl et Truelove, 1986**). Ces interactions sont généralement représentées par les phénomènes de commensalisme, mutualisme et antagonisme.

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones (**Lebuhn et al., 1997**), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments (**Soufiane, 1998**). La composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante. La démonstration en a été apportée par les travaux de Neal en 1973 sur les blés de printemps.

Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux (**Davet, 1996**) suivi des champignons. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux.

Les bactéries filamenteuses ou actinomycètes manifestent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins, cet antagonisme résulte de la sécrétion de substances antibiotiques.

Généralement il est admis que dans le sol relativement sec, humique et calcaireux les actinomycètes représentent la fraction dominante de la microflore avec des cellules viables de l'ordre de $10^6/\text{g sol}$ (**Goodfellow et Williams, 1983**). Cependant dans les sols submergés, anaérobies ou acides le nombre est relativement faible $10^2/\text{g sol sec}$.

Williams et Wellington (1982) ont rapporté que parmi les actinomycètes la fréquence d'isolement des *Streptomyces* est de 95,3%, des *Nocardia* de 1,98%, des *Micromonospora* de 1,4%, des *Actinoplanes* de 0,20%, des *Microbispora* de 0,18%, des *Actinomadura* de 0,10%,

des *Streptosporangium* de 0,10%, *Thermoactinomyces* 0,14%, *Thermomonospora* 0,22% et des *Pseudonocardia* de 0,06%.

Souvent, un nombre important d'actinomycètes est rencontré dans la rhizosphère que dans le sol environnant, il dépend de l'espèce et de l'âge de la plante (**Goodfellow et Williams, 1983**). L'effet rhizosphérique est exprimé par le ratio R : S (Rhizosphère : Sol). Par exemple, le maïs et la fève abritent de 10 à 18 fois plus d'actinomycètes dans leur rhizosphère par rapport au sol avoisinant (**Abraham et Herr, 1964**). Le R:S des plantes sahariennes varie de 16 à 50 (**Watson et Williams, 1974**). Le pourcentage des actinomycètes producteurs d'antibiotiques est significativement plus élevé chez les isolats rhizosphériques, par comparaison avec ceux du sol avoisinant (**Basil et al., 2004**).

Matériel et Méthodes

1. Souches actinomycétales

Six souches actinomycétales ont été choisies pour la réalisation de cette étude. Ces souches sont conservées au laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (Université des frères Mentouri de Constantine). Ces souches ont été isolées de la rhizosphère et identifiées par le Dr. Aouar Lamia (**Aouar et al., 2012**). L'identification a été réalisée par l'étude des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S. Quatre de ces isolats ont été apparentés aux espèces suivantes du genre *Streptomyces* : *S. griseus* Lac1, *S. rochei* Lac3, *S. anulatus* Pru14 et *S. champavatii* Pru16. Les deux autres isolats Vic8 et Pin10 ont été classés dans le genre *Nocardiopsis* et ont été identifiés comme *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 et *N. alba* Pin10 (**Tableau 4**).

Le choix de ces souches a été motivé par leur origine, et leur appartenance à des genres d'actinomycètes capable d'inhiber une large gamme de champignons et bactéries phytopathogènes. En effet, les 6 souches choisies, (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16) inhibent, d'une part au moins, la croissance de six des sept champignons testés et d'autre part au moins cinq des dix bactéries pathogènes testées.

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

Tableau 4: souches actinomycétales utilisées.

Isolat	Espèce	Rhizosphère	Gène ARN r16S	
			Nombre de nucléotides/ séquences	Numéro d'Accession
Lac1	<i>Streptomyces griseus</i> Lac1	<i>Lactuca sativa</i>	1376	HQ184949
Lac3	<i>Streptomyces rochei</i> Lac3	<i>Lactuca sativa</i>	1373	HQ184950
Vic8	<i>Nocardioiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> Vic8	<i>Vicia fabae</i>	1380	HQ184951
Pru14	<i>Streptomyces anulatus</i> Pru14	<i>Prunus domestica</i>	1370	HQ184952
Pru16	<i>Streptomyces champavatii</i> Pru16	<i>Prunus domestica</i>	1358	HQ184953
Pin10	<i>Nocardioiopsis alba</i> Pin10	<i>Pinus halepensis</i>	1394	HQ184954

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

1.1.1. Fermentation

Afin de mettre en évidence la production de lectines chez les six souches actinomycétales choisies, et de sélectionner les meilleures conditions de production, les bactéries sont cultivées sur 2 milieux de culture différents *ISP₂* (*International Streptomyces Project- meium two*) et *Bennett*). Ces deux milieux diffèrent par leur composition ainsi que les sources énergétiques qu'ils peuvent apporter (**Annexe 1**).

L'ISP₂ est un milieu préconisé pour la croissance et la sporulation des actinomycètes d'une manière générale, il est majoritairement constitué d'extrait de malt et de maltose comme source de carbone et d'énergie (Shirling et Gottlieb, 1976). Le milieu Bennett, riche en glucose, est préconisé, lui, pour la croissance des espèces appartenant aux genres *Nocardia* et *Streptomyces* (Jones *et al.*, 1949).

Une suspension sporale est préparée pour chaque souche dans de l'eau physiologique stérile. Chaque suspension doit avoir une concentration initiale en spore de 10⁶ spores/mL. Des précultures sont ensuite effectuées dans des Erlenmeyers de 500 mL avec les deux milieux de cultures. Le volume de préculture est de 100 mL soit 20 % (volume liquide/volume Erlenmeyer). Les pré-cultures sont placées 3 jours dans un incubateur thermostaté à 30°C, et à agitation orbitale fixée à 250 rpm (rotation par minute). Après incubation, 25 mL 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 six souches sont incubées à 30°C pendant 6 jours.

1.1.2. Extraction des lectines

a) 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 phase exponentielle de croissance par centrifugation à 4000 g pendant 20 min, les surnageants sont récupérés, filtrés (membrane 0,22 µm PP, Millipore) et immédiatement soumis à un test d'hémagglutination pour mettre en évidence la présence des lectines extracellulaires.

b) 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 re-suspendus dans le même tampon afin d'obtenir une suspension à 20%. Après un traitement aux lysozymes (0,2 mg/mL, 10 min 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 25000g pendant 30 minutes à 4°C, et les surnageant obtenues sont immédiatement filtrés (membrane 0,22µm PP, Millipore) et testés.

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

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (**Goldstein *et al.*, 1980 ; Rüdiger, 1993**). Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. 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. Les érythrocytes de plusieurs mammifères sont parmi les plus utilisées (humain, lapin, mouton, rat, etc...).

L'activité hémagglutinante des extraits extra/intracellulaires des six souches actinomycétales a été testée dans des microplaques de titration. 50 µL de tampon PBS sont placés dans chaque puits de la microplaque, puis 50µL de chaque extrait sont ajoutés dans le premier puits, et une double dilution en série est réalisée. Ensuite, 50 µL de la suspension d'érythrocytes à 4% v/v en solution saline (NaCl 150 mM) (**Annexe 2 et 3**) sont ajoutés et mélangés à chaque puits. Les échantillons sanguins de rongeurs (rat, lapin e souris) et d'humains (ABO) ont été, respectivement, obtenus à partir d'animaux élevés dans l'animalerie de l'université de Constantine et du service d'hématologie du CHU de Constantine.

La lecture de l'activité hémagglutinante est réalisée après 30 minutes d'incubation à 37°C.

Dans le cas d'un résultat positif, les hématies forment un tapis qui couvre le fond du puits de la plaque de microtitration. Contrairement, un résultat négatif ou l'hémagglutination n'a pas eu lieu, nous observons que tous les érythrocytes précipitent au fond du puits, et un point rouge peut être observée (**Figure 8**).

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. Si l'hémolyse a eu lieu, 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 sera sélectionnée pour la suite de notre travail.

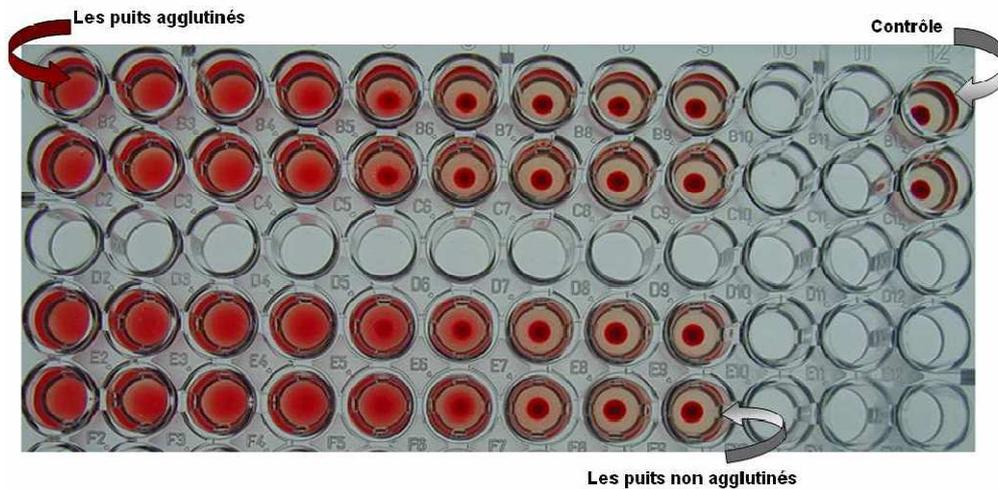


Figure 8: le test d'hémagglutination sur microplaque de titration.

1.1.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales des différents extraits est réalisé selon la méthode de **(Bradford, 1976)**, et la *bovine serum albumin* (BSA) a été utilisée comme standard. La rapidité (maximum d'adsorption au bout de 2 à 5 minutes) et la sensibilité de la méthode (peut atteindre 1-20µg de protéines) déterminent la haute qualité de cette méthode.

Les concentrations protéiques des extraits sont déduites à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 4**).

2. Purification des lectines de la souche Pru16 et Vic8

La meilleure activité hémagglutinante spécifique a été obtenue avec du sang de rat en présence de l'extrait intracellulaire des souches Pru 16 et Vic 8 cultivées sur milieu *ISP₂*. Le milieu *ISP₂* a été retenu pour la culture de ces deux souches et le sang de rat pour le test d'hémagglutination.

2.1. Préparation de l'extrait brut (Figure 9)

Les deux souches Vic 8 et Pru16 cultivées dans 2 litres de milieu *ISP₂*, pendant 6 jours sur plaque d'agitation (250 rpm), à 30°C. Le mycélium bactérien, en poids humide, récolté est de 90 g par centrifugation à 4000g pendant 20 min, 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. Les filtrats obtenus sont ensuite concentrés par ultrafiltration (Vivaspin, seuil de rétention 10 kDa) puis conservés dans un congélateur à -20°C. C'est cet extrait qui sera utilisé pour la purification, la caractérisation, et les différents tests biologiques.

2.2. Purification préliminaire

2.2.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Les protéines sont toutes précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles sont remarquablement résistantes alors que d'autres précipiteront très facilement (**Rosenberg, 1996 ; Shuler et Kargi, 2002**). C'est cette différence de solubilité qui permet de séparer les protéines. Pour cela le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le sel le plus utilisé, sa solubilisation ne dénature pas les protéines (**Scope, 1994**).

L'extrait brut (50 mL) de la souche PRu16 et Vic 8 sont 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 20000g pendant 30min, les protéines précipitées sont récupérées dans 2 mL de tampon Tris-HCl (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl). 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.

2.2.2. Dialyse

La dialyse est une méthode de séparation basée sur le mouvement des molécules à travers une membrane semi-perméable (Boudin) du milieu plus concentré au moins concentré. Seules les molécules dont la taille est inférieure au diamètre des pores de la membrane sont capables de diffuser de part et d'autre et d'atteindre l'équilibre avec le volume total de la solution dans le système, telles que celles du solvant, des sels et des petits métabolites. Par contre, les macromolécules comme les protéines ne sont pas diffusibles où elles seront

retenues dans le même compartiment de la membrane comme au début de l'expérience (Voet *et al.*, 2005 ; Hames *et al.*, 2006).

Les protéines précipitées mises en suspension dans un volume réduit du tampon Tris-HCl (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl) en boudin sont dialysées contre 2 litres du même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable (Boudin) (Spectra/por ; 20 mm ; limite d'exclusion: 12 kDa) sous une faible agitation à 4°C. Le tampon de dialyse est renouvelé 3 fois à chaque 6h. L'activité hémagglutinante de chaque fraction protéique est testée, et les meilleures fractions actives seront utilisées pour la prochaine étape.

2.2.3. Chromatographie

Afin de purifier des lectines produites par la souche Pru16 et Vic8, et de choisir la meilleure procédure de purification, différents types de colonnes chromatographiques ont été préparées et testés : chromatographie sur gel filtration Sephadex G-75, chromatographie d'affinité sur gel Sepharose 4B-mucine et colonnes d'affinités Sepharose 6B couplé à différents substrats glucidiques (N-acétyl Glucosamine, N-acétylGalactosamine, fucose, mannose, galactose, acide sialique).

a) Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75)

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.

La phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G-75 (Pharmacia) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Le Sephadex G-75 possède un domaine de fractionnement situé entre 5 à 70 kDa.

Une colonne d'une dimension de (1x50cm) a été préparée. La colonne est équilibré avec du tampon Tris-HCl (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM 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 dextrane (10³ kDa) à une concentration de 1 mg/mL.

La fraction active est lyophilisée pour la réalisation des différents tests biologiques. Plusieurs purifications ont été nécessaires pour obtenir une bonne quantité d'extrait.

b) Purification sur une colonne Mucine Sépharose 4B

La lectine a été purifié en utilisant une Chromatographie d'affinité. La mucine de l'estomac du porc (Sigma) a été couplé à du Sepharose activé par CNBr-4B (GE Healthcare, USA) selon les instructions du fabricant. La matrice d'affinité a été introduite dans une colonne de verre (1x10 cm, GE Healthcare, États-Unis) et équilibrée avec un tampon

phosphate salin (0,1 M ; pH 7,2). La fraction du pic 1 extrait de lectine brut a été chargée à débit réduit. La colonne a, ensuite, été lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm de la fraction (1,0 ml) a chuté en dessous de 0,02.

La lectine liée a été éluée par 0,2 M de glycine 0,5 M de NaCl à pH 2,8 à un débit réduit de 1 ml/min. Les fractions éluées ont été contrôlées à l'activité de la lectine et la teneur en protéines (**Bradford, 1976**) .

Les fractions de lectines positives ont été regroupées et dialysées contre une solution saline tamponnée au phosphate (0,1 M ; pH 7,2) en utilisant un tube de dialyse de peau de serpent (MWCO 10 kDa; Pierce Biotech, USA). Le titre des lectines et la teneur en protéines des fractions combinées ont été analysées. Les fractions positives de lectines ont été concentrés dans l'unité ultraspin " Centricon " (30 kDa ; Millipore, USA) puis le titre des lectines et la teneur en protéine des fractions concentrées ont été déterminées.

3. Caractérisation des lectines de la souche Pru16

3.1. Test d'hémagglutination (Rüdiger, 1993)

L'activité hémagglutinante des différentes fractions protéiques obtenues après purification sur colonne d'affinité mucine sépharose 4B est testée sur des microplaques de titration 50 µL de tampon Tris HCL 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.

3.2. Test d'hémagglutination du lysozyme C

L'activité hémagglutinante du lysozyme C a été testée sur une microplaque de titration contenant 50 µL de tampon Tris HCL dans chaque puits, ensuite 50 µL d'une solution de lysozyme C à une concentration de 1mg/mL est ajoutée 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 est ajouté et mélangé à chaque puits, et la plaque est ensuite incubée à 37° C pendant 45 minutes.

3.3. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) (**Goldstein et al., 1980**), 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'héماغglutination 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 tris HCl pH=7,2 de façon à obtenir une concentration correspondant à 8 UH.

Différents sucres et glycoprotéines ont été préparés à une concentration initiale de 400 mM et de 1 mg/mL respectivement, dans du tampon Tris HCl pH 7,2.

Un volume de 50 µL 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 25 µL de la fraction active est ajouté à chaque puits contenant 25 µL de sucre/glycoprotéine à tester. Après incubation 30min à 37°C, 50 µL d'une suspension d'érythrocytes de rat à 4% v/v sont ajoutés à chaque puits. L'inhibition de l'héماغglutination est lue après 60 min d'incubation à température ambiante.

3.4. Effet de la température, du pH, et de l'EDTA sur l'héماغglutination

L'effet de la température sur l'activité héماغglutinante est déterminé en incubant la fraction active (1mg/mL) à différentes températures (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 ° C) pendant 1h. Les échantillons sont ensuite rapidement refroidis dans de la glace. L'activité héماغglutinante est testée en comparaison avec un échantillon témoin de lectines (32 UH).

Pour tester l'effet du pH, des échantillons de lectines sont dialysés pendant 24 h contre différentes solutions tampons à différents pH [3-11] : 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 de glycine et NaOH (pH 10,0 à 11,0). L'activité héماغglutinante est testée après une 2^{ème} dialyse des échantillons contre du tampon HEPES, pH=7.2 pendant 18h à 4°C.

Afin de déterminer l'effet de l'EDTA sur l'héماغglutination, des échantillons de la fraction active sont incubées dans un volume équivalent de tampon HEPES (pH 7,2) additionné d'EDTA (Concentrations initiales : 10, 20 et 40 mM) pendant 1 h. Les échantillons sont, ensuite, distribués dans des puits de plaque de microtitration et l'activité d'héماغglutination est mesurée comme décrit précédemment.

Les érythrocytes de rat ont été utilisés pour le test d'héماغglutination, et trois répétitions ont été effectuées pour chaque essai. Les résultats de l'activité héماغglutinante des échantillons traités sont exprimés en pourcentage par rapport à l'échantillon témoin qui représente 100%.

3.5. Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE de la fraction active obtenue et de l'extrait brut est réalisée en conditions dénaturantes sur gel polyacrylamide à 15% (**Laemelli, 1970**) (**Annexe 6**). Les échantillons à analyser ont été réduits puis chauffés à 100°C pendant 5 min, et finalement chargés dans les puits d'un gel polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur. Le kit de marqueurs moléculaires 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 à 0,04 % (p/v) ; Coomassie brillant blue R-250 à 40 % (v/v) ; méthanol à 10 % (v/v) et acide acétique glacial à 10 % (v/v) pendant 24h. L'excès de colorant est ensuite éliminé par une solution à 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. Étude protéomique et spectrométrie de masse (Figure 10)

L'analyse protéomique 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 sont ionisés par nanoélectrospray et conduits dans le spectromètre de masse Q-Exactive-plus pour des analyses MS et MS/MS en parallèle.

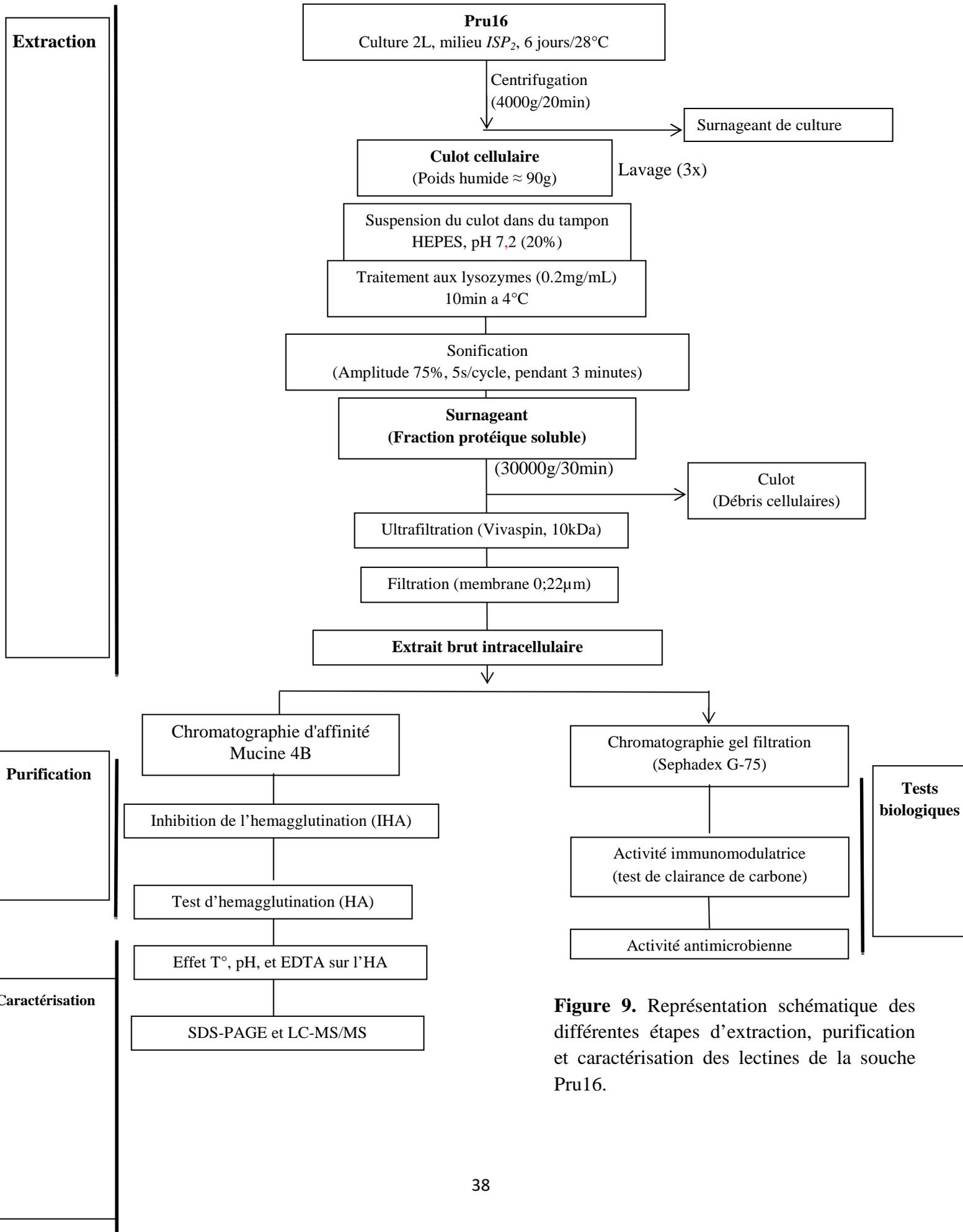


Figure 9. Représentation schématique des différentes étapes d'extraction, purification et caractérisation des lectines de la souche Pru16.

4. Étude protéomique et spectrométrie de masse

4.1. Nano HPLC Q-Extractive plus et analyse par spectrométrie de masse LC-MS

Les peptides obtenus par digestion trypsinique (1µL) sont chargés dans une précolonne de concentration (Acclaim 5 µm, 300 µm i.d x 5 mm) utilisant une injection en boucle partielle. La colonne est lavée avec du tampon A1 (5% v/v d'acétonitrile et 0,1% v/v d'acide formique) pendant 5 min à un débit de 10 µL/min, et les peptides sont ensuite élués et séparés sur une nano colonne C18 reverse-phase (Acclaim PepMap100 C18, 3 µm, 75 mm i.d. × 500 mm). L'éluion 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 250 nL/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-Exactiv-plus pour des analyses MS.

Une analyse MS à haute résolution (70 000V à $m/z = 400$, AGC réglé sur 10^6 ions avec un temps de remplissage de 180 ms) 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 500V avec $m/z = 200$ (AGC réglé sur 10^5 ions avec un maximum de temps de remplissage de 120 ms). L'énergie de collision normalisée est de 28 eV.

4.2. Traitement bioinformatique des données

Le logiciel Proteome discover 1.4 (Thermos 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 Pru 16 68184), en incluant la possibilité de modifications suivantes : Oxydation des méthionines, tryptophane, histidine, désamidation del'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 utilisées pour la filtration des peptides.

4.3. Nano LC-ESI-MS/MS

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).

L'échantillon peptidique (conditionné dans 100 mM 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% v/v d'acétonitrile, 20 mM de formiate d'ammonium, pH 10) et (65% v/v d'acétonitrile, 20 mM 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 2 µL/min. Les peptides sont ensuite élués de 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 relié à un émetteur PicoTip (uncoatedSilicaTip™ 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 corrigés 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 2000 Da. 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.

4.4. Traitement bioinformatique et identification des protéines

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

- base de données SwissProt,
- digestion trypsinique des proteines,
- 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 cysteine (carboxyamidomethylation fixe) et 15,99 Da sur les résidus methionine (oxydation dynamique),
- un maximum d'une seule erreur de clivage et un taux de faux positifs à 4% a été autorisé.

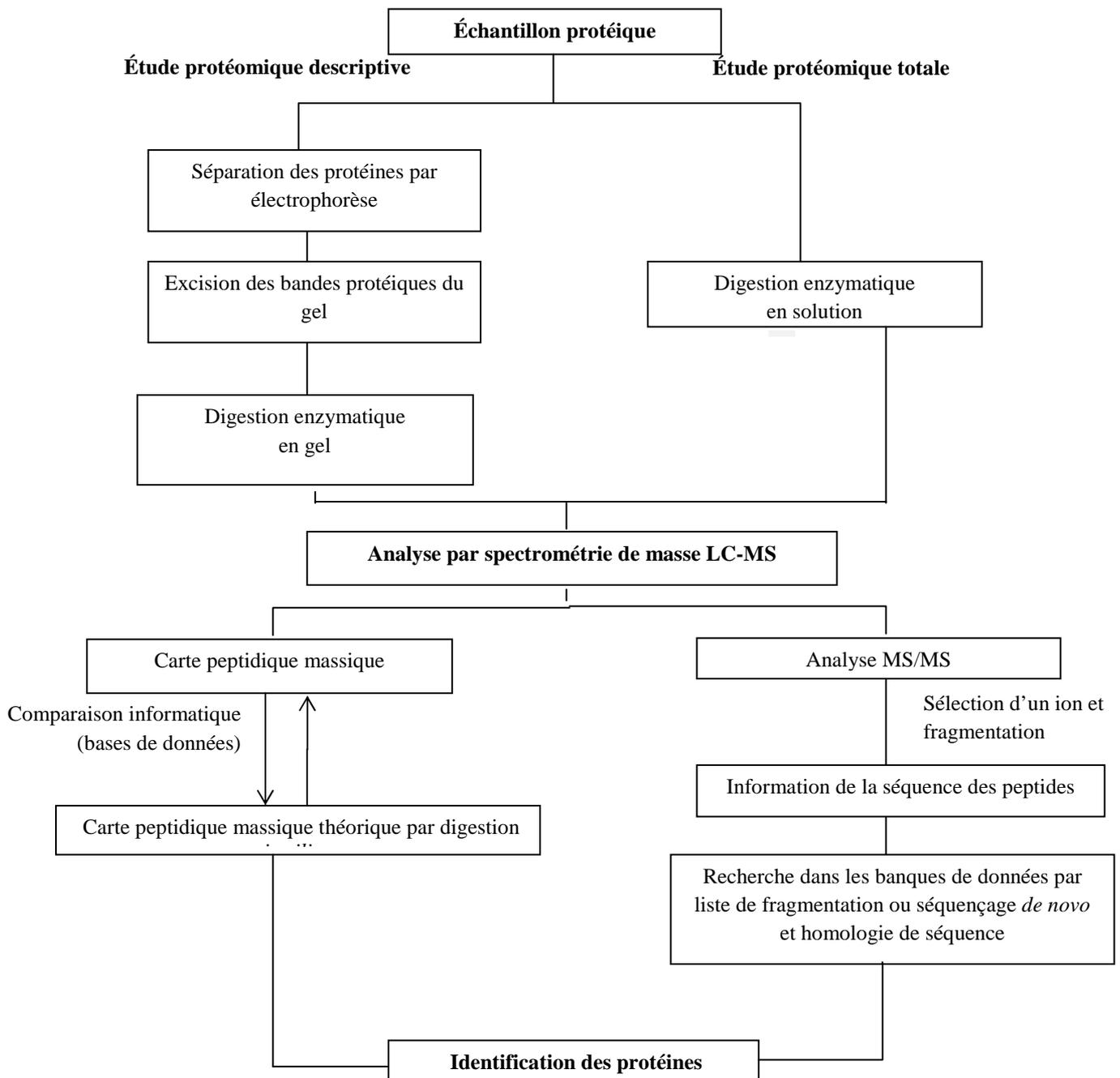


Figure 10 : identification protéique par spectrométrie de masse.

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 obtenues 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.

5. Activités biologiques de la fraction active

5.1. Activité antimicrobienne

5.1.1. Les souches tests

La fraction active obtenue après gel filtration et chromatographies d'affinité a été testée pour mettre en évidence son activité antimicrobienne, 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, *Klebsiellapneumoniae* 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 *Fusariumoxysporum* 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 UFC/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 0,125 mg/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 *Fusariumoxysporum* CIP 625.72 sontensemencées par piqure 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 µL d'échantillon à tester. Ces disques sont 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. Activité immunomodulatrice *in vivo* de l'extrait intracellulaire de la souche Vic8

5.2.1. Test de clairance de carbone

L'effet immunomodulateur de l'extrait hémagglutinant obtenu après purification sur colonne G75 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., 1970**). 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 présents 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 clairance des particules de carbone par les cellules phagocytaires sera très important, à l'inverse d'une immunosuppression ou le taux de clairance du carbone sera très faible.

5.2.2. 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 directives fournies par le guide du comité d'éthique sur l'expérimentation animale (CPCSEA).

5.2.3. 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 48 h, les souris reçoivent une autre injection intraveineuse d'une solution aqueuse d'encre de chine (Encre de chine: 3 mL ; eau physiologique : 4 mL et solution de gélatine à 3% : 4 mL) à une dose de (0,1 mL/10g). Des échantillons sanguins sont prélevés à partir de la veine rétro orbitale grâce à des tubes capillaires à hématocrites après 5 et 15 min de l'injection. Les prélèvements sanguins (30 µL) 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 675 nm (**Satnam 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-endothéliales 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 exprimée quant à lui par la période de demi-vie des particules de carbone dans le sang ($t_{1/2}$ min). Ces paramètres sont calculées au moyen des équations suivantes: (**Biozzi et al., 1970**):

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

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

5.2.4. 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%.

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

Les extraits extracellulaire et intracellulaire de six actinomycètes isolés de la rhizosphère de différentes plantes, ont été analysées pour leur production de lectines, par hémagglutination des hématies. Pour cela, ces différentes souches d'actinomycètes ont été cultivées sur deux milieux de culture différents (ISP_2 et Bennett). Les souches lac3, Pru 16, Pru 14, Vic 8 ont pu croître, fortement, que sur le milieu ISP_2 , et en revanche Pin10 et Lac1 ont montré un fort développement sur le milieu Bennett.

Après extraction des différentes fractions protéiques (intra et extracellulaires), un test d'hémagglutination a été réalisé en utilisant trois types d'érythrocytes différents (les érythrocytes de rat, lapin, souris) et avec les différents groupes sanguins humains (ABO). à titre d'exemple voir ci-dessous la figure 11.

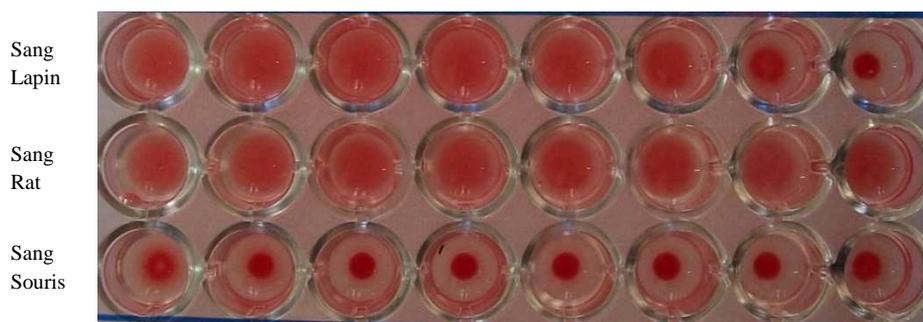


Figure 11 : test d'hémagglutination (extrait intracellulaire de la souche Pru16, cultivée sur milieu ISP_2 , en présence d'érythrocytes de rat, lapin et souris.

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. Les extraits extracellulaires des souches Lac1, Vic 8, Pru14 ne présentent aucune activité avec les deux milieux de culture utilisés. Nous remarquons que l'activité hémagglutinante exprimée en unités hémagglutinantes (UH = unités hémagglutinantes correspondant à la dilution) est 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.

Les meilleures activités sont observées avec les extraits de la souche Pru16 et Vic8, notamment avec les érythrocytes de rat et de lapin (**Tableau 5**). Le milieu ISP_2 favorise

l'activité hémagglutinante en comparaison avec le milieu Bennett. La production de lectines par les souches bactériennes semble dépendre de la composition de base du milieu de culture

Tableau 5: activité hémagglutinante des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocyte utilisé.

Isolat	Nom des Souches	Nature de l'extrait	Milieux de culture	
			ISP ₂	Bennett
Lac1	<i>Streptomyces griseus</i> .	IC	Pas d'hémagglutination	R (16)* L (32)
Pru16	<i>Streptomyces champavatii</i>	EC	R (128) L (64) S (32)	R (128) L (256) S (128)
		IC	R (1024)* L (256) S (64)	R (256) L (128) S (64)
Vic8	<i>Nocardioiopsis dasssonvillei</i>	IC	R (256)	Pas d'hémagglutination
Pru14	<i>Streptomyces anulatus</i>	IC	R (32) L (32)	Pas d'hémagglutination
Lac3	<i>Streptomyces rochei</i> .	EC	R (16) L (16)	Pas d'hémagglutination
		IC	R (8) L (8)	L (8)

(*) Activité hémagglutinante.

IC : extra-intracellulaire ; EC : extrait extracellulaire ; Hémagglutination positif (R : Rat, L : Lapin, S : Souris).

Les résultats du test d'hémagglutination des extraits protéiques extra et intracellulaires des différentes souches actinomycétales montrent que l'extrait intracellulaire de la souche Pru16 présente la meilleure activité hémagglutinante (**Tableau 5**).

Après dosage des protéines, et calcul de l'activité hémagglutinante spécifique qui correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction. Elle est exprimée en unités hémagglutinantes par mg de protéines (UH/mg). Ainsi, l'activité la plus prononcée est observée sur les hématies de rat avec l'extrait intracellulaire de la souche Pru16, obtenu après une culture de 6 jours sur milieu ISP₂, activité hémagglutinante spécifique de 8,37 UH/mg (**Tableau 6**)

Tableau 6: activité hémagglutinante spécifique des différents extraits protéiques en fonction du milieu de culture et du type d'érythrocyte utilisé

Isolat	Nom des Souches	Nature de l'extrait	Milieux de culture	
			ISP ₂	Bennett
Lac1	<i>Streptomyces griseus.</i>	IC	Pas d'hémagglutination	R (0,34) L (0,69)
Pru16	<i>Streptomyces champavatii</i>	EC	R (2,09) L (1,04) S (0,26)	R (1,04) L (2,09) S (1,04)
		IC	R (8,37)* L (2,09) S (0,52)	R (2,09) L (1,04) S (0,52)
Vic8	<i>Nocardioiopsis dasssonvillei</i>	IC	R (2,82)	Pas d'hémagglutination
Pru14	<i>Streptomyces anulatus</i>	IC	R (0,35) L (0,35)	Pas d'hémagglutination
Lac3	<i>Streptomyces rochei</i>	EC	R (0,29) L (0,29)	Pas d'hémagglutination
		IC	R (0,14) L (0,14)	L (0,14)

IC : extra-intracellulaire, EC : extrait extracellulaire, Hémagglutination positif (R : Rat, L : Lapin, S : Souris). (*) Activité hémagglutinante spécifique exprimée en UH/mg de protéines.

2. Purification

Afin d'analyser ces hémagglutinines, une culture de deux litres sur milieu ISP₂ a été réalisée pour la souche *Streptomyces champavatii* Pru16. L'extraction de la fraction protéique intracellulaire a été réalisée selon le protocole décrit par (Singh *et al.*, 1993).

2.1. Purification préliminaire

Pour cette étape nous avons retenu l'extrait cellulaire présentant la plus grande activité hémagglutinante. Cependant l'extrait intracellulaire Vic8 a été retenu pour une étude d'immunomodulation (voir tableaux 5 et 6).

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. 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 la fétuine (glycoprotéine riche en mannose).

Malheureusement aucune de ces colonnes ne s'est révélée efficace pour la purification de ces molécules, 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 en trois étapes, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75) suivie d'une colonne mucine sépharose 4B.

Après précipitation différentielle de l'extrait brut de la souche *Streptomyces champavatii* 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%] dont l'activité hémagglutinante totale est de 64 UH. Les fractions F1, F2 et F3 [0-75%] ont été regroupées, puis soumises à une chromatographie sur gel de filtration Sephadex G-75. Le chromatogramme obtenu montre l'élution des deux pics protéiques de la colonne (Sephadex G-75). La fraction protéique du premier pic (PicA) montre une activité maximale de l'ordre de 16 UH correspondant à la dilution 1,25. (**Figures 12 et 13**). Le pic B ne présente aucune activité.

Ainsi, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 8,37 UH/mg, et elle est passée à 14,95 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 20 UH/mg (pic A) après la chromatographie G75. Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 2,38 avec un rendement assez faible de 3,12% (**Tableau 7**).

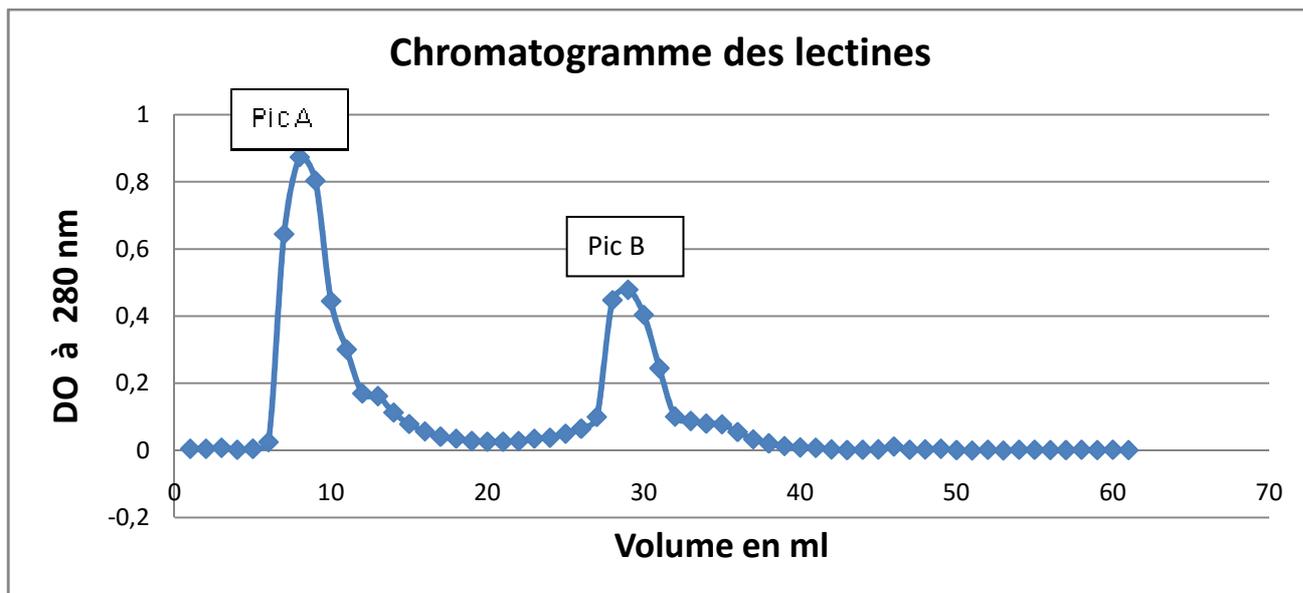


Figure 12: purification préliminaire de l'extrait intracellulaire de la souche Pru16.
Chromatographie sur colonne gel de filtration (Sephadex G-75).

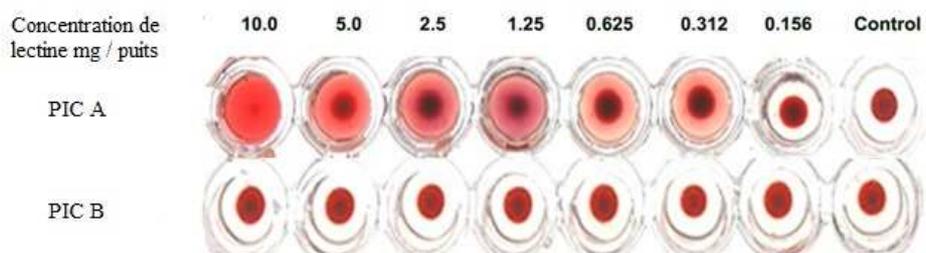


Figure 13 : test d'agglutination des deux pics

Tableau 7: caractéristiques de l'extrait brut et des lectines après purification préliminaire de la souche *S. champavati* Pru16

Fractions	Volume (mL)	Proteines (mg)	Activité Totale (UH) ^a	Activité spécifique (UH/mg) ^b	Indice de Purification ^c	Rendement (%) ^d
Extrait brut	50	122,32	1024	8,37	1	100
Sulfate d'ammonium [25-75%]	2	8.56	128	14.95	1.78	1.25
Sephadex-G75 (Pic A)	3,5	1,60	32	20	2.38	3.12

^{a)} Activité hémagglutinante totale (titre x mL). Les hématies de rat ont été utilisées pour ce test. ^(b) L'activité spécifique (UH/mg) correspond à l'activité totale d'une fraction divisée par la quantité totale de protéines dans la fraction (mg/mL). ^(c) L'indice de purification est définie 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 présent dans une fraction considérée.

2.2. Purification sur colonne Mucine Sépharose 4B

La fraction proteique du pic A (PA) a été purifiée en utilisant une Chromatographie d'affinité mucine de l'estomac du porc (Sigma) couplée à du Sepharose activé par CNBr-4B (GE Healthcare, USA) selon les instructions du fabricant. La matrice d'affinité a été introduite dans une colonne de verre (1x10 cm, GE Healthcare, États-Unis) et équilibrée avec un tampon phosphate salin (0,1 M; pH 7,2).

La fraction protéique du pic A a été chargée à débit réduit. La colonne a, ensuite, été lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm de la fraction 1,0 ml a chuté en dessous de 0,02.

La fraction protéique liée a été éluée par 0,2 M de glycine 0,5 M de NaCl à pH 2,8 à un débit réduit de 1 ml / min. Les fractions éluées ont été contrôlées à l'activité hémagglutinante (lectine) (**Figure 15**) et à la teneur en protéines **Tableau 8**.

Les fractions positives de lectines de 30 à 40 ml du pic 2 (**Figure 15**) ont été regroupées et dialysées extensivement contre une solution saline tamponnée au phosphate (0,1

M; pH 7,2) en utilisant un tube de dialyse de serpent de la peau (MWCO 10 kDa; Pierce Biotech, USA). Le titre de lectines et la teneur en protéines des fractions combinées ont été analysées. Les fractions positives de lectines ont été concentrées dans l'unité ultraspin " Centricon " (30 kDa; Millipore, USA). Le titre de lectines et la teneur en protéine des fractions concentrées ont été déterminées (**Figure 14**).

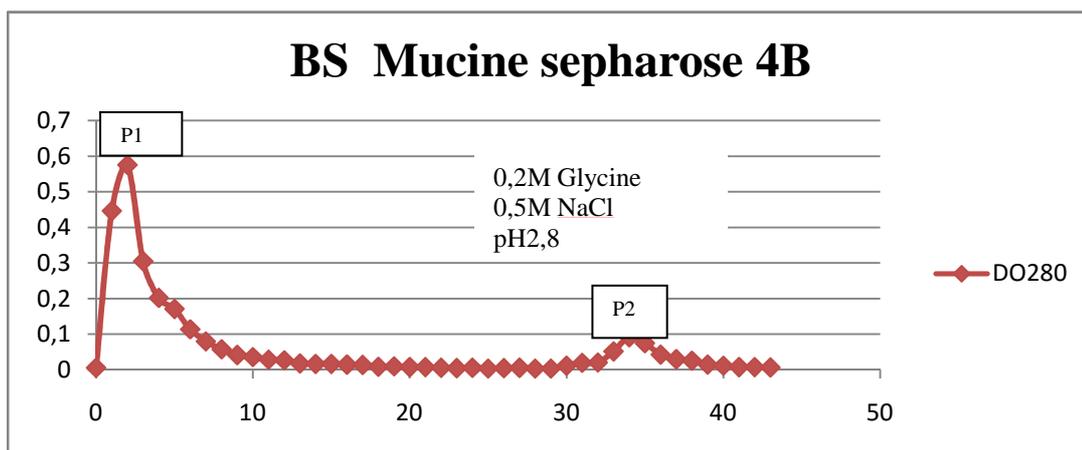


Figure 14 : purification par affinité de lectine *Streptomyces champavati* Pru16 sur colonne Sepharose-4B Mucine. Les fractions 1,0 ml ont été prélevées et analysées pour la teneur en protéines et en titre.

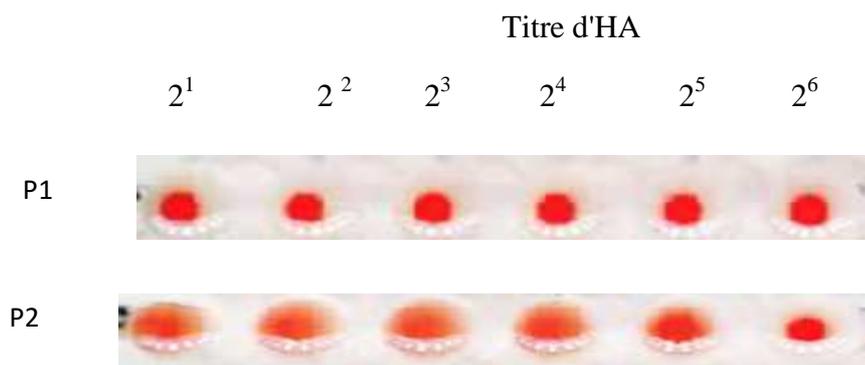


Figure 15: test d'hémagglutination avec le sang de rat des extraits protéiques des pics 1 et 2 (après purification sur colonne mucine sépharose 4B).

Tableau 8 : caractéristiques de l'extrait brut et de la lectine après purification sur colonne Mucine 4B de la souche *S. champavati* Pru16

Fractions	Volumes (mL)	Concentration en Protéines (mg)	Activité hémagglutinante Totale (UH)	Activité hémagglutinante spécifique (UH/mg)	Index de purification	Rendement (%)
Extrait brut	50	122,32	1024	8,37	1	100
Mucine 4B (Pic2 fraction 33)	1	0,287	32	111,49	13,32	3,12

3. Caractérisation des molécules hémagglutinantes de la fraction P2

3.1. Inhibition de l'hémagglutination

Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinantes contenues dans la fraction 33 du P2, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé. Un échantillon de la fraction P2 a été incubé avec différents monosaccharides, disaccharides et glycoprotéines (17 sucres et 5 glycoprotéines ou protéines). Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhibée uniquement avec les protéines, plus particulièrement par la mucine avec une concentration minimale inhibitrice de 0,007mg/mL, la BSA, l'ovalbumine et la caséine avec une concentration de 0,062mg/mL (**Tableau 9, Figure 16**).

Aucun des carbohydrates testés (avec une concentration initiale de 100 mM) n'est capable d'inhiber l'activité hémagglutinante de la fraction P2.

Tableau 9 : effet des différents sucres, glycoprotéines et protéines sur l'activité hémagglutinante de la fraction 33 Pic 2 (test d'inhibition de l'hémagglutination)

Sucres et glycoprotéines	Concentration minimale inhibitrice (CMI)*
Glucose	AI
D-Lactose	AI
Arabinose	AI
Fucose	AI
Manitol	AI
Fructose	AI
Sacharose	AI
Maltose	AI
D-Galactose	AI
N acetylglucosamine	AI
N acetylgalactosamine	AI
Fetaine	AI
Caseine	0.062mg/mL
Ovalbumine	0.062mg/mL
BSA	0.062mg/mL
Mucine (porcine stomach)	0.007mg/mL
Xylose	AI
Sorbitol	AI
Glucosamine hydrochloride	AI
Raffinose	AI
Sialic Acide	AI
Mannose	AI

(*) Concentration minimal d'inhibition (requisse pour inhiber 8 unités hémagglutinantes).

AI: Absence d'inhibition

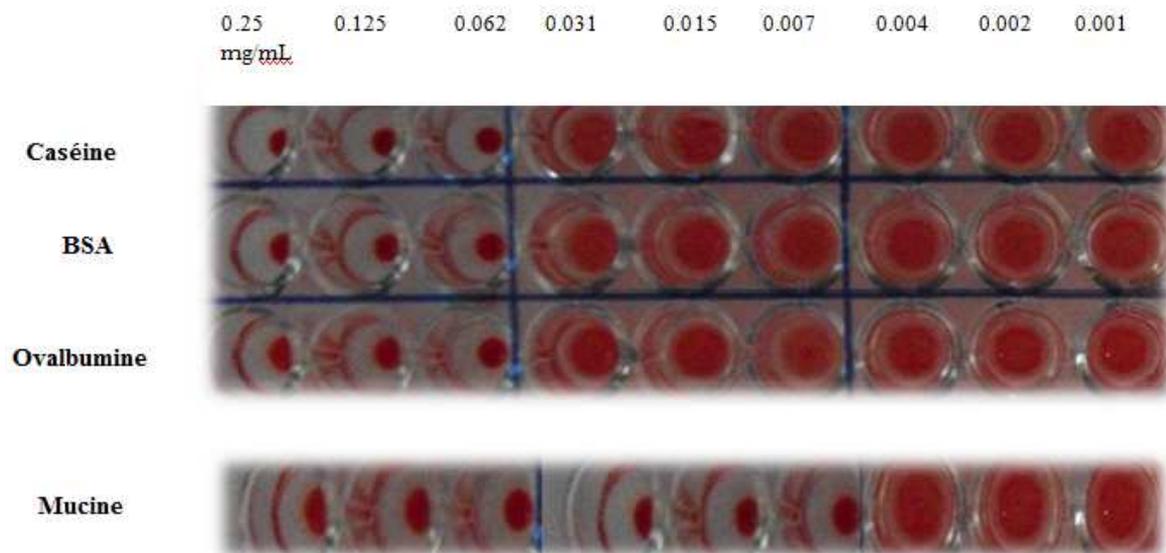


Figure 16 : test d'inhibition d'hémagglutination de la fraction P2.

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

La fraction P2 a été soumise à différentes températures (20-65°C), différents pH (2-10), et à différentes concentrations d'EDTA (5-20mM).

Nous observons que l'activité hémagglutinante de la fraction 33 reste maximale entre 30 et 37°C, au-delà de cette température l'activité diminue considérablement, jusqu'à disparaître à une température de 65°C (Figure 17). Les pH très acides (entre 4 et 5) affectent considérablement l'activité hémagglutinante, cependant au-delà d'un pH de 5, l'activité se stabilise à un pH 7,4 et même des pH très alcalins (pH 10) n'affectent pas l'activité hémagglutinante (Figure 17).

L'incubation des échantillons de la fraction 33 Pic 2 avec de l'EDTA pendant 1h n'affecte pas l'activité hémagglutinante des molécules même à une forte concentration (20mM), ceci indique que la liaison des molécules présentes dans la fraction avec leur ligand, n'est pas dépendante d'ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou autres). (Figure 18)

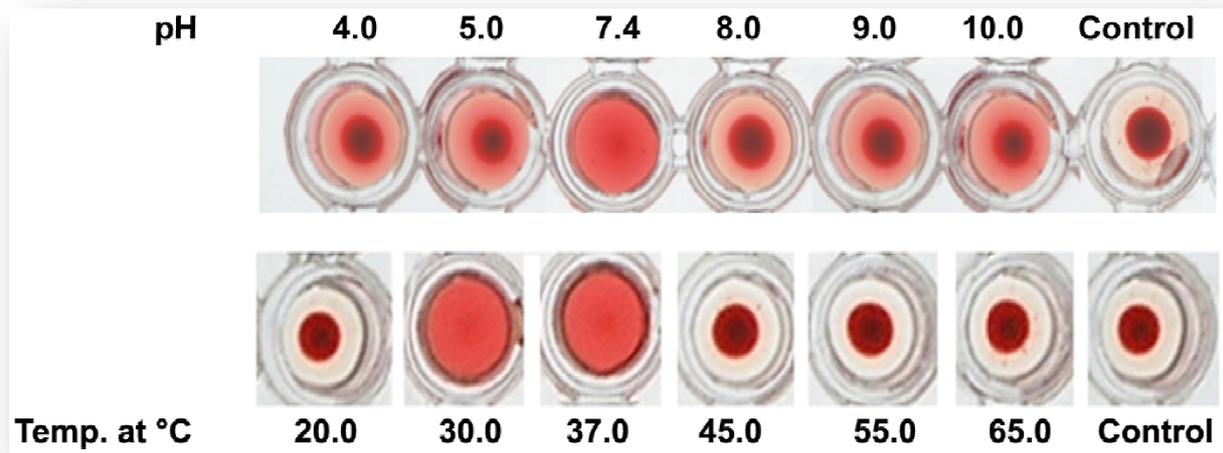


Figure 17: effet de la température et du pH sur l'activité hémagglutinante de la fraction 33 Pic2.

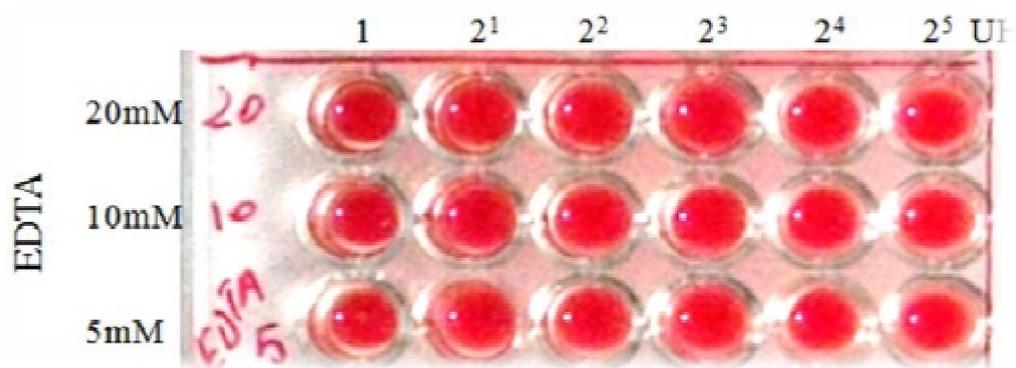


Figure 18: effet de l'EDTA sur l'hémagglutination de fraction 33 Pic 2.

3.3. SDS-PAGE et spectrométrie de masse (nano LC-ESI-MS/MS)

L'analyse SDS-PAGE de la fraction active 33 (P2) révèle la présence d'une bande protéique visible bien distincte (≈ 16 kDa) en plus de plusieurs autres bandes plus ou moins visibles. La plupart de ces bandes présentent un poids moléculaire compris en 25 et 75 kDa (Figure 19).

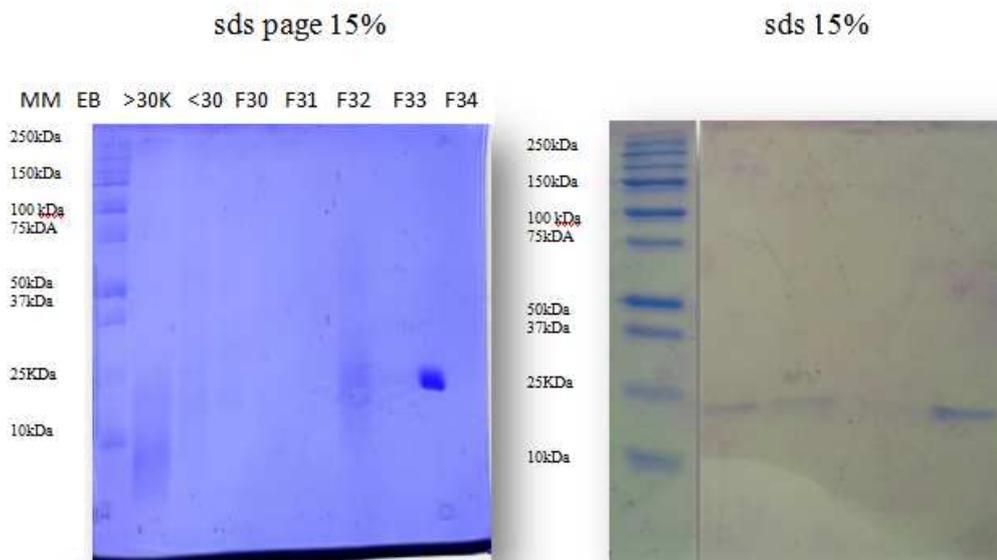


Figure 19: gel SDS-page (15%) de la fraction F33 après coloration au bleu de coomassie.

MM : marqueurs moléculaires, EB : extrait brut intracellulaire (après filtration et ultrafiltration >10kDa), P1 : fraction (F33)

La bande protéique la plus visible (la plus majoritaire) (≈ 16 kDa) a été excisée du gel, pour être identifiée par spectrométrie de masse tandem (nanoLC-ESI-MS/MS). L'analyse a permis d'identifier, par comparaison, 108 protéines différentes (**Annexe 7**), cependant une seule présente un score assez élevé (4920,89) suivie de cinq autres protéines avec un score compris entre environ 600 à 2000 (**Tableau 10**). La protéine à score élevé a un poids moléculaire similaire à celui de la bande protéique. Il s'agit de lysozyme C

Résultats

Tableau 10: Identification des protéines par spectrométrie de masse tandem (bande protéique majoritaire sur gel d'électrophorese ≈ 16.2kDa).

N°Accession UniProt	gènes	Protéines identifiées	Score (Mascot) ^a	Couverture (%) ^b	PM (kDa) ^c	pI ^d
P00698	lyz	Lysozyme C	4920,89	80,27	16,2	9,07
P01012	serpinB14	Ovalbumine	2043,00	38,86	42,9	5,29
P04264	krt1	Keratine, type II cytoskeletal	1587,46	50,00	66,0	8,12
P02769	alb	Sérum albumine	1564,47	55,68	69,2	6
P02789	n/a	Ovotransferrine	759,91	42,13	77,7	7,12
P02662	csn1s1	Alpha-S1-caseine	597,31	46,26	24,5	5,02

(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 identifiés (en fonction de leur composition en acides aminés)

6. Activités biologiques

6.1. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait P2 (fraction 33) a été testé à différentes concentrations (0,3 ; 0,15 et 0,075mg/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 20**). Ce qui explique que notre molécule ne présente aucune activité antimicrobienne.

6.2. Activité immunomodulatrice

L'effet immunomodulateur de l'extrait brut de la souche *Nocardiosis dassonvilleilli* subsp. Vic8.a été évalué *in vivo* sur des souris, par le test de clairance du carbone (*carbonclearance test*). Cette méthode permet d'évaluer l'action des phagocytes contre des particules de carbone (encre de Chine) injecté 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 , 50et 100 mg/Kg respectivement, augmentent de manière significative l'indice phagocytaire chez les groupes de souris traités en comparaison avec le groupe témoin qui a reçu uniquement de l'eau physiologique ($p < 0.0001$) (**Figure 21**). 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 22**).

Résultats

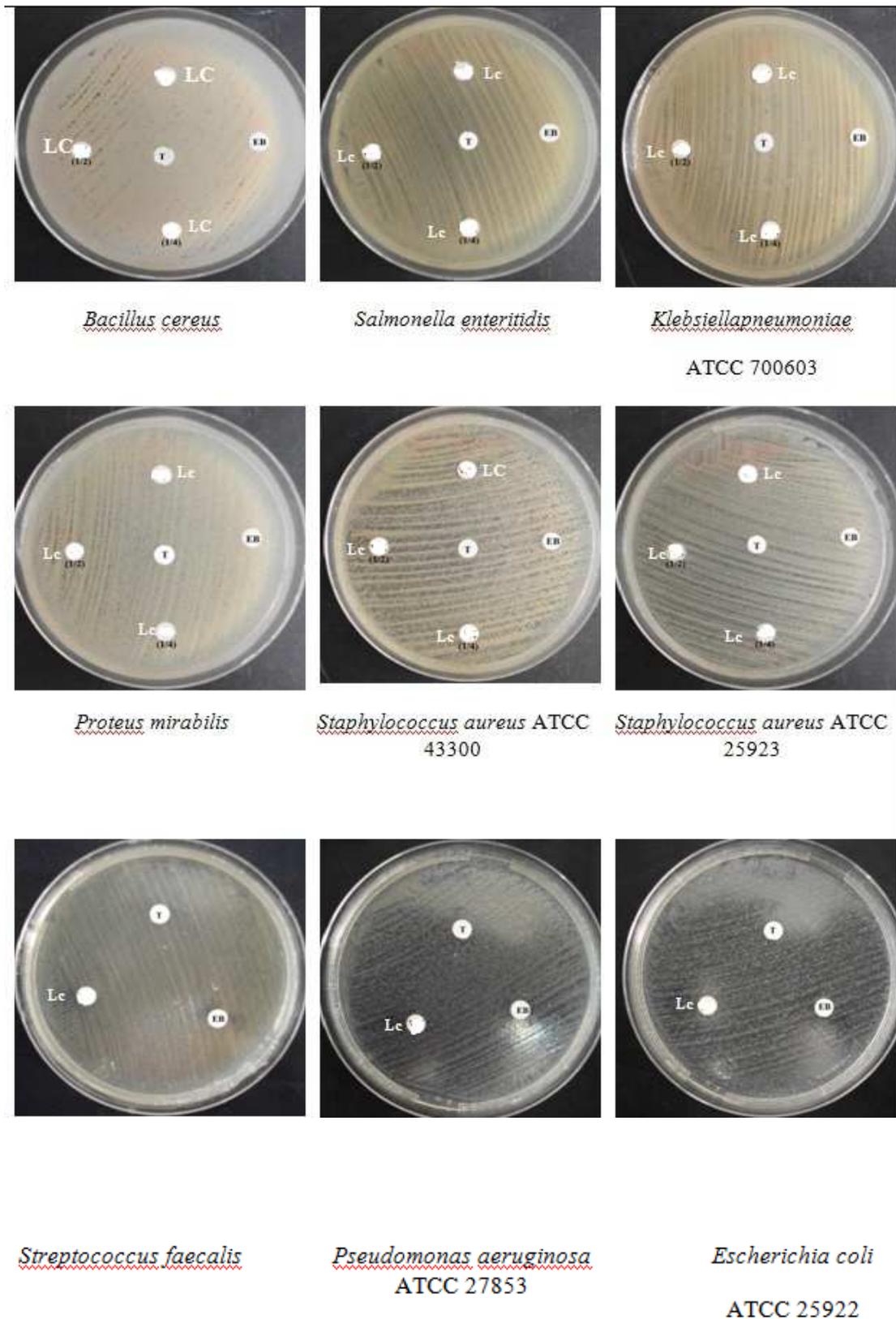


Figure 20: test d'activité antimicrobienne de l'extrait P2 de la souche Pru16(T : témoin ; EB : extrait brut ; LC : lectine 0,3 mg/mL ; LC1/2 : 0,15 mg/mL ; LC1/4 : 0.075 mg/mL)

Résultats

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 23** 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 l'extrait brut de la souche possède un ou plusieurs facteurs capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris.

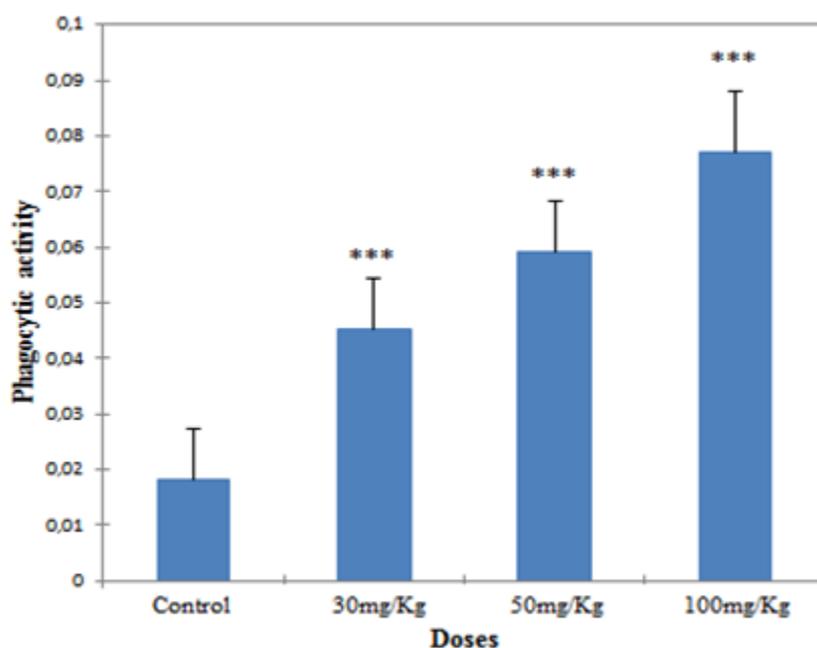


Figure 21: effet de l'extrait brut de la souche Vic8 sur l'activité phagocytaire.

(Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type, $n=7$; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$ en comparaison avec le groupe contrôle)

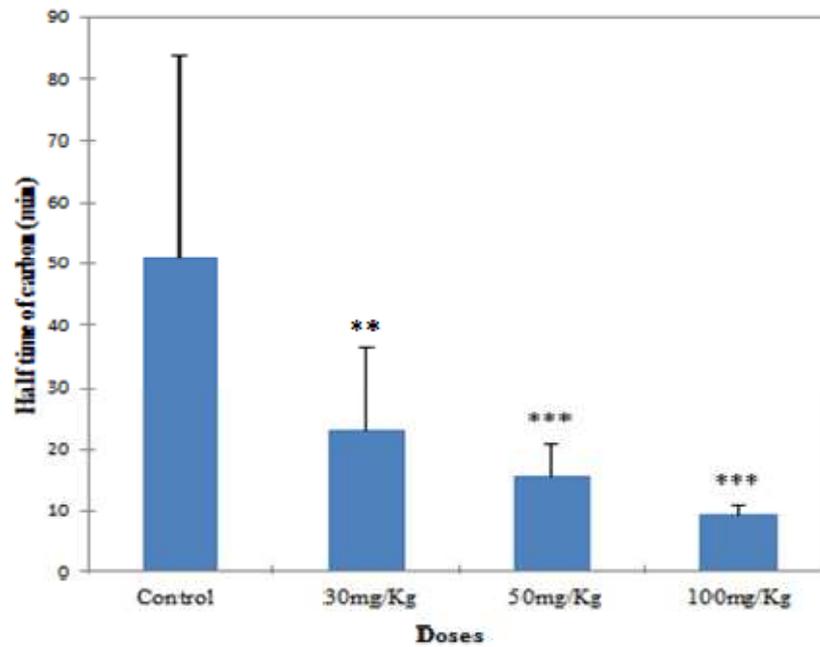


Figure 22: effet de l'extrait brut de Vic8 sur la demi-vie des particules de carbone dans le sang des souris

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

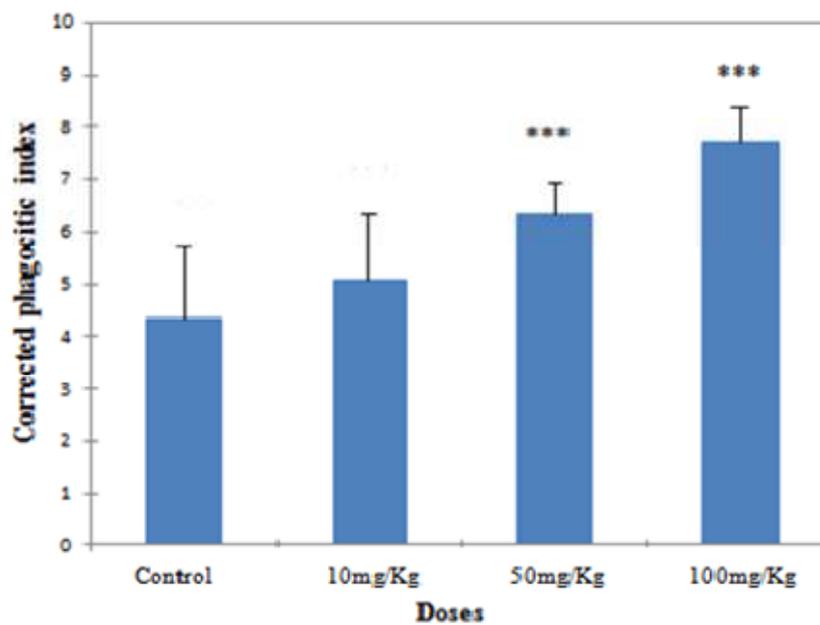


Figure 23 : effet de l'extrait brut sur l'index phagocytaire corrigé.

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

Discussion Générale

1. Souches et milieux de production des lectines

Le choix de six souches d'actinomycètes (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16) a été motivé par leur origine à savoir la rhizosphère de différentes plantes de la zone semi-aride (cultures maraîchères, d'arbres fruitiers et forestiers), et leur appartenance à des genres d'actinomycètes capables d'inhiber une large gamme de champignons phytopathogènes. Par ailleurs, l'étude du spectre d'inhibition de ces isolats a révélé qu'ils présentent en plus de l'activité antifongique une activité antibactérienne. Cette dernière a été vérifiée contre des bactéries phytopathogènes et aussi contre des souches d'importance clinique (**Aouar et al., 2012**).

Ainsi, pour mettre en évidence la production de lectines chez les six souches d'actinomycètes choisies, les bactéries sont cultivées sur deux milieux différents (*ISP₂* et Bennett,) réputés favorables à la croissance et à la sporulation des actinomycètes. Ces milieux diffèrent par leur composition ainsi que par les sources énergétiques. L'*ISP₂* est un milieu, majoritairement, constitué d'extrait de malt, source de carbone riche en maltose (**Shirling et Gottlieb, 1976**). Le milieu Bennett, riche en glucose, lui aussi est préconisé pour la croissance des espèces appartenant aux genres : *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, et *Nocardia*. (**Jones et al., 1949**). Par le choix de ces deux milieux, nous avons favorisé la croissance bactérienne, sachant que la production de lectines est corrélée à la croissance et l'optimum de production se situe dans la phase exponentielle de croissance.

Les souches lac3, Pru16, Pru14 et Vic8 ont pu croître, fortement, que sur le milieu *ISP₂*, et en revanche Pin10 et Lac1 présentent un fort développement, exclusivement, sur le milieu Bennett. La production de lectines par les souches bactériennes est proportionnelle à la croissance et, donc, dépend de la composition de base du milieu de culture.

La composition de base du milieu de culture des souches bactériennes étudiées, est un facteur qui a été pris en compte par plusieurs auteurs dans la recherche des lectines bactériennes (**Gilboa-Garber, 1983 ; Chiba et al., 2001 ; Podgorski et al., 2014**). 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 (**Podgorski 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 lectionomique (Podgorski *et al.*, 2014).

2. Test d'hémagglutination

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation (Goldstein et Poretz, 1986 ; Rudiger, 1993). Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes. Les extraits extracellulaires et intracellulaires obtenus à partir des cultures des six souches sur milieu *ISP2* et Bennett ont été testés pour leur activité hémagglutinante. Les résultats montrent une absence de l'agglutination des érythrocytes humains avec tous les extraits. La plupart des activités hémagglutinantes sont observées avec les érythrocytes de rat et de lapin et sont plus prononcée avec les extraits intracellulaires qu'extracellulaires. En effet, les extraits extracellulaires des souches *Streptomyces griseus*Lac1, *Streptomyces annulatus*Pru14 et *Nocardiosis dassonvillei*Vic8 ne présentent aucune activité hémagglutinante. Cette différence d'activité est sûrement due à la teneur en protéines qui est plus faible dans les extraits extracellulaires.

Le milieu *ISP₂* favorise l'activité hémagglutinante en comparaison avec le milieu Bennett. Les meilleures activités sont observées avec les extraits intracellulaires des souches Pru16 et Vic8 avec les érythrocytes de rat et de lapin.

Ainsi, l'activité hémagglutinante spécifique (8,37 UH/mg) la plus prononcée est observée sur les hématies de rat avec l'extrait intracellulaire de la souche Pru16, obtenu après une culture de 6 jours sur milieu *ISP₂*, durée d'incubation pour les actinomycètes à croissance rapide.

Ces résultats sont concordants avec ceux de Singh *et al.*, (1993) qui 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, 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.

3. Purification primaire

Afin d'analyser les hémagglutinines de la souche *Streptomyces champavatii* Pru16., une culture de deux litres sur milieu *ISP*₂ a été réalisée pour l'extraction de la fraction protéique intracellulaire. 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-acétylgalactosamine (GalNac), et l'acide sialique), ces monosaccharides et leurs dérivés sont les unités typiques des structures d'oligosaccharides sur les surfaces cellulaires, particulièrement celles des érythrocytes. Malheureusement aucune de ces colonnes ne s'est révélée efficace pour la purification de ces molécules, ceci s'explique par l'affinité de ces molécules **à des ligands beaucoup plus complexes** que ceux que nous avons testés sur ces colonnes.

Il n'existe pas de protocole standardisé pour la purification des lectines, la principale raison pour cela, est l'extrême hétérogénéité fonctionnelle et structurale 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) (**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 tous 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 (**Podgorski 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 de filtration sont de bonnes alternatives pour la purification de lectines dont l'affinité est inconnue ou complexe (**Sova, 1985 ; Podgorski et al., 1992 ; Zhigis et al., 1993**).

Dans notre étude et afin de purifier ces molécules nous avons adopté une autre stratégie en utilisant une purification en trois étapes, une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75) suivie d'une colonne mucine sépharose 4B. L'activité spécifique de l'extrait brut était de 8,37 UH/mg, et elle est passée à 14,95 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 20 UH/mg

après la chromatographie G75 (**pic A**). Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 2,38 avec un rendement assez faible de 3,12%. En effet, deux pics sont observés après chromatographie sur gel de filtration G75, pic A et pic B. Ce dernier ne présente aucune activité hémagglutinante.

4. Chromatographie sur colonne Mucine Sépharose 4B

Les différentes mucines rencontrées chez les mammifères partagent un certain nombre de caractéristiques communes (**Dekker, et al., 2002**). Il s'agit de polymères de grande taille, composés de monomères de glycoprotéines hautement glycosylées : chaque monomère, pouvant avoir une masse moléculaire supérieure à 106 Da, est formé d'un noyau central peptidique entouré d'une série d'oligosaccharides disposés en forme d'écouvillon. Les chaînes latérales glucidiques représentent classiquement 80-85% du poids de la mucine. Elles sont constituées de galactose (Gal), de fucose (Fuc), de N-acétyl-galactosamine (GalNAc), de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et d'acide sialique. En général, le point de branchement est constitué de N-acétyl-galactosamine, attaché à la protéine par une liaison éther, qui est le résultat de la réaction entre la position α -1 du groupement hydroxyle et le groupement hydroxyle des acides aminés sérine ou thréonine (**Strous et Dekker, 1992**). Le nombre de résidus de sucre dans chacune des chaînes latérales varie de 2 à 20 ; en outre, les chaînes peuvent avoir des sous-ramifications. La région glycosylée du noyau peptidique contient de nombreuses répétitions de séquences appariées (chaque séquence étant composée de 6 à 169 acides aminés, en fonction du type de mucine), contenant des quantités importantes de sérine, de thréonine et de proline, auxquelles sont attachés les oligosaccharides. Les résidus de sérine et de thréonine dominent la composition en acides aminés, ils constituent 25-40% des acides aminés totaux. Dans une solution aqueuse, le cœur protéique est plutôt hydrophobe, alors que les oligosaccharides des chaînes latérales sont hydrophiles. Dans ce cas, si la densité et la longueur des chaînes latérales sont suffisamment élevées, les autres molécules n'entrent en contact qu'avec ces dernières, tandis que les segments du squelette restent inaccessibles

Après chromatographie sur colonne mucine sépharose 4B, deux pics sont observés. La fraction protéique 33 du pic 2 présente une activité hémagglutinante spécifique environ douze fois plus importante que celle observée pour l'extrait brut (111,49 contre 8,37 UH/mg), en revanche celle du pic 1 ne présente aucune activité hémagglutinante.. Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinantes contenues dans la fraction protéique 33 du pic 2, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé. Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhibée uniquement avec les protéines, plus particulièrement par la

mucine avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,007mg/mL, la BSA, l'ovalbumine et la caséine de 0,062mg/mL

Le test d'hémagglutination montre que ces lectines sont inhibés uniquement en présence de certaines glycoprotéines. L'Ovalbumine est une protéine portant plusieurs chaînes de glycanes de type hybride, particulièrement riches en unités de mannose (**Tai et al., 1975 ; Harvey et al., 2000**). D'après nos résultats, l'utilisation des sucres **sous forme monosaccharidique** ne montre aucun effet inhibiteur sur l'activité de la fraction 33 du pic P2, ceci indique que les lectines contenues dans cette fraction possèdent uniquement une spécificité pour les **glycoprotéines glycosylées**. Les sites de liaison de ce genre de lectines montrent une excellente complémentarité pour leur ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes, et se traduit par une forte affinité (**Ciucci, 2006**).

La tendance des autres substances à adhérer aux mucines, décrite sous le nom de mucoadhésion, suggère que ces glycoprotéines autorisent des interactions électrostatiques, hydrophobes, la formation de liaisons hydrogène, ainsi que des interactions de type lectines/saccharides (**Harding, et al., 1999**). Les mucines contiennent a priori de nombreux groupements réactifs, nécessaires à la formation de liaisons hydrogène, tels que les fonctions hydroxyles des chaînes latérales des oligosaccharides, les groupements aminés dans le noyau peptidique central ainsi que certaines fonctions carboxyliques ou sulfates dans les segments terminaux des chaînes latérales. Par conséquent, il est raisonnable de considérer la liaison hydrogène comme la première source d'interaction des mucines avec d'autres molécules. Toutefois, il faut rappeler ici que les milieux aqueux ont un effet important sur la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes de polymères. En effet, la concentration molaire des molécules d'eau dans les solutions aqueuses est très élevée (environ 55 M) et ces molécules sont elles-mêmes de très bons accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogène. Ainsi, la formation de liaisons hydrogène entre deux segments de polymères en solution est un processus en concurrence directe avec la formation de liaisons hydrogène entre les polymères et l'eau (**Zeegers-Huyskens et Huyskens, 1991**). Par conséquent, les fonctions hydroxyles dans les chaînes latérales peuvent, dans certains cas, ne pas être des sites d'interactions importants (**Zeegers-Huyskens et Huyskens, 1991**), de même pour les groupements situés dans le noyau central des mucines. En effet, en raison de la structure en écouvillon, les segments du noyau central sont largement recouverts par les chaînes latérales hydrophiles et, donc, peu disponibles pour nouer des interactions inter-chaînes (**Wataoka, et al., 1999**). Enfin, les groupements carboxyliques et sulfates au niveau terminal des chaînes latérales peuvent jouer un rôle important dans la formation des liaisons hydrogène (**Andrew et Simon,**

1999). L'acide sialique ainsi que les saccharides sulfatés sont chargés négativement à partir d'un pH supérieur à 3 (MacAdam, 1993), et leur capacité de formation des liaisons hydrogène est supérieure à celle de l'eau. En outre, toujours en raison de la structure en écouvillon, les résidus terminaux de sucres dans les chaînes latérales sont exposés en extrême surface, ils sont donc les sites d'interaction les plus probables. Les mucines possèdent, par ailleurs, des groupements hydrophobes, notamment au niveau du noyau central des protéines, de sorte que des interactions hydrophobes peuvent être mises en place et exploitées. L'adsorption de différentes mucines sur des surfaces hydrophobes a été étudiée (Malmsten, *et al.*, 1992 ; Rogunova, *et al.* ; 1997, Shi et Caldwell, 2000) et les données convergent vers la forte affinité des mucines pour les surfaces hydrophobes. Il a ainsi été montré que la mucine sous-maxillaire bovine pouvait s'adsorber sur une surface hydrophobe de polystyrène et ainsi la rendre hydrophile (Shi et Caldwell, 2000).. Récemment, les lectines ont bénéficié d'un regain d'intérêt, du fait de leur capacité à reconnaître spécifiquement et à se lier aux récepteurs de la membrane cellulaire. Les polymères conjugués de lectines sont plutôt considérés comme une catégorie secondaire de composés bio-adhésifs car ils sont conçus de manière à se lier aux cellules épithéliales et non à la couche de mucus (Lehr, 2000). Toutefois, ils conservent une forte affinité pour les mucines.

Une lectine de 12,5 kDa isolée à partir de l'espèce *Longispora albida*, présente une affinité unique pour les glycoprotéines hautement riches en chaînes mannosylées comme l'Ovalbumine, la Thyroglobuline, la Ribonuclease 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 (Ziolkowska et Wlodawer, 2006 ; Keyaerts *et al.*, 2007 ; Sato *et al.*, 2011).

Ainsi, nos résultats en les rapprochant de ceux obtenus pour l'espèce actinomycétale *Longispora albida*. suggèrent que la lectine contenue dans la fraction 33 du pic P2 de la souche Pru16 peut être monomérique d'environ 16kDa de taille et présentent un potentiel antiviral très intéressant. Cette suggestion est assise, aussi, sur le fait qu'une étude menée par (Singh *et al.*, 1993) a montré que les fractions de lectines de plusieurs souches de *Streptomyces* possèdent plusieurs spécificités qui varient d'une souche à l'autre.

5. Caractéristiques physico-chimiques de la fraction 33 du pic P2

L'activité hémagglutinante de cette fraction diminue considérablement au delà de 37°C et disparaît totalement à 65°C. Elles résistent bien à des pH hautement alcalins et ne sont pas inhibées en présence d'EDTA même à une forte concentration (20mM), ceci indique que la liaison des molécules présentes dans la fraction avec leur ligand, n'est pas dépendante d'ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou autres). Nos lectines ne résistent pas à des pH acides contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature. Les lectines bactériennes restent 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 ; Podgorski *et al.*, 1992, 2014**).

Par ailleurs, les lectines bactériennes sont désignées comme étant des protéines thermostables contrairement à la notre qui présente une thermostabilité moyenne. 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 (**Podgorski *et al.*, 1992**). Il semble que notre lectine possède un nombre moyen de carbohydrates car 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 ; Podgorski *et al.*, 2014**).

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 (**Podgorski *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**). Concernant ce dernier point nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par ces auteurs, en effet notre lectine résiste bien à des pH hautement alcalins et n'est pas inhibée en présence d'EDTA même à une forte concentration (20mM). Cette multi résistance suggère que les lectines peuvent avoir un rôle physiologique important dans la survie et l'adaptation des bactéries.

En conclusion, la résistance à des pH alcalins et à des fortes concentrations en EDTA observée chez la lectine produite par la souche *Streptomyces champavati*Pru16 peut être le signe qu'elle joue les mêmes fonctions que ses homologues chez les végétaux. En effet, 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**).

6. SDS page et Protéomique

L'analyse SDS-PAGE de la fraction active 33 du pic P2 révèle la présence d'une bande protéique visible bien distincte à environ 16kDa en plus de plusieurs autres bandes plus ou moins visibles présentant un poids moléculaire compris en 25 et 75 kDa. La bande protéique la plus visible environ de 16kDa a été excisée du gel, pour être identifiée par spectrométrie de masse (nano LC-ESI-MS/MS). Les peptides obtenus par digestion trypsinique (1µL) sont chargés dans une pré-colonne, puis élués et séparés sur une nano colonne C18 reverse-phase. Une fois élués de la colonne, les peptides sont ionisés par nanoélectrospray et conduits dans le spectromètre de masse tandem (ESI MS/MS).

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 33 du pic P2 de la souche Pru16. L'analyse SDS-page a démontré que les hémagglutinines contenues dans la fraction 33 du pic P2 se situent dans la bande 16kDa.

Les protéines de cette bande ont été identifiées, par spectrométrie de masse de type (nano LC-ESI-MS/MS). L'identification des protéines de la fraction 33 du pic P2 de la souche *Streptomyces champavati*Pru16 s'est faite grâce à la base de données protéomiques de souches apparentées. L'analyse a permis d'identifier 6 protéines similaires différentes, cependant une seule présente un score assez élevé, avec un poids moléculaire similaire à celui de la bande protéique. Il s'agit du lysozyme C. Ainsi notre protéine (lectine) est proche structurellement du lysozyme C. Cependant les résultats du test d'hémagglutination, en présence d'érythrocytes de rat, de différentes concentrations de lysozyme C montre que cette protéine ne présente aucune activité hémagglutinante..

7. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique de la fraction 33 du pic P2 a été testée à différentes concentrations (0,3 ; 0,15 ; et 0,075 mg/mL) contre neuf souches bactériennes et deux souches de champignons filamenteux, 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. Ce qui suggère l'absence de molécules à activité antimicrobienne dans l'extrait.

8. Modulation de la réponse immunitaire

Plusieurs rapports indiquent que le système réticulo-endothélial (RES) peut être stimulé par des bactéries vivantes, atténués, et tués. Il a été démontré que les lipopolysaccharides (LPS), les endotoxines, les lipoprotéines, et le peptidoglycane de

plusieurs bactéries sont des immunostimulateurs du système réticulo-endothélial (**Patyar et al., 2010 ; Kou et al., 2014**). L'extrait brut intracellulaire de l'espèce *Nocardioiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 qui n'a pas été purifié a subi une analyse pour mettre en évidence sa capacité à stimuler la réponse phagocytaire chez les souris.

Les résultats montrent que l'administration, par voie intraveineuse, des particules de carbone (encre de Chine) à des souris à différentes concentrations augmentent de manière significative l'indice phagocytaire chez les groupes de souris traités en comparaison avec le groupe témoin qui a reçu uniquement de l'eau physiologique ($p < 0.0001$). 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.

En effet, 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 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 des immunomodulateurs sont les macrophages, ces cellules initient une réponse immunitaire innée, qui à son tour orchestre la réponse adaptative (**Singhai et Patra, 2013**).

Nos résultats montrent, également, que 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 l'extrait brut intracellulaire de la souche Vic8. L'indice phagocytaire corrigé est significativement plus élevé chez les groupes traités en comparaison avec le groupe témoin ($p < 0.005$), et là aussi on observe que l'indice corrigé dépend de la 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 de la diminution du temps de demi-vie des particules de carbone en circulation dans le sang indiquent que l'extrait brut de la souche Vic8 possède **un ou plusieurs facteurs** capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris. Cet effet est comparable à celui exercé par les lectines pures.

Conclusion-Perspectives

En raison du fait que les lectines,

-d'une part suscitent ces dernières années, de plus en plus d'intérêt chez les scientifiques notamment pour leur rôle dans la régulation d'une variété de processus biologiques, et pour leur potentiel d'utilisation en tant qu'agents pharmacologiques et biotechnologiques.

-et, d'autre part que très peu de chercheurs **se sont intéressés aux lectines produites par les bactéries non pathogènes dont** le rôle biologique de ces protéines reste pratiquement inconnu et non caractérisé chez ce groupe de bactéries.

Nous nous sommes fixés comme objectif principal l'isolement de nouvelles lectines à partir de souches d'actinomycètes isolés de rhizosphères de diverses plantes cultivées en région semi-aride de l'Est-Algérien. L'activité antagoniste (antifongique et antibactérienne) et promotrice de la croissance des plantes de ces souches laissent supposer la présence effective de telles molécules.

Ainsi, six souches ont été cultivées sur deux milieux de culture de croissance différents afin de favoriser au mieux leur production. Il s'est avéré, effectivement, que la composition de base du milieu de culture influe sur la production de lectines dont la mise en évidence a été effectuée par le test d'héماغglutination.

Nous avons observé 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. Ces activités sont plus prononcées avec les extraits intracellulaires qu'extracellulaires.. Ainsi, l'activité héماغglutinante spécifique 8,37 UH/mg a été obtenue sur les hématies de rat avec l'extrait intracellulaire de la souche Pru16, obtenu après une culture de 6 jours sur milieu ISP₂.

Les héماغglutinines de la fraction protéique intracellulaire, d'une culture de deux litres sur milieu ISP₂, de la souche *Streptomyces champavatii* Pru16 n'ont pu être purifiées sur des colonnes Sepharose-6B couplées au mannose, fucose, galactose, GlcNac, GalNac, et sur des colonnes Sepharose-4B couplées à la fétuine (glycoprotéine). Ceci s'explique par l'affinité de ces molécules à des ligands beaucoup plus complexes que ceux que nous avons testés sur ces colonnes.

À la suite de cela, la stratégie d'une purification en trois étapes (une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75) suivie d'une colonne mucine sépharose 4B) s'est avérée efficace. Les fractions protéiques actives de la précipitation au sulfate d'ammonium ont été regroupées, puis soumises à une chromatographie sur gel de filtration Sephadex G-75, deux pics ont été observés (pic A et pic B). Ainsi, l'activité spécifique de l'extrait brut est passée de 8,37 UH/mg à 14,95 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 20 UH/mg pour la fraction protéique du pic A. Le facteur de purification de la fraction purifiée est de 2,38 avec un rendement assez faible de 3,12%. La fraction protéique du pic B ne présente aucune activité hémagglutinante

Après chromatographie sur colonne mucine sépharose 4B, deux pics sont observés. Seule la fraction protéique 33 du pic 2 présente une activité hémagglutinante spécifique environ douze fois plus importante que celle observée pour l'extrait brut (111,49 contre 8,37 UH/mg). Afin de caractériser l'affinité des molécules hémagglutinantes contenues dans la fraction protéique 33 du pic 2, un test d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisé

Le résultat de ce test montre que l'hémagglutination est inhibée uniquement avec les protéines, plus particulièrement par l'ovalbumine avec une concentration minimale inhibitrice de 0,004mg/mL, la BSA de 0,031mg/mL et la caséine de 0,125mg/mL. Aucun des carbohydrates testés (avec une concentration initiale de 100 mM) n'est capable d'inhiber l'activité hémagglutinante de la fraction 33 du P2.

Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, notre lectine (fraction protéique 33 du pic 1) n'est pas thermostable. En revanche et à l'instar des autres lectines étudiées, l'activité hémagglutinante de notre lectine persiste à des pH alcalins et après traitement à forte concentration (20mM) d'EDTA.

L'analyse SDS-PAGE de la fraction active 33 du pic P2 révèle la présence d'une bande protéique visible bien distincte (≈ 16 kDa) en plus de plusieurs autres bandes plus ou moins visibles. La bande protéique ≈ 16 kDa a été hydrolysée et les peptides obtenus élués par LC puis identifiées par spectrométrie de masse tandem. L'analyse, par comparaison avec les protéines d'une banque de données, a permis d'identifier 6 protéines différentes, cependant une seule présente un score assez élevé, avec un poids moléculaire similaire à celui de la bande protéique. Il s'agit de lysozyme C mais cette protéine ne présente aucune activité

hémagglutinante. Par ailleurs, la lectine de 16 kDa produite par la souche Pru16 ne présente aucune activité antibactérienne ou antifongique.

L'extrait brut intracellulaire de la souche Vic8 présentait une activité hémagglutinante de l'extrait brut assez importante, pour cela nous avons étudié son effet immunomodulateur. 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 l'extrait brut de la souche possède un ou plusieurs facteurs capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris. **Cet effet est comparable à celui des lectines purifiées.**

Ainsi, les objectifs fixés, au préalable, ont été atteints et nos travaux ont contribué à approfondir nos connaissances sur les lectines des bactéries rhizosphériques notamment sur leurs conditions de production et d'extraction. Nous avons montré que les souches d'actinomycètes produisaient des lectines intracellulaires et extracellulaires et que cette production dépendait de la composition du milieu de culture. Les lectines intracellulaires n'ont aucune affinité pour les monosaccharides contrairement aux substrats complexes mannosylés. Les caractéristiques physico-chimiques des lectines intracellulaires suggèrent qu'elles jouent les mêmes fonctions que leurs homologues chez les végétaux. La lectine monomérique de 16 kDa obtenue de l'extrait intracellulaire de la souche Pru16 est comparable à la lectine de l'espèce actinomycétale *Longispora albida* qui présente un potentiel antiviral très intéressant. Les faibles activités hémagglutinantes des extraits extracellulaires n'ont pas été étudiées en raison de leur faible concentration dans les surnageants de cultures bactériennes.

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

- de s'intéresser aux actinomycètes du rhizoplan c'est-à-dire ceux qui sont fortement collés aux racines,
- d'utiliser d'autres milieux de fermentation et d'optimiser les propriétés physico-chimique de la production de lectines, notamment pour l'obtention d'extraits extracellulaires plus riches en protéines,
- d'améliorer l'extraction des protéines en utilisant des méthodes plus douces,

Conclusion-Perspectives

- de varier les types de chromatographies, de leurs gels et des différents tampons d'éluion pour une meilleure séparation,
- de multiplier les ligands pour une meilleure purification des lectines,
- d'analyser structurellement les lectines purifiées,
- d'étudier l'activité antivirale et immunomodulatrice des lectines pures.

Abraham T.A. and Herr L.J. Activity of actinomycetes from rhizosphere and non-rhizosphere soils of corn and soybean in four physiological tests. *Can. J. Microbiol.* **10**, 281-285(1964).

Alencar, N. M. N. *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 919–22 (2005).

Alexander M. Introduction to Soil Microbiology. *Wiley, New York.* 480 (1977).

Andrew M. Davis and Simon J. Teague. Hydrogen Bonding, Hydrophobic Interactions, and Failure of the Rigid Receptor Hypothesis. *Angew. Chem. Inter. Ed.* **38** 736-749 (1999).

Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A. & Beaulieu, C. Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* **34**, 165–176 (2012).

Badji, B. *et al.* Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomurea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 403–412 (2007).

Basil, A. J., Strap, J. L., Knotek-Smith, H. M. & Crawford, D. L. Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 278–88 (2004).

Beisel, H. G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R. & Bode, W. Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *EMBO J.* **18**, 2313–22 (1999).

Benacerraf, B., Biozzi, G., Cuendet, A. & Halpern, B. N. Influence of portal blood flow and of partial hepatectomy on the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. *J. Physiol.* **128**, 1–8 (1955).

Biozzi, G. *et al.* Effect of vaccination with irradiated *Plasmodium berghei* on the phagocytic activity of the reticulo endothelial system during plasmodium infection of the rat. *Bull. World Health Organ.* **42**, 163–8 (1970).

Blumenschein, T. M. A. *et al.* Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* **26**, 2808–20 (2007).

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

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

- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
- Campbell R. and Greaves M. P. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: the rhizosphere. Lynch I. M. (Eds). *Wiley Ser. Ecol. Appl. Microbiol.* 11-34 (1990).
- Chiba, H. *et al.* Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 595–601 (2001).
- Chiba, H. *et al.* Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 595–601 (2001).
- Chiba, H., Inokoshi, J., Nakashima, H., Omura, S. & Tanaka, H. 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 203–10 (2004).
- Chrispeels, M. J. & Raikhel, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**, 1–9 (1991).
- Cioci, G. Etudes structure fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. (2006).
- Crocker, P. R. & Zhang, J. New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics. *Biochem. Soc. Symp.* 83–94 (2002).
- Cummings, R. D. & Kornfeld, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* **257**, 11230–4 (1982).
- Cundliffe, E. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 500–6 (2006).
- Curl E. A. and Truelove B. The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 288 (1986).
- Dam, T. K. & Brewer, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.* **102**, 387–429 (2002).
- Dam, T. K. & Brewer, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.* **102**, 387–429 (2002).
- Damme, E. J. M. Van, Peumans, W. J., Barre, A. & Rougé, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 575–692 (1998).

Dekker, J., Rossen, J. W. A., Büller, H. A. & Einerhand, A. W. C. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 126–31 (2002).

Delatorre, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *J. Struct. Biol.* **154**, 280–6 (2006).

Dodson, K. W. *et al.* Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**, 733–43 (2001).

Drickamer, K. A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* **3**, 2–3 (1993).

Edelman, G. M. *et al.* The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2580–4 (1972).

El-Tarabily, K. A. & Sivasithamparam, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1505–1520 (2006).

Emsley, J. *et al.* Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* **367**, 338–45 (1994).

Errakhi, R. *et al.* An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Exp. Bot.* **59**, 4259–70 (2008).

Garlatti, V. *et al.* Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J.* **26**, 623–33 (2007).

Garrity G.M., B. J. A. and L. T. G. Taxonomic Outline of the Procaryotes, Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology, Second Edition .Release 5.0, Springer-Verlag, New York. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>. (2004).

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

Gerlach, D., Wagner, M., Schlott, B., Zähringer, U. & Schmidt, K.-H. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**, 61–8 (2002).

Gilboa-Garber, N. *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods Enzymol.* **83**, 378–85 (1982).

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

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

- Gokhale, A. B., Damre, A. S. & Saraf, M. N. Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyreia speciosa*. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 109–14 (2003).
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66–66 (1980).
- Goodfellow, M. & Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189–216 (1983).
- Gourdine, J.-P. *et al.* High affinity interaction between a bivalve C-type lectin and a biantennary complex-type N-glycan revealed by crystallography and microcalorimetry. *J. Biol. Chem.* **283**, 30112–20 (2008).
- Guillot, J. *et al.* [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. *Bull. Cancer* **91**, 141–58 (2004).
- Hamid, R., Masood, A., Wani, I. H. & Rafiq, S. Lectins: Proteins with Diverse Applications ARTICLE INFO ABSTRACT. *J. Appl. Pharm. Sci.* **3**, 93–103 (2013).
- Harding, S. E., Davis, S. S., Deacon, M. P. & Fiebrig, I. Biopolymer mucoadhesives. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **16**, 41–86 (1999).
- Harvey, D. ., Wing, D. ., Küster, B. & Wilson, I. B. . Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 564–571 (2000).
- Hayakawa, M., Yoshida, Y. & Iimura, Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 973–981 (2004).
- Hirabayashi, J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj. J.* **21**, 35–40 (2004).
- Hoorelbeke, B. *et al.* Actinohivin, a broadly neutralizing prokaryotic lectin, inhibits HIV-1 infection by specifically targeting high-mannose-type glycans on the gp120 envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3287–301 (2010).
- Hopwood, D. A., Lydiate, D. J., Malpartida, F. & Wright, H. M. in *Plasmids in Bacteria* 615–634 (Springer US, 1985). doi:10.1007/978-1-4613-2447-8_43
- Huber, F. M., Pieper, R. L. & Mertz, F. P. Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 235–241 (1987).
- Imberty, A., Mitchell, E. P. & Wimmerová, M. Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 525–34 (2005).
- Imberty, A., Mitchell, E. P. & Wimmerová, M. Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 525–34 (2005).

Imberty, A. & Varrot, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 567–76 (2008).

Imberty, A., wimmerová, M., Mitchell, E. P. & Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221–8 (2004).

Jones, K. L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* **57**, 141–5 (1949).

Kairies, N. *et al.* The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13519–24 (2001).

Kalakoutskii, L. V & Agre, N. S. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40**, 469–524 (1976).

Kawsar, S. M. A. *et al.* Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a d-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **150**, 349–357 (2008).

Kennedy, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* **74**, 65–76 (1999).

Keyaerts, E. *et al.* Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Res.* **75**, 179–87 (2007).

Khamna, S., Yokota, A. & Lumyong, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 649–655 (2009).

Kitouni, M. *et al.* Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Mycol. Médicale / J. Med. Mycol.* **15**, 45–51 (2005).

Kou, X. *et al.* A tolerant lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei*, and its immunoregulatory function. *Can. J. Microbiol.* **60**, 729–36 (2014).

Kuster K. The concept of gens and species within the Actinomycetales in *Nocardia* and *Streptomyces*. *Gutar Fish. Verglas.* 21-25(1979).

Labeda, D. P. & Kroppenstedt, R. M. Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa : proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 331–336 (2000).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

- Lakhtin, V., Lakhtin, M. & Alyoshkin, V. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology Lectin and enzyme relationships in microbiology. *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.* **1**, 9–14 (2011).
- Larpent J-P. and Larpent-Gourgaud M. *Eléments de Microbiologie*. Hermann. Paris. 264 (1985).
- Lebuhn, M., Heulin, T. & Hartmann, A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 325–334 (2006).
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H. Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 315-31 (1985).
- Lee, Y. C. & Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **28**, 321–327 (1995).
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F. Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* **19**, 433–40 (2004).
- Lehr, C. M. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. *J. Control. Release* **65**, 19–29 (2000).
- Leonidas, D. D. *et al.* Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* **37**, 13930–40 (1998).
- Lesuffleur F. Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Thèse de doctorat. Institut de biologie fondamentale et appliquée (IBFA). *Univ. CAEN, Fr* (2007).
- Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674 (1998).
- Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674 (1998).
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 9–36 (1998).
- MacAdam, A. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 201–220 (1993).
- Malmsten, M., Blomberg, E., Claesson, P., Carlstedt, I. & Ljusegren, I. Mucin layers on hydrophobic surfaces studied with ellipsometry and surface force measurements. *J. Colloid Interface Sci.* **151**, 579–590 (1992).
- Marcipar, I. S., Welchen, E., Roodveldt, C., Marcipar, A. J. & Silber, A. M. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67,

and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 149–154 (2003).

Mariat F. and Sebald M. Actinomycètes. In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds). 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949. (1990).

Mazzola, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 557–64 (2002).

McKenna, F., El-Tarabily, K. A., Petrie, S., Chen, C. & Dell, B. Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 107–112 (2002).

Merritt, E. A. *et al.* Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* **3**, 166–75 (1994).

Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5005–11 (2002).

Mirelman, D. *et al.* in 225–227 (Springer US, 1996). doi:10.1007/978-1-4613-0415-9_26

Mukherjee, D., Khatua, T. N., Venkatesh, P., Saha, B. P. & Mukherjee, P. K. Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J. Ethnopharmacol.* **128**, 490–4 (2010).

Murray, P. R. & American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. (ASM Press, 1999).

Naeem, A., Ahmad, E. & Khan, R. H. An alternate high yielding purification method for *Clitoria ternatea* lectin. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**, 481–6 (2007).

Nagre, N. N. *et al.* Purification and Characterization of a Mitogenic Lectin from *Cephalosporium*, a Pathogenic Fungus Causing Mycotic Keratitis. *Biochem. Res. Int.* **2010**, 1–6 (2010).

Nascimento, K. S. *et al.* An overview of lectins purification strategies. *J. Mol. Recognit.* **25**, 527–41 (2012).

Okami Y. and Hotta K. Search and discovery of new antibiotics. In: Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M.G., Williams S.T. and Modarski M. (Eds). Acad. Press London, New-York. 33-68 (1988).

Pamboukian, C. R. D., Guimarães, L. M. & Facciotti, M. C. R. Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian J. Microbiol.* **33**, 17–21 (2002).

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

- Patyar, S. *et al.* Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.* **17**, 21 (2010).
- Pawlowski, K. & Sirrenberg, A. Symbiosis between Frankia and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 1165–83 (2003).
- Podgorskiĭ, V. S., Kovalenko, É. A., Karpova, I. S., Sashchuk, E. V & Get'man, E. I. Extracellular lectins from saprophytic strains of bacteria of the genus Bacillus (review). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **50**, 256–63(1993).
- Podgorsky, V., Kovalenko, E., Karpova, I., Sashchuk, E. & Getman, E. New Extracellular Bacillus subtilis Lectins with Sialic Acid-Specificity. *J. Agric. Sci. Technol. A J. Agric. Sci. Technol.* **4**, 541–546 (2014).
- Podgorsky, V., Kovalenko, E., Karpova, I., Sashchuk, E. & Getman, E. New Extracellular Bacillus subtilis Lectins with Sialic Acid-Specificity. *J. Agric. Sci. Technol. A J. Agric. Sci. Technol.* **4**, 541–546 (2014).
- Poget, S. F. *et al.* The structure of a tunicate C-type lectin from Polyandrocarpa misakiensis complexed with D -galactose. *J. Mol. Biol.* **290**, 867–79 (1999).
- Reponen, T. A., Gazenko, S. V, Grinshpun, S. A., Willeke, K. & Cole, E. C. Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3807–12 (1998).
- Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M. & Kim, J. J. Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* **93**, 639–48 (1998).
- Rogunova, M. A., Blackwell, J., Jamieson, A. M., Pasumar-Thy, M. & Gerken, T. A. Effects of lipid on the structure and rheology of gels formed by canine submaxillary mucin. *Biorheology* **34**, 295–308
- Rüdiger, H. in *Lectins and Glycobiology* 31–46 (Springer Berlin Heidelberg, 1993). doi:10.1007/978-3-642-77944-2_4
- Rüdiger, H. & Gabius, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* **18**, 589–613 (2001).
- Rutenber, E., Katzin, B.J., Ernst, S., Collins, E.J., Mlsna, D., Ready, M.P. and J.D., R. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins*. **240-250**, (1991).
- Rutenber, E. *et al.* Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **10**, 240–250 (1991).
- Sanchez, J.-F. *et al.* Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol. Chem.* **281**, 20171–80 (2006).
- Sanglier J.J. and Trujiollo M. Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12(13)**, 269-276 (1997).

- Sankaranarayanan, R. *et al.* A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596–603 (1996).
- Sardi, P. *et al.* Isolation of endophytic streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2691–3 (1992).
- Sardi, P. *et al.* Isolation of endophytic streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2691–3 (1992).
- Sato, Y., Morimoto, K., Hirayama, M. & Hori, K. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**, 291–6 (2011).
- Schrag, J. D. *et al.* The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell* **8**, 633–44 (2001).
- Sharon, N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **408**, 1–8 (1996).
- Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* **282**, 2753–64 (2007).
- Sharon, N. & Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R–62R (2004).
- Shi & Caldwell. Mucin Adsorption to Hydrophobic Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **224**, 372–381 (2000).
- Shirling and Gottlieb, E.B. Shirling, D. G. R. Retrospective evaluation of international Streptomyces project taxonomic criteria. (Ed.), *Actinomycetes—The Bound. Microorg. Toppan Co. Ltd., Tokyo (1976), pp. 9–41(1976).*
- Singh, J., Ahluwalia, J., Kamboj, S. S. & Singh, S. Occurrence and characterization of lectins in actinomycetes. *J. Basic Microbiol.* **33**, 207–211 (1993).
- Singh, S., C P S, Y. & Noolvi, M. N. Immunomodulatory activity of butanol fraction of *Gentiana olivieri* Griseb. on Balb/C mice. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 433–7 (2012).
- Singhal, M. & Ratra, P. Investigation of immunomodulatory potential of methanolic and hexane extract of *Musa acuminata* peel (plantain) extracts. *Glob. J. Pharmacol.* **7**, 69–74 (2013).
- Sinha, S., Gupta, G., Vijayan, M. & Surolia, A. Subunit assembly of plant lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 498–505 (2007).
- Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–79 (2000).

- Song, J. *et al.* Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 97–102 (2001).
- Soufiane B. Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. *Univ. Laval, Québec* (1998).
- Sova, O. Industrial autofocusing —a new technology for largescale isoelectric focusing. *J. Chromatogr. A* **320**, 213–218 (1985).
- Stackebrandt E. and Schumann P. Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacocaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder *Micromcoccineae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**, 1279–1285.(2000).
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actino bacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol. Int. Union Microbiol. Soc.* **47**, 479–491 (1997).
- Strous, G. J. & Dekker, J. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 57–92 (1992).
- Sugawara, H. *et al.* Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type Lectin, CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 45219–25 (2004).
- Šulák, O. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C Is a Super Lectin with Dual Specificity and Proinflammatory Activity. *PLoS Pathog.* **7**, e1002238 (2011).
- Suzuki, R. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the C-terminal domain of galactose-binding lectin EW29 from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 1895–6 (2004).
- Tai, T. & Yamashita, K. Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo-P-N-acetylglucosaminidase specificity*. *J. Biol. Chem.* **250**, 8569–8575 (1975).
- Takahashi, Y. & Omura, S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 141–54 (2003).
- Tanaka, H. *et al.* Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15633–8 (2009).
- Thirup, L., Johnsen, K. & Winding, A. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1147–53 (2001).

- Thirup, L., Johnsen, K. & Winding, A. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1147–53 (2001).
- Töpfer-Petersen, E. *et al.* Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**, 217–24
- Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. & Saper, M. A. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 779–783 (1997).
- Uchida, T. *et al.* Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 37133–41 (2004).
- V.S. Podgorsky, E.A. Kovalenko, I. A. S. Lektiny Bakterii (Bacterial Lectins in Russian). *Nauk. Dumka, Kiev, 1992, p. 204.*
- Van Damme, E. J. M. History of plant lectin research. *Methods Mol. Biol.* **1200**, 3–13 (2014).
- van Keulen, G., Jonkers, H. M., Claessen, D., Dijkhuizen, L. & Wösten, H. A. B. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185**, 1455–8 (2003).
- Van Liempt, E. *et al.* Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Letters* **580**, (2006).
- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97–130 (1993).
- Von Itzstein, M., Plebanski, M., Cooke, B. M. & Coppel, R. L. Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **24**, 210–8 (2008).
- Watson, E. T. & Williams, S. T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil— VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 43–52 (1974).
- Weis, W. I., Brünger, A. T., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J. Mol. Biol.* **212**, 737–61 (1990).
- Wellington E.M.H., A.-J. M. and B. R. Selective isolation of *Streptomyces* species-groups from soil. *Devel. Indust. Microbiol.* **28**, 99-104. (1987).
- Westover K.M., K. A. C. and K. S. E. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *J. Ecol.* **85**, 563-873. (1997).
- Whipps J. M. Carbon economy in the rhizosphere. In: Ecological and applied microbiology. Lynch J.M. (Eds). Wiley Ser. 59-97 (1990).

Williams, S.T. and Wellington, E. M. H. Actinomycetes. In: Methods of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties, second ed. Page A.L., Miller R.H. and Keency O.R.. (Eds). *Am. Soc. Agron. Sci. Soc. Am. Madison*. 967-987 (1982).

Wright, C. S. Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* **141**, 267–91 (1980).

Wright, C. S. & Hester, G. The 2.0 Å structure of a cross-linked complex between snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding modes. *Structure* **4**, 1339–52 (1996).

Yamada, Y. & Aketa, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 220–6 (1982).

Yu, X. Q. & Kanost, M. R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 37373–81 (2000).

Zaitlin, B., Watson, S. B., Ridal, J., Satchwill, T. & Parkinson, D. Actinomycetes in Lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *J. Am. Water Works Assoc.* **95**, 113–118

Zeegers-Huyskens, T. & Huyskens, P. in *Intermolecular Forces* 1–30 (Springer Berlin Heidelberg, 1991). doi:10.1007/978-3-642-76260-4_1

Zhigis, L. S. *et al.* Purification of sialic acid binding protein from saprophytic bacteria by hydrophobic-interaction chromatography on butyl-toyopearl and polymer-coated porous glass. *Biotechnol. Tech.* **7**, 667–670 (1993).

Ziółkowska, N. E. & Wlodawer, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 617–26 (2006).

ANNEXE 1**Milieux de culture****Milieu *ISP*₂**

Extrait de levure.....	4g
Extrait de Malt.....	10g
D-Glucose.....	4g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3

Stérilisation : 30 mn à 110 C

Milieu Bennett

Glucose.....	10g
Extrait de levure.....	1g
Caseine digest.....	2g
Extrait de viande de bœuf.....	1 g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

pH =7,3

Stérilisation : 30 mn à 110 C

Milieu Sabouraud

Glucose.....	40g
Peptone.....	10g
Caseine digest.....	2g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml

pH =7

Stérilisation : 30 mn à 110 C

Milieu Muller-Hinton

Glucose.....	10g
--------------	-----

Extrait de viande.....	1 g
Hydrolysate acide de caseine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	10g
Eau distillée.....	1000 ml

pH =7,3

Stérilisation : 15 mn à 1105C

ANNEXE 2

Solutions

Solution A (Tris 1M)

224,22g Tris dans 200 mL d'eau, pH ajusté à 7,5 avec du HCl 6N

Solution B (HEPES 1M)

47,66g dans 200 mL d'eau, pH ajusté à 7,5 avec du HCl 1N

Solution C (NaCl 5M)

58,44g dans 200 mL d'eau

Tampons

Tampon Tris-HCl, pH 7,5 (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl)

Pour 1 litre : 20 mL solution A + 20 mL solution C + 960 mL d'H₂O

Tampon HEPES, pH 7,2 (20mM HEPES, 150mM NaCl)

Pour 1 litre : 20 mL solution B + 20 mL solution C + 960 mL d'H₂O

Tampon PBS 0,01 M, pH 7,2

Pour 1000 mL d'eau distillée : 8g (NaCl) ; 0,20g (KCl) ; 1,15 (Na₂HPO₄) ; 0,20g (KH₂PO₄)

ANNEXE 3

Suspension

Suspension d'hématies à 4%

Les prélèvements sont centrifugés à 800g pendant 10 mn. Les culots d'hématies sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique. Une suspension d'hématies à 4% v/v dans la solution saline à 150 mM. Cette suspension peut être conservée jusqu'à cinq jours à 4C.

ANNEXE 4

Dosage des proteines (Bradford1976)

Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie.....100 mg

Ethanol absolu.....50 mL

Acide phosphorique à 85%100 mL

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

Courbe d'étalonnage

Une gamme étalon (0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 microgrammes) est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine de 1 mg/1 mL P/V. Les échantillons sont ajustés à un volume final de 100 microlitres Après addition de 3 mL de réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.

ANNEXE 5

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

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

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

ANNEXE 6**Électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)****(Lammeli, 1970)****Tampon de séparation (pH 8,8)**

Tris-HCL.....0,15M

SDS.....0,4g

Compléter à 100mL avec l'eau distillée

Gel de séparation (Running gel) à 15%

Acrylamide 30%.....2,5mL

Tampon de séparation (pH 8,8).....1,3mL

Eau distillée1,1mL

APS 10%50µl

SDS 10%.....2µl

TEMED.....5µl

Volume totale5mL

Tampon de migration (10X)

Tris (base).....30g

Glycine.....144g

SDS.....10g

Compléter à 1000 mL avec l'eau distillée

La solution de décoloration

Méthanol125mL

Acide acétique glaciale.....50mL

Eau distillée.....500mL

Tampon de concentration (pH 6,8)

Tris -HCL0,05mL.

SDS0,4g.

Compléter à 100mL avec l'eau distillée.

Tampon d'échantillon (5X)

Tris-HCL pH 6,6.....2,5mL.

SDS.....1g

Glycérol.....5mL

Bleu de bromophénol.....5mg

DTT.....772mg

Compléter à 10mL avec l'eau distillée

La solution de coloration

Méthanol20mL

Acide acétique5mL

BBC R- 250.....0,02g

Eau distillée50mL

ANNEXE 7

Identification des protéines par spectrométrie de masse

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	Unique Peptide	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P00698	Lysozyme C OS=Galus gallus GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_CHICK]	4920,89	80,27	17	12	16	335	147	16,2	9,07
P01012	Ovalbumin OS=Galus gallus GN=SERP1NB14 PE=1 SV=2 - [OVAL_CHICK]	2043,00	38,86	4	10	13	107	386	42,9	5,29
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_	1587,46	50,00	35	21	33	79	644	66,0	8,12
P02769	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 - [ALBU_BOVIN]	1564,47	55,68	9	14	35	88	607	69,2	6,18
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C1_	772,53	37,50	32	14	25	49	584	58,8	5,21
P02789	Ovotransferrin OS=Galus gallus PE=1 SV=2 - [TRFE_CHICK]	759,91	42,13	2	10	28	67	705	77,7	7,12
P02662	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S1 PE=1 SV=2 - [CASA1_BOVIN]	597,31	46,28	3	9	11	47	214	24,5	5,02
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_	567,66	36,92	7	10	17	30	623	62,0	5,24
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=	494,58	41,47	22	6	23	32	639	65,4	8,00
P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]	383,35	19,38	4	2	3	24	609	69,3	6,28
P02666	Beta-casein OS=Bos taurus GN=CSN2 PE=1 SV=2 - [CASB_BOVIN]	233,93	28,57	4	2	6	17	224	25,1	5,35
P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1 - [CYTA_HUMAN]	232,90	84,69	1	3	8	19	98	11,0	5,50
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C1_	197,61	17,37	37	2	9	14	472	51,5	5,16
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_	189,57	26,10	18	3	16	18	590	62,3	7,74
P00761	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 - [TRYP_PIG]	188,12	19,91	1	2	4	12	231	24,4	7,18
FJNM87	Ovodeidin-116 OS=Galus gallus PE=1 SV=1 - [OC116_CHICK]	163,64	24,36	2	3	12	24	743	76,8	6,92
P01014	Ovalbumin-related protein Y OS=Galus gallus GN=SERP1NB14B PE=1 SV=1 - [O	116,12	11,34	1	1	4	6	388	43,7	5,30
P01005	Ovomucoid OS=Galus gallus PE=1 SV=1 - [OVO_CHICK]	112,16	33,33	1	2	5	9	210	22,6	4,91
Q86Y23	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]	100,96	5,72	1	1	3	5	2850	282,2	10,04
P62894	Cytochrome c OS=Bos taurus GN=CYCS PE=1 SV=2 - [CYC_BOVIN]	100,36	39,05	23	2	4	7	105	11,7	9,50
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DND PE=1 SV=2 - [DND_HUMAN]	94,44	22,73	1	1	2	6	110	11,3	6,54
P67975	Beta-lactoglobulin OS=Ovis orientalis musimon GN=LGB PE=1 SV=1 - [LACB_OVI	85,94	37,04	2	2	5	7	162	18,1	5,38
P16973	Lysozyme C OS=Oryctolagus cuniculus GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_RABBIT]	81,69	20,77	11	1	2	11	130	14,7	8,62
P02663	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 - [CASA2_BOVIN]	80,59	24,77	3	2	7	10	222	26,0	8,43
Q11010	Aminopeptidase N OS=Streptomyces lividans GN=pepN PE=1 SV=1 - [AMPN_ST	71,19	2,68	1	1	3	3	857	94,4	4,89
P24163	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment) OS=Enterobacter aero	68,41	16,33	23	1	4	5	294	31,4	6,70
P02663	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus GN=CSN1S2 PE=1 SV=2 - [CASA2_BOVIN]	67,15	18,47	1	1	4	5	222	26,0	8,43
P29508	Serpin B3 OS=Homo sapiens GN=SERP1NB3 PE=1 SV=2 - [SPB3_HUMAN]	66,70	12,05	1	1	4	4	390	44,5	6,81
P20930	Flaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3 - [FLA_HUMAN]	66,15	0,86	1	1	7	7	4061	434,9	9,25
Q9H271	30S ribosomal protein S1 OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / PA	65,72	6,98	1	1	3	4	559	61,8	4,93
P77258	N-ethylmaleimide reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nema PE=2 SV=	64,81	5,75	1	1	2	2	365	39,5	6,20
P14923	Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]	64,73	4,97	5	1	3	3	745	81,7	6,14
O66190	60 kDa chaperonin (Fragment) OS=Enterobacter aeruginosa GN=groL PE=3 SV=1	64,09	4,82	376	1	3	4	539	56,4	4,94
B1W027	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Streptomyces griseus subsp. griseus (strain	59,69	7,43	3	2	4	4	552	60,8	5,55
A8M2A6	Pup-protein ligase OS=Salinispora arenicola (strain CNS-205) GN=paFA PE=3 SV	59,15	6,86	1	1	3	3	452	51,6	8,41
A0QWV2	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (str	58,24	11,76	29	2	4	8	340	35,9	5,35
P00004	Cytochrome c OS=Equus caballus GN=CYCS PE=1 SV=2 - [CYC_HORSE]	56,95	18,10	4	1	2	3	105	11,8	9,57
A0LEQ1	NADH-quinone oxidoreductase subunit D OS=Synthrophobacter fumaroxidans (st	55,99	2,14	1	1	1	2	373	42,5	7,06
O53521	Long-chain fatty acid-CoA ligase FadL5 OS=Mycobacterium tuberculosis (strai	55,29	3,00	2	1	1	2	600	64,0	6,24
A15E40	NADH-quinone oxidoreductase subunit N OS=Nocardioideis sp. (strain BAA-499 /	53,57	1,69	3	1	1	2	533	56,1	5,30
Q8P441	Aliphatic sulfonates import ATP-binding protein SsuB 1 OS=Anthomonas axonop	52,33	3,57	2	1	1	1	252	27,4	8,24
P22248	Glutamine synthetase OS=Azotobacter vinelandii GN=gluA PE=3 SV=1 - [GLNA_	52,18	3,43	3	1	2	2	467	51,7	5,25
Q8UJ99	Adenosylhomocysteinase OS=Agrobacterium tumefaciens (strain C58 / ATCC 33	52,04	2,58	30	1	1	1	466	51,1	5,68
Q79H99	Potassium channel AKT2 OS=Cryza sativa subsp. japonica GN=C5g0428700 P	51,55	0,94	1	1	1	2	855	94,7	7,09
POCG05	Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1 - [LAC2_	50,34	9,43	2	1	1	1	106	11,3	7,24
P0A8U3	Ribosome-binding ATPase YnfF OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ynfF PE=3 SV=	49,73	6,34	1	1	2	2	363	39,6	4,96
Q8QGV2	Wee1-like protein kinase 1-B OS=Xenopus laevis GN=wee1-b PE=1 SV=1 - [WEE	49,29	1,18	4	1	1	1	595	66,6	6,55
A4W699	Thymidine phosphorylase OS=Enterobacter sp. (strain 638) GN=deoA PE=3 SV=	49,15	2,50	22	1	1	1	440	47,0	5,36
Q9BK57	Uproton-releasing system ATP-binding protein LolD OS=Rhizobium loti (strain f	48,94	3,10	2	1	1	1	226	24,4	8,19
P0A8C8	Protein Hrk OS=Escherichia coli O157:H7 GN=hrk PE=3 SV=1 - [HFLK_EC057]	48,42	2,86	1	1	1	1	419	45,5	6,43
P0AD62	Pyruvate kinase 1 OS=Escherichia coli O157:H7 GN=pykF PE=3 SV=1 - [PYK1_E	47,97	6,60	1	1	2	3	470	50,7	6,09
Q9XAC0	Transaldolase 2 OS=Streptomyces coelicolor (strain ATCC BAA-471 / A3(2) / M1-	47,42	9,14	1	1	4	4	372	40,6	5,05
P48243	Glutamate transport ATP-binding protein GluA OS=Corynebacterium glutamicum	46,85	5,79	1	1	1	1	242	26,5	5,95
A5F6C4	Flagellin B OS=Vibrio cholerae serotype O1 (strain ATCC 39541 / Classical Ogaw	45,86	2,93	15	1	1	1	376	39,5	5,19
Q9ZEM7	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Streptomyces galbus GN=fba PE=1 SV=2 -	45,62	2,94	1	1	1	1	340	36,5	5,27
C1BAC4	Cysteine--tRNA ligase OS=Rhodococcus opacus (strain B4) GN=cysS PE=3 SV=1	45,58	1,72	1	1	1	1	464	51,5	5,62
P36003	Nitrogen network kinase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 /	45,24	0,86	1	1	1	1	928	103,9	8,78
P0A9A8	Cell division protein FtsZ OS=Escherichia coli O157:H7 GN=ftsZ PE=3 SV=1 - [FT	44,88	3,39	2	1	1	1	383	40,3	4,78
P59962	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Mycobacterium bovis (strain ATCC	44,62	1,24	3	1	1	1	806	85,4	5,59
A4W689	Na(+)/H(+) antiporter NhaA 1 OS=Salinispora tropica (strain ATCC BAA-916 / D	44,61	3,44	13	2	2	4	436	46,5	8,48
A0Q6F0	Sulfate adenylyltransferase subunit 1 OS=Francisella tularensis subsp. novicida	44,53	1,49	3	1	1	1	470	52,8	6,80
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3 -	44,22	8,15	1	1	1	1	135	15,2	7,01
D2NQQ7	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Rotheia mudiginosa (strain DY-18	43,42	4,89	1	1	2	2	756	82,2	5,53
O62683	Tight junction protein ZO-3 OS=Canis familiaris GN=TJP3 PE=1 SV=1 - [ZO3_CA	42,77	0,78	1	1	1	2	898	98,4	7,31
P52552	Peroxisome oxidin-2 (Fragment) OS=Sus scrofa GN=PRDX2 PE=2 SV=1 - [PRDX2_P	42,58	14,17	10	1	2	2	127	14,2	4,82
Q12X37	Phosphoribosylamine--glycine ligase OS=Methanococcus burtonii (strain DSM 1	42,57	2,31	1	1	1	3	432	46,6	4,83
Q9ZPR1	Cell division control protein 48 homolog B OS=Arabidopsis thaliana GN=CDC48B F	42,57	1,33	1	1	1	1	603	65,9	7,08
Q9X8U3	Single-stranded DNA-binding protein 2 OS=Streptomyces coelicolor (strain ATCC	42,51	6,03	2	1	1	1	199	19,9	5,38
P21220	High-molecular weight cobalt-containing nitrile hydratase subunit beta OS=Rhodi	42,32	3,49	1	1	1	1	229	26,3	6,28
POC2W8	Collagen alpha-1(I) chain OS=Manumt americanum GN=COL1A1 PE=1 SV=4 - [C	41,90	0,85	7	1	1	1	1057	94,6	9,29
P0A878	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=abl	41,04	2,51	2	1	1	1	398	43,1	5,97
P90275	Anaphase spindle elongation protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC	40,98	1,02	1	1	1	2	885	101,6	9,07
Q8R954	Diaminopimelate epimerase OS=Caldaneroobacter subterraneus subsp. tengcon	40,05	3,28	1	1	1	1	274	30,2	5,74
P57531	Membrane-bound lytic murein transglycosylase A homolog OS=Budnera aphidic	39,56	2,51	1	1	1	1	359	41,7	9,79
P06938	Protein Vpr OS=Human immunodeficiency virus type 2 subtype A (isolate ROD) G	39,03	6,67	2	1	1	2	105	11,8	7,52
P33389	Protein DUU_0535 OS=Desulfovibrio vulgaris (strain Hildenborough / ATCC 2957	38,83	1,89	1	1	1	1	370	40,0	7,23
A4QDHO	ATP synthase subunit delta OS=Corynebacterium glutamicum (strain R) GN=atp	38,39	2,58	1	1	1	1	271	28,9	5,57

<p>Nom : BOULAHROUF Prénom : Khaled</p>	<p>Date de soutenance : / / 2016</p>
<p>Thème: Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par des souches pures d'actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de <i>Lactuca sativa</i>, <i>Vicia fabae</i>, <i>Prunus domestica</i> et <i>Pinus halepensis</i>. Tests biologiques des lectines caractérisées.</p>	
<p>Résumé</p> <p>Les lectines sont présentes dans tous les organismes vivants et sont utilisées comme outils dans la recherche et dans le secteur biomédical. Actuellement, les lectines microbiennes suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leurs diverses activités biologiques.</p> <p>Des souches d'actinomycètes rhizosphériques promotrices de croissance de plantes et antagonistes des mycètes et des bactéries pathogènes de ces mêmes plantes ont été retenues pour mettre en évidence la production des lectines, de les purifier, de les caractériser et d'étudier leurs activités biologiques. Les six souches, étudiées, ont été identifiées aux genres : <i>Streptomyces</i> et <i>Nocardia</i>. Les souches ont été cultivées sur deux milieux liquides (Bennet et <i>ISP2</i>). Le pouvoir agglutinant des extraits extracellulaire et intracellulaire des deux milieux de culture est mis évidence en présence de sept types d'érythrocytes.</p> <p>Les deux extraits des six souches, quel que soit le milieu, n'ont agglutiné aucun érythrocyte humain. Les plus fortes agglutinations ont été obtenues avec les extraits intracellulaires en présence d'érythrocytes de rats et de lapins. Le milieu <i>ISP2</i> favorise mieux la production des lectines. Les fractions intracellulaires agglutinant fortement les érythrocytes de rats ont été retenues. Celle de la souche Pru16 pour purification et caractérisation et celle de la souche Vic8 pour l'étude de l'effet immuno-modulateur.</p> <p>Les lectines, de la fraction intracellulaire de la souche Pru16 a subi une première purification primaire par du sulfate d'ammonium et filtration sur gel G75. La précipitation différentielle a montré que les trois premières fractions présentent une activité hémagglutinante. Après filtration, deux pics ont été observés (pics A et B). Le pic B ne présente aucune activité hémagglutinante. Cependant, l'activité spécifique de l'extrait brut était de 8,37 UH/mg, et elle est passée à 14,95 UH/mg après précipitation au sulfate d'ammonium, puis à 20 UH/mg (picA).après filtration sur gel G75. L'activité hémagglutinante de cette fraction persiste à des pH alcalins et à des concentrations importantes en EDTA.</p> <p>Après chromatographie sur colonne mucine sépharose 4B (deuxième purification), deux pics sont observés. La fraction proteique 33 du pic 2 présente une forte activité hémagglutinante spécifique environ douze fois plus importante que celle observée pour l'extrait brut (111,49 contre 8,37 UH/mg), en revanche celle du pic 1 ne présente aucune activité hémagglutinante. Le test d'affinité conduit avec la fraction proteique 33 du pic 2 a montré que la souche Pru16 se lie spécifiquement aux protéines. L'analyse SDS-page a démontré que les hémagglutinines contenues dans la fraction 33 du pic P2 se situées dans la bande 16kDa</p> <p>L'identification des protéines de la bande 16kDa, après digestion et élution des peptides par LC, s'est faite par spectrométrie de masse tandem en comparant avec la base de données protéomiques de souches apparentées. L'analyse a permis d'identifier 6 protéines similaires différentes, cependant une seule présente un score assez élevé, avec un poids moléculaire similaire à celui de la bande proteique. Il s'agit du lysozyme C qui lui n'a pas d'activité hémagglutinante. Notre proteine de 16kDa ne présente d'activité antimicrobienne.</p> <p>L'augmentation de l'indice phagocytaire, de l'indice phagocytaire corrigé, et de la diminution du temps de demi-vie des particules de carbone en circulation dans le sang indiquent que l'extrait brut de la souche Vic8 possèdent un ou plusieurs facteurs capables de stimuler de manière significative l'activité phagocytaire des macrophages et du système réticulo-endothélial chez les souris. Cet effet est comparable à celui exercé par les lectines pures.</p>	
<p>Les mots clés: <i>Actinobacteria</i>, actinomycètes aérobies, rhizosphère, lectines glycoconjugués, fermentation, purification des proteines, immunostimulation.</p>	
<p>Laboratoire de recherche : laboratoire de génie microbiologique et applications</p>	
<p>Président : Mr. Khelifi Douadi Directeur thèse: Mr. Necib Youcef Éxamineurs : Mr. Hamidechi M^{ed} Abdelhafid Mr. Arhab Rabah Mr. Ouldjaoui Abdallah</p>	<p>Prof. Univ. Frères Mentouri-Constantine Prof. Univ. Frères Mentouri-Constantine Prof. Univ. Frères Mentouri-Constantine Prof. Univ. Larbi Ben M'hidi-OEB Mc /A. Univ. Larbi Ben M'hidi-OEB</p>