

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique

# *Mémoire de fin de cycle*

**Filière :** Biologie

**Option:** Biochimie Appliquée

## *thème*

### *Analyse des activités et composés de Cordyceps sinensis*

*Présenté par :*

- ✓ *Melle* SAADI Kahina
- ✓ *Melle* SAADI Samira

*Devant les Membres de jury :*

Président : M<sup>me</sup>BOULEKBACHE L. M.C.A

Promoteur : M<sup>r</sup>GHIDUCHE A. M.C.B

Examineur : M<sup>r</sup>HARFI T. M.A.B

Examineur : M<sup>r</sup>TACHERFIOUT M. M.A.A

2013/2014



# Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au bon dieu le tout puissant de nous avoir accordé santé, courage volonté et surtout patience pour accomplir ce modeste travail.*

*A D<sup>r</sup> Ghidouche. A, notre guide par excellence, qui a accepté de nous encadrer, on vous remercie pour tous vos conseils et remarques qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*On vous remercie pour votre gentillesse, votre disponibilité tout le long de notre travail et surtout pour votre patience.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury, D<sup>r</sup> Boulekbatche.L pour avoir accepté de présider le jury et évaluer notre travail.*

*On remercie vivement M<sup>r</sup> Hrafi.T et M<sup>r</sup> Tacherfiout.M pour avoir accepté d'examiner notre travail.*



*Notre gratitude et considération s'adresse également à toute l'équipe de laboratoire d'enzymologie de D<sup>r</sup> Khettal.B et toute les techniciennes.*

*M<sup>lle</sup> Ait Ali .D pour sa gentillesse, son aide et ces conseils merci pour tout.*

*L'équipe de laboratoire de chimie industrielle qui nous a donné la chance de faire le test La spectroscopie IR-TF.*

*On tient à exprimer nous reconnaissances à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant tout le cursus universitaire.*

*Tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à nos familles pour la réalisation de notre travail.*



# Dédicaces

*je dédie ce travail qui n'aurait pu aboutir et avoir la lumière sans  
l'aide du bon Dieu le tout puissant*

*A la mémoire de mes grands-pères et ma grand-mère que  
dieu les accueille dans son vaste paradis*

*A ceux qui m'ont donné sans rien en retour, a ceux qui m'ont encouragé et soutenu  
dans les moments les plus difficiles, qui ont consacré et sacrifié leur vie pour moi  
mes chers parents, symbole de courage et de volonté je suis très fière de les avoir et  
tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte*

*A toi papa Smail, mon ange gardien, mon exemple dans la vie, sans toi je ne puisse  
ni vivre ni arrivé a ce que je suis merci papa*

*A toi maman Lila, la lumière de ma vie, la plus belle des mères, qui m'a appris d'être  
femme avant tout, ses conseils, son encouragement je t'aime maman*

*A ma grand-mère Taous, que dieu la protège et la garde en bonne santé*

*A ma chère adorable sœur Souad, mon aide dans le parcours de ma vie*

*A mes chers frères, Toufik et Billel, ma joie et ma fierté*

*A toi Mouloud, mes prunelles des yeux, mon chère mari, pour ton aide, tes conseils  
mon beau père Hamid, ma belle mère Khokha, et surtout ma belle sœur Lila.*

*A tous mes oncles et tantes (Abderrahmene, Malika, Zahra  
Malika, Ahcene, Nacira, Hocine, Salih, et Khalti Karima)*

*A tous mes cousins et toutes mes cousines paternels et maternels sans oublier  
personne et surtout ma petite adorable « Anais ».*

*A toi Samira ma chère binôme qui a fait un grand effort merci pour tout et ta  
famille.*

*A tous mes amies proches surtout (Hanene, Bisma, Zohra, Farida, et toute la  
promotion biochimie appliquée.*

*A toute personne qui m'a aidé de près ou de loin merci.*

*A mon promoteur D<sup>r</sup> Ghidouche . A Merci*

*S.Kahina.*

# Dédicaces

*Avec ma profonde gratitude et grand amour, je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, **Malek** et **Hakima** à qui je ne trouve pas de mots pour les remercier, je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi, vous me comblez de bonheur, Merci d'être là pour moi.*

*A ma sœur **Karima** et son mari **Hillel** qui m'ont soutenu et toute sa famille*

*Mon très cher frère **Toufik** et je le remercie pour tous ce qu'il avait fait et aura à faire pour moi au cours de ma vie*

*Mon adorable et cher petit frère **Azzedine** pour leur présence et leur réconfort dans la vie*

*A ma petite sœur **Noumidia** mon âme sœur je t'aime .*

*À toi, **Rabah sentouh**, qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, et pour compenser mes faiblesses littéraires... Sans toi, je ne serais certainement pas en train d'écrire ces lignes Je n'ai pas de mots pour te dire à quel point je te remercie pour tout*

*Mon cher et précieux oncle **Aziz** et ma grande mère maternelle **Malika***

*Mes très chères et précieuses tantes paternelles : **Addila**, **Ghania** et sa famille et **LILA** et sa fille **Tiziri** pour leur soutien et leur présence au long de ma vie.*

*Le plus grande merci dédicace à des personnes de la pharmacie sentouh à el-kœur **Farid**, **Hafid** et **Dadou** leur famille merci et mille Merci*

*A ma binome, ma meilleure amie **Kahina** et sa famille*

*A tous mes amis : Fifi, lila, mina, nedjma, koka, besma, zohra, farida, lynda, derifa, siham, samira, noura, farida, halim, khaled, adlane, nabil, bakli, karim, chafiaa (chitouh), nasira, chafiaa, cylvia, sonia et a tous mes connaissance*

*A Toute La Promotion biochimie appliquée 2014*

*Sans oublier mon promoteur **Dr GHIDOUCHE A.***

# Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

## *Partie théorique*

### *Chapitre I : Généralités sur cordyceps sinensis*

I.1. Définition .....	2
I.2. Habitat et origine.....	3
I.3. Analyse phylogénétique du genre Cordyceps.....	4
I.4. Principes bioactifs et leurs structures.....	5
I.4.1. Polysaccharides .....	8
I.4.2. Les nucléosides .....	8
I.4.3. Les stérols .....	8
I.4.4. Les peptides et les protéines .....	9
I.5. Méthodes de préparation de <i>Cordyceps Sinensis</i> pour l'alimentation.....	9
I.5.1. Milieu liquide.....	9
I.5.2. Milieu solide .....	10

### *Chapitre II : Les différentes activités et effets des extraits de cordyceps sinensis*

II.1. Activité antioxydante.....	11
II.2. Activité Anticancéreuse.....	11
II.3. Effet sur la Fatigue.....	13
II.4. Affections rénales .....	14
II.5. Effet hypoglycémiant .....	14

II.6. Maladies du foie .....	15
II.7. Toxicité et effets secondaires .....	16

## *Chapitre III : Méthodes de dosage des protéines*

III.1. Méthodes colorimétriques .....	17
III.1.1. Méthode de Bradford .....	17
III.1.2. Principe.....	17
III.1.3. Solutions utilisées.....	18
IV.2.Méthodes non colorimétriques .....	20
III.2.1. Définition de l'électrophorèse.....	20
III.2.2. Définition de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS .....	21
III.2.2.1. Principe.....	21
III.3. La spectroscopie de masse .....	23
III.3.1. La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier(IR- TF).....	23
III.3.2. Principe.....	23
III.3.3. Les avantages .....	26

## *Partie pratique et résultats*

I. Matériels utilisés .....	27
I.1. méthodes d'extraction .....	27
I.1.1. Extraction à l'eau chaude.....	28
I.1.2. Extraction au méthanol .....	28
I.2. Dosage des protéines des échantillons .....	28
I.2.1. Préparation des solutions .....	28

I.3. La méthode de Bradford .....	29
I.3.1. La courbe d'étalonnage.....	29
I.3.2. Dosage des protéines des échantillons.....	29
II. Electrophorèse .....	32
II.1. Réalisation de l'électrophorèse .....	33
II.1.1. Préparation des gels .....	33
II.1.2. Le gel de séparation.....	34
II.1.3. Le gel de concentration.....	34
II.1.4. Le tampon de migration.....	35
II.2. La migration.....	35
II.2.1. Révélation des bandes de migration électrophoretique.....	35
II.3. Coloration .....	36
II.4. Décoloration .....	36
III.1. L'analyse électrophorétique des protéines.....	37
III.2. spectroscopie IR-TF .....	38
Discussion et conclusions.....	43

# Liste des figures

<b>Figure 1</b>	: Photographie de <i>Cordyceps sinensis</i> .....	2
<b>Figure 2</b>	: Développement de cordyceps sur l'insecte.....	3
<b>Figure 3</b>	: Constituants chimiques de <i>Cordyceps sinensis</i> et leurs structures.....	6
<b>Figure 4</b>	: L'effet de <i>Cordycaps sinensis</i> sur la cellule cancéreuse .....	13
<b>Figure 5</b>	: Structure d'une molécule du bleu de coomassie.....	19
<b>Figure 6</b>	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèses .....	22
<b>Figure 7</b>	: Structure de l'acrylamide et de bis-acrylamide.....	22
<b>Figure 8</b>	: Principe de la spectroscopie IR-TF.....	24
<b>Figure 9</b>	: Le devenir des radiations IR émises .....	25
<b>Figure 10</b>	: Conversion d'interférogramme en spectre .....	25
<b>Figure 11</b>	: Photographie des spores de <i>Cordyceps sinensis</i> utilisées pendant l'étude .....	27
<b>Figure 12</b>	: Les étapes de préparation de poudre de <i>Cordyceps sinensis</i> .....	27
<b>Figure 13</b>	: Résultats de la courbe d'étalonnage .....	39
<b>Figure 14</b>	: Représentations graphiques de la concentration protéiques du lait témoin et des échantillons .....	30
<b>Figure 15</b>	: Représentation graphique de la concentration protéique du lait témoin .....	31
<b>Figure 16</b>	: Préparations des échantillons .....	33
<b>Figure 17</b>	: Montage des plaques d'une électrophorèse monodimensionnelle .....	34
<b>Figure 18</b>	: Electrophoregrammes du lait en SDS-PAGE .....	38
<b>Figure 19</b>	: Profil de l'infrarouge du lait témoin .....	39
<b>Figure 20</b>	: Profil de l'infrarouge du H4.....	40



**Figure 21** : Les profils de tous les échantillons et du lait témoin ..... 41

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les divers composés et leurs activités biologiques rapportés dans le <i>Cordyceps sinensis</i> .....	7
<b>Tableau II</b> : Composition du bleu de coomassie .....	28
<b>Tableau III</b> : Tableau récapitulatif des résultats de la méthode de Bradford .....	30
<b>Tableau IV</b> : Pourcentage de lait témoins .....	31
<b>Tableau V</b> : Composition chimique du tampon de migration .....	35
<b>Tableau VI</b> : Composition de la solution de coloration .....	36
<b>Tableau VII</b> : Composition de la solution de décoloration.....	36

# *Liste des abréviations*

**ADN** : L'acide désoxyribonucléique.

**ATP** : adénosine-5'-triphosphate.

**APS** : l'ammonium persulfate.

**BHT** : butylhydroxytoluène.

**BSA** : bovine sérum albumine.

**C°** : degré Celsius

**Ca** : Calcium.

**CS** : cordyceps sinensis.

**Cu** : Cuivre.

**DPPH**: 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

**ERV** : entérocoques résistants et des levures.

**FDA** : Food and Drug Administration.

**Fe** : Fer.

**g** : gramme.

**HPLC** : chromatographie liquide à haute pression.

**J** : jour.

**IR** : rayonnement infrarouge.

**IR-TF** : infrarouge à transformée de à transformée de Fourier.

**K** : Potassium.

**Leu** : Leucine .

**m/z** : masse/charge.

**ml** : millilitre.

**Mm** : micromètre.

**µL** : microlitre.

**Mg** : microgramme.

**mA** : milliampère.

**min** : minutes.

**Na** : Sodium.

**OMS** : l'Organisation Mondiale de la Santé.

**p/v** : poids par volume.

**Phe** : phénylalanine.

**Pro** : Proline .

**%** : pourcentage.

**SDS-PAGE** : Sodium Dodécyl-Sulfate sur gel polyacrylamide.

**TEMED** : N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane – toxique.

**V** : voltage.

**Vit** : vitamine.

**V/V** : volume volume.

**Zn** : Zinc.

Depuis l'antiquité, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle pour l'Homme. Toutefois, personne ne cherchait à savoir comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet il est étonnant qu'une substance issue d'un organisme puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**Schauenburg et Ferdinand, 2006**).

Après une domination de la synthèse chimique un regain d'intérêt a été remarqué dans la pharmacologie, mais aussi la nutrition et l'agroalimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). Mais leurs usages traditionnels n'ont jamais disparus, bien au contraire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2008, 80 % de la population mondiale se repose sur la médecine traditionnelle pour leurs soins primaires (**Pierangeli et al, 2009**).

La phytothérapie est un univers étonnant où ils on découvre des plantes aux vertus diverses. Dans le cas présent, il s'agit tout d'abord d'un champignon tibétain qui ressemble à la fois au riz et au chou-fleur qui est le *Cordyceps sinensis*.

*Cordyceps sinensis* (champignon chenille chinois) est un champignon parasite sur les larves de lépidoptères qui a été considéré comme un aliment tonique précieux depuis les temps anciens en Chine (**Eisenbergetal, 1998**).

Le *Cordyceps sinensis* et ses produits contenant les substances actives importantes sont disponibles en Chine et beaucoup de pays du monde. Il est rapporté pour être capable d'une variété d'activités biologiques, y compris la régulation de réponses immunologiques et inflammatoires, et pour avoir des propriétés anti- tumorales (**WinklerD,2008a**).

**Dans cette optique nous nous proposons de doser les protéines du lait fermenté avec le *Cordyceps sinensis* par une méthode colorimétrique qui est la méthode de bradford ainsi l'analyse de ces protéines par deux techniques différentes qui sont l'électrophorèse et la spectroscopie IR-TF**

### I.1. Définition

Le nom de *Cordyceps* est dérivé du *cordon* de mots latin, signifiant «club», et *cèpes*, ce qui signifie «tête». Plusieurs espèces de *Cordyceps* sont considérées comme des agents thérapeutiques dans la médecine chinoise (Halpern, Georges M. 2007).

*Cordyceps* est un genre d'ascomycète comprenant environ 400 espèces identifiées et beaucoup reste à décrire. Toutes les espèces de *Cordyceps* sont endoparasitoïdes, principalement sur les insectes et autres arthropodes, quelques-uns sont des parasites sur d'autres champignons. A ce jour, les meilleures espèces connues du genre est *Cordyceps sinensis*, d'abord enregistré en tant que chenille-champignon au Tibet au 15ème siècle (Winkler, D. 2008a), et connu sous le nom *yarshagumba* en népalais et "champignon chenille" en anglais. sa partie aérienne le carpophore a la forme d'un doigt de 4 cm à 11 cm de long, (Holliday, J et al., 2008)

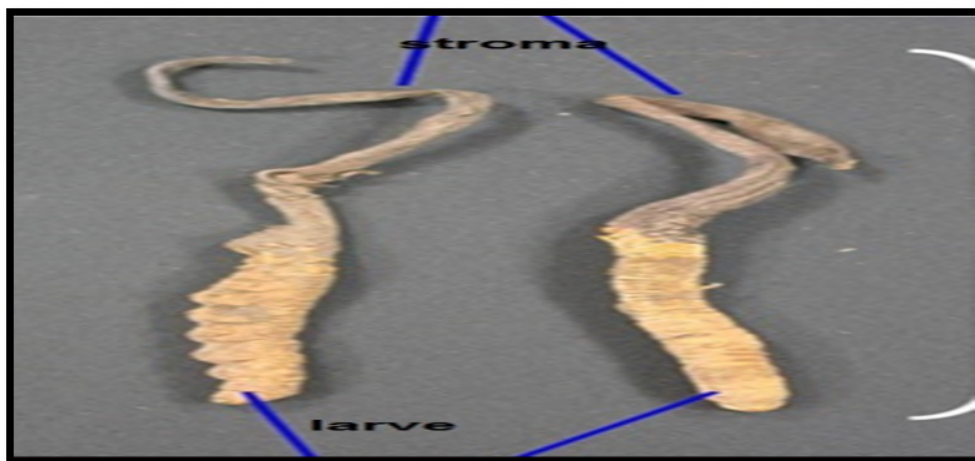


Figure 1 : Photographie de *Cordyceps sinensis* (Kim et al., 2006).

Quand un champignon attaque une hôte, (figure2) le mycélium envahit et éventuellement remplace le tissu de l'hôte, tandis que le corps de fructification allongé peut être cylindrique, ramifié, ou de forme complexe. Le ascocarpe porte de nombreuses petites fructifications en forme de flacon périthèces contenant ASCI. Ceux-ci, à leur tour, contiennent des ascospores filiformes, qui se décomposent généralement en fragments et sont vraisemblablement infectieux. Certaines espèces de *Cordyceps* ont la capacité d'influencer le comportement de leur hôte (Neurophilosophy: 1.,2006).



**Figure 2** : Développement de *Cordyceps sinensis* sur l'insecte (Paterson, 2007).

Il existe d'autres souches de cordyceps qui ont des composés biologiquement intéressants, tout comme ceux trouvés dans le *Cordyceps Sinensis*. Le genre de cordyceps a montré une large gamme d'activités telles que les capacités anti tumorales, sa capacité à stimuler le système immunitaire et son utilisation comme antibiotiques puissants. ( Nigel L, et al., 2007).

Certaines espèces *Cordyceps* sont des sources de substances biochimiques ayant des propriétés biologiques et pharmacologiques intéressantes ( Holliday, J et al., 2004) comme la cordycépine. La cyclosporine qui est un suppresseur du système immunitaire est retrouvée dans l'anamorphe de *Cordyceps subsessilis* (Holliday, J 2005).

## **I.2. Habitat et origine**

Le développement de CS hors de la larve de mites est réalisé au pied des arbres dans les hautes montagnes de la Chine à plus de 4000 m d'altitude dans le plateau Tibétain ou plateau de l'Himalaya, Tibet, Népal et provinces chinoises près du Sichuan, du Gansu, du Hubei le Japon, le Bhoutan, Corée, Vietnam et Thaïlande (Kinjo et Zang, 2001). La période normale de sa récolte se situe entre le mois d'Avril et Août.

### **I.3. Analyse phylogénétique du genre Cordyceps**

Il semble qu'il y a un niveau important de variations génétiques dans les espèces de sinensis (Chen et Hseu, 1999). Ces niveaux de variation représentent un défi significatif pour la classification du CS.

Les espèces de Cordyceps sont des parasites des insectes ou des mycètes, montrant souvent un niveau important de spécificité. Selon les analyses phylogénétiques, Cordyceps ne représente pas une lignée évolutive simple ; au lieu de cela, Cordyceps semble représenter plusieurs lignées dans le Clavicipitaceae (Artjariyasripong et al., 2001). De même, les espèces de Cordyceps ne représentent pas un groupe monophylétique (Nikoh et al ,2000).

Ainsi le genre de *Cordyceps* est un Phylum Ascomycota classé dans le Clavicipitaceae, c'est un groupe monophylétique dérivé de l'ordre des Hypocreales (Artjariyasripong et al., 2001).

cette espèce est classée comme suit :

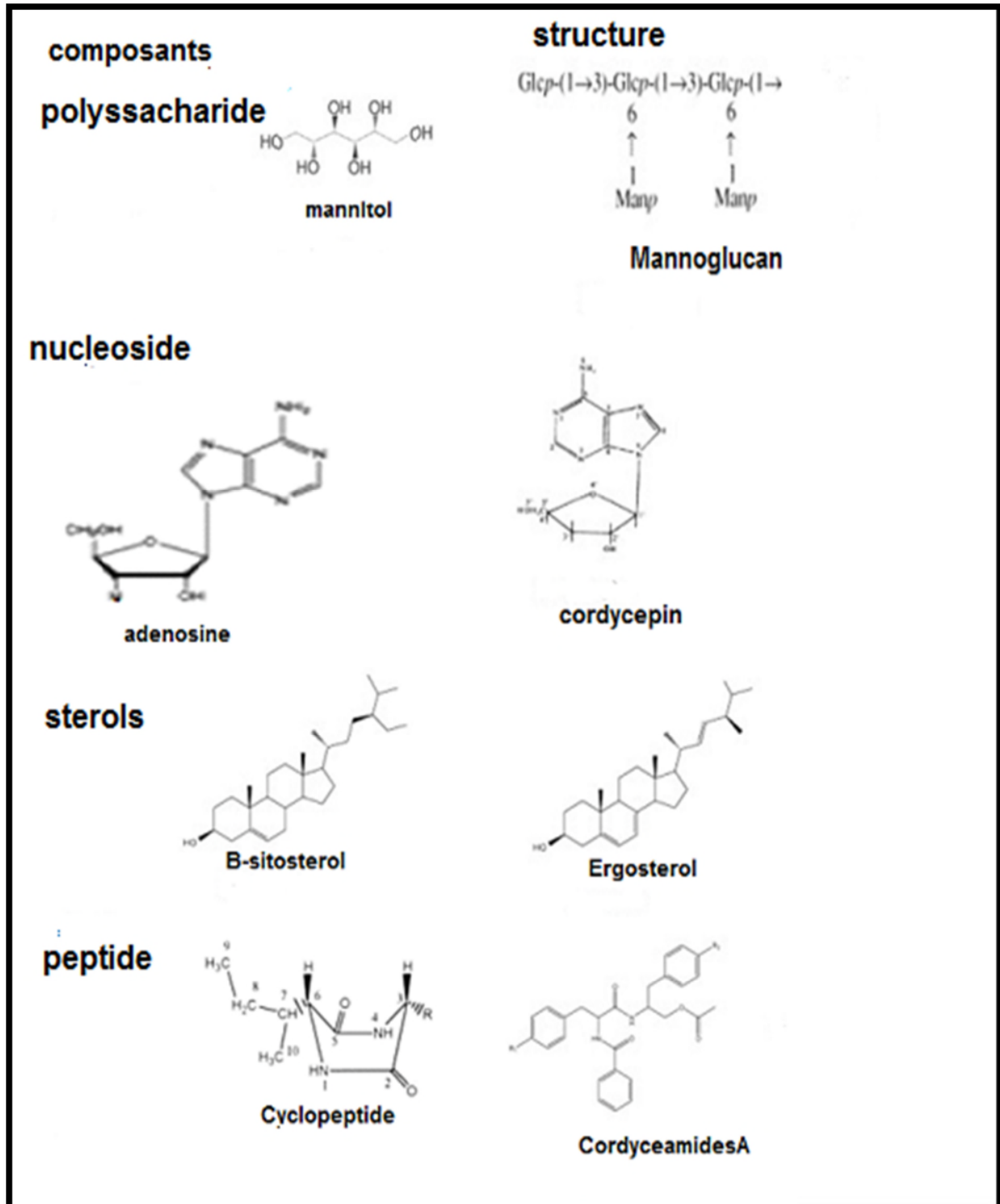
Royaume	Champignons
Phylum	<b>Champignon</b>
Classe	<b>Ascomycètes</b>
Ordre	<b>Hypocreales</b>
Famille	<b>Clavicipataceae</b>
Genre	<b>Cordyceps</b>
Espèce	<b><i>Cordycaps sinensis</i></b>



#### **I.4. Principes bioactifs et leurs structures**

Le CS semble à être une source riche en constituants chimiques biologiquement actifs. Parmi ces substances actives, les ribonucléosides, le mannitol, des stérols, des acides organiques, des polysaccharides, des protéines, des polyamines, des dipeptides, des acides aminés, des vitamines (Vit E, K, et vitamines hydrosolubles B1, B2, et B12) et une série d'oligoéléments (K, Na, Ca, Fe, Cu, Zn...etc) (**Zhu et al., 1998a**). Certains de ces constituants sont discutés ci-dessous et leurs effets sont décrits dans la (**figure 3**).

Figure 3 : Les constituants chimiques de *Cordyceps sinensis* et leurs structures. (Zhu et al., 1998a).



**Tableau I : Les diverses composés et leurs activités biologiques rapporté dans le CS.**

Adapté de (Smith, Rowan, et *al.*, 2000).

<b>Constituants</b>	<b>Fonctions</b>
<b>Polysaccharides</b>	Activité antioxydant
<b>Mannoglucan</b>	Activité cytotoxique
<b>Exo-polysaccharides</b>	Effets immun modulateurs et anti tumoraux
<b>Heteropolysaccharides</b>	Hyper cholestérol
<b>Nucléosides</b>	Immunomodulateurs et cardioprotection
<b>Adénosine</b>	
<b>Cordycepin</b>	Anticancéreux
<b>Stérols</b>	Anticancéreux
<b>Ergostérol</b>	
<b>β-Sitosterol</b>	Anticancéreux
<b>Protéines</b>	
<b>Cordymin (peptide)</b>	Anti-inflammatoires
<b>CordycedipeptideA et Cordyceamides B</b>	Activités cytotoxiques

### **I.4.1. Polysaccharides**

Les polysaccharides sont supposés puissent d'être des contributeurs majeurs à la plupart des activités biologiques du CS. Des études révèlent que la culture de CS (milieu liquide ) permet d'obtenir une dizaine de monosaccharides ( rhamnose , ribose , arabinose , xylose , mannose , glucose, galactose , le mannitol , le fructose et le sorbose ) ( **Guan , Yang , et Li , 2010**).

L'un des copposés de CS qui est le Mannitol a révélé une activité antioxydante (**Dong et Yao, 2007**).

### **I.4.2. Les nucléosides**

Les nucléosides sont considérés comme l'un des composants actifs clés du CS (**Li et al., 2001b**). Il semble que le contenu en nucléoside diffère entre CS naturel et le CS issu d'une culture (**Li et al., 2001c**). C'est pour cette raison que l'adénosines et la cordycépine (3'- désoxyadénosine) sont utilisées comme marqueur de qualité pour le CS.

Plusieurs composé ont été également rapportés dans le CS tels que l'urédinée désoxyuridine, l'adénosine, 2' -3'-didesoxyadenosine, hydroxyethyladenosine, triphosphatcordycepine guanidine, désoxyguanidine. L'adénosine et la cordycépine sont des composants actifs qui présentent plusieurs actions pharmacologiques telles que immun modulateur et antioxydant etc. (**Li et al., 2001c**).

### **I.4.3. Les stérols**

Ils sont mis en évidence par HPLC (**Li, et al., 2004**), Le principal stérol présent dans le CS est l'Ergostérol, ce dernier est présent sous deux formes, l'ergostérol libre et estérifié, ces deux formes ont des actions physiologiques différentes (**Yuan, et al., 2007**) notamment l'activité anti-tumorale réalisé par l'ergostérol libre (**Li, et al., 2009**). D'autres phyto-stérols tels que le cholestérol, le campestérol, la  $\beta$ -sitostérol et l'ergostérol semblent jouer un rôle important dans le traitement de plusieurs maladies tels que le côlon, prostate et le cancer du sein.

#### **I.4.4. Les peptides et les protéines**

En plus des composés précédemment cités et largement étudiés, CS contient également des protéines, des peptides, des polyamines, l'ensemble des acides aminés essentiels et même certaines dipeptides cycliques rares. Certains de ces dipeptides cycliques comme cyclo (Leu- Pro) et cyclo (Phe- Pro) montrent des effets antimicrobiens et des propriétés mutagènes contre la croissance des entérocoques résistants (ERV) et des levures pathogènes (**Rhee, 2004**). Pour les peptides, on retrouve par exemple la Cordymine, qui présente des activités anti-inflammatoires et antalgiques (**Qian, et al., 2012**).

Une activité d'hypotensive et une vasorelaxation ont été fournis par des constituants protéiques du CS (**Chiou, et al., 2000**).

#### **I.5. Méthodes de préparation de CS pour l'alimentation**

Il existe deux méthodes majeures pour la préparation de *Cordyceps sinensis* :

##### **I.5.1. Milieu liquide**

La méthode la plus favorisée pour la culture en Chine est la fermentation liquide, les spores de *Cordyceps sinensis* sont introduites dans un réservoir nutritif stérilisé qui contient le mélange nutritionnel pour assurer la croissance rapide du mycélium. Après croissance en milieu liquide, le mycélium est récolté par égouttage hors du bouillon pour séchage du liquide, après il peut être utilisé tel quel ou être traitées ultérieurement et ce liquide la qui sera aussi utilisé dans la médecine (**Dong et Yao, 2005**).

L'un des avantages de cette méthode est la production efficace de composés actifs et la facilité avec laquelle les conditions peuvent être manipulées et optimisés avec une grande production de mycélium comme démontré pour les divers champignons. Toutefois il a été rapporté que CS se développe mal à une température supérieure à 21 ° C (**Dong et Yao, 2010**).

### **I.5.2. Milieu solide**

La méthode de Culture en milieu solide est la méthode la plus adoptée par de nombreux fabricants au Japon et aux États-Unis .elle utilise des céréales ou des grains (riz, blé, seigle...etc) a fin d'augmenté le volume et la quantité de mycélium dans un bocal ou un sac, ce procédé est connu pour être facilement effectué avec de faibles coûts mais cela à généralement un inconvénient la teneur élevée en substrat dans le produit final. (Clever et *al.*, 2011).

## **II. Les différentes activités et effets des extraits de *Cordyceps sinensis***

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que le CS possède diverses activités biologiques. Le CS en sa forme normale et les produits mycéliens fermentés présentent un large spectre d'action pharmacologiques au niveau du système rénal, immunologique, hépatique, nerveux et cardio-vasculaire et mais aussi une activité anticancéreuse (**Zhu et al. 1998b**). Cette dernière activité semble être principalement issue est des polysaccharides, nucléosides et ses dérivés, et à la cyclosporine.

### **II.1 Activité antioxydante**

Le CS a attiré beaucoup d'intérêts de recherche notamment pour son activité antioxydante. Les divers extraits du CS sont efficaces contre les effets nocifs des radicaux hydroxyles (, **Zhang, Chen, & Yin, 2004**), et les radicaux d'anion superoxyde (**Zhang, et al., 2003**).

(**Dong, et al., 2002**) ont rapportés que les extraits des mycéliums obtenus à partir du stroma du CS ont montrés des actions antioxydantes semblables à la peroxydation de lipide sous l'action de la xanthine oxydase (**Li et al., 2002**).

L'un des modes d'actions de ces extraits explique l'oxydation d'un extrait issu d'une extraction a eau chaude du CS naturel et de culture a été réalisée sur six échantillons *in vitro*, elle a démontré un effet d'inhibition de la peroxydation linoléique, diminuant ainsi les effets nocifs des anions super oxyde des radicaux hydroxyles comme BHT, de DPPH, modérant la réduction et la chélation d'ion ferreux (**Dong et Yao, 2007**)

### **II.2. Activité anticancéreuse**

Les champignons médicinaux sont des éléments prometteurs pour le traitement du cancer, le Cordyceps a été effectivement employé comme herbe anti tumorale dans la médecine chinoise (**Ji, 1999**). Plusieurs études ont montrées des activités anti tumorales de CS naturel et cultivé (**Yamaguchi et al., 1990**) Les extraits de CS contiennent les composés polaires qui contribuent aux effets anticancéreux.

Des études *in vivo*, montrent un effet de la cordycépine sur la croissance tumorale, notamment hépatique, mélanocytaire, pulmonaire ainsi que leucémique. Cet effet semble être lié à l'action de la cordycépine sur les récepteurs stimulant l'adénosine A3, mais aussi à l'activation de glycogène Synthase Kinase-3 $\beta$  et suppression de Cycline D1. (**Yoshikawa et al., 2008**).

Des essais cliniques ont été menés notamment en Chine et au Japon. L'ensemble de ces essais montre une utilisation d'extrait de CS en concomitance avec de la chimiothérapie et radiothérapie. Ces différents essais ont portés principalement sur des tumeurs pulmonaires et les résultats obtenus montrent qu'environ 50% des patients enregistrent une réduction de la taille de la tumeur. Toutefois, il semble que les effets anticancéreux soient non pas liés aux propriétés intrinsèques d'extraits de CS comme c'est observé dans les tests *in vivo*-, mais à un effet immuno-stimulant, ce qui améliore l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle par l'équilibrage de ses effets secondaires (**Wang R, et al., 2001**).

Les stéroïdes dans l'extrait de méthanol et d'acétate éthylique de mycélium du CS ont montré un effet apoptotique efficace sur la cellule pro-myélocytique de la leucémie HL-60, causant la fragmentation de l'ADN qui a une caractéristique des cellules apoptotique (**Matsuda et al., 2009**). La cordycépine dans l'extrait de CS a induit l'apoptose de la cellule de tumeur chez des souris par l'activation de caspase 9 et 3 et la voie 7. Le traitement au cordycépine a abouti à l'arrondissement de la cellule, bourgeonnement de la membrane plasmique et la fragmentation d'ADN et à l'arrêt de la synthèse des phases pré-mitose. L'étude à indiquer le mécanisme de l'apoptose et l'effet anticancéreux obtenu par médiation du cordycépine (**Jen et al., 2011**) dans la figure 3 une étude semblable à indiquer l'apoptose des cellules HL-60 par l'extrait de mycéliums de CS (**Zhang et al., 2004**) et les propriétés anti-apoptotique du CS (**Buenz, et al., 2004**).



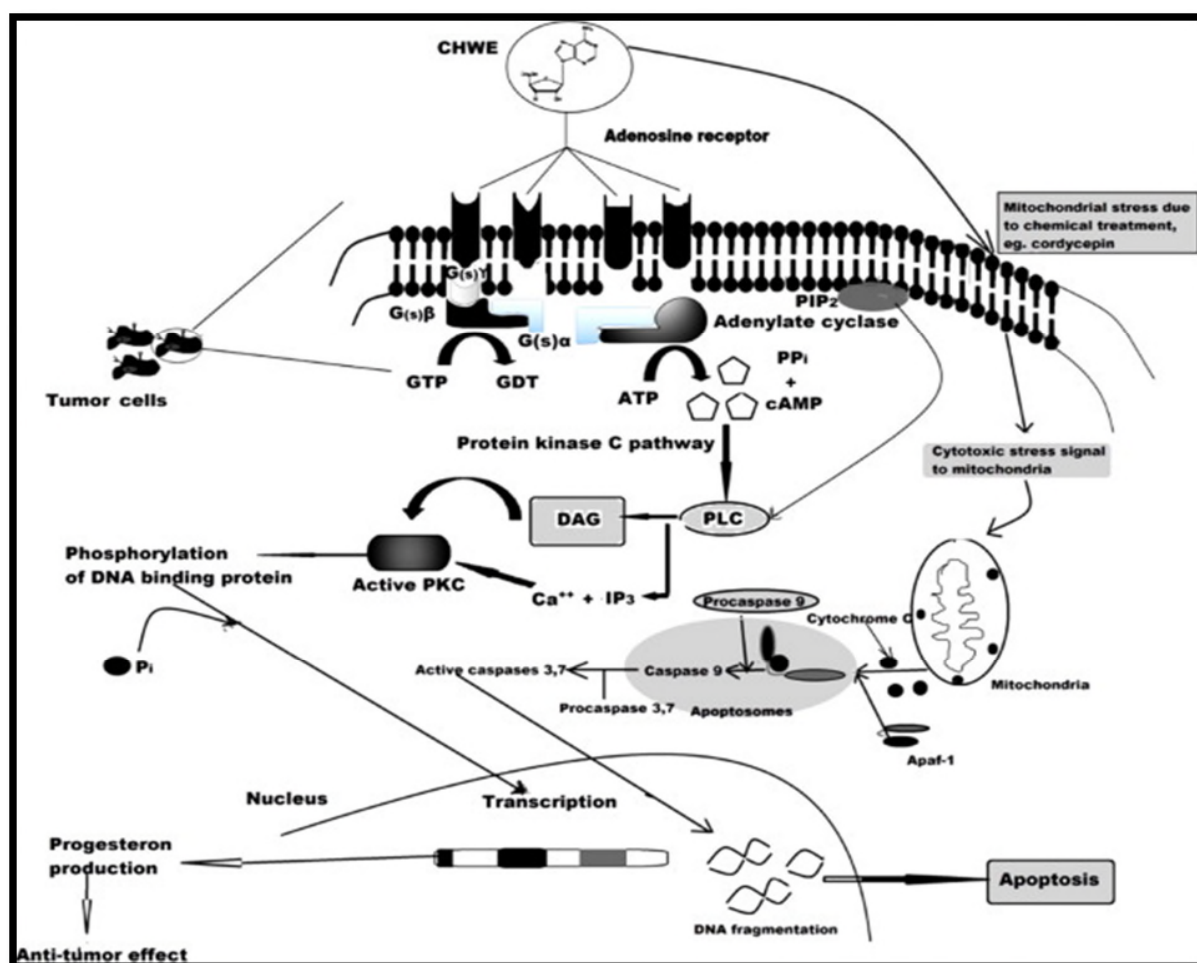


Figure 4 : l'effet de *Cordyceps sinensis* sur la cellule cancéreuse (Buenz, et al., 2004).

### II.3. Effet sur la fatigue

Les habitants des hautes montagnes du Tibet et du Népal consommant *Cordyceps*, affirment que cela leur donne de l'énergie et compense les symptômes du mal d'altitude. La raison de l'augmentation proposée alligüé d'énergie est une augmentation de l'ATP cellulaire, De même, l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène a été posée comme l'agent principal dans la lutte contre les effets de l'altitude. Dans une étude clinique contrôlée contre placebo chez des patients âgés souffrant de fatigue chronique, les résultats indiquent que la plupart des sujets traités par *C. sinensis* rapporté une amélioration clinique

significative dans les domaines de la fatigue, alors aucune amélioration n'a été signalé dans le groupe placebo. (Mizuno, T. 1999) et (Bao, Z et al., 1994).

Des études *in vivo* sont réalisées sur deux groupes de souris. Un groupe reçoit une alimentation standard, tandis que le deuxième groupe reçoit le même régime avec l'addition du composé d'essai qui est le *Cordyceps*, Après une période de temps ils ont observés une augmentation du débit d'énergie au parallèle une diminution de la fatigue en comparaison avec le groupe1 (MizunoT ,1999).

### II.4. Affections rénales

L'insuffisance rénale chronique est une maladie grave, touchant souvent les personnes âgées. Dans une étude réalisée chez 51 patients souffrant d'insuffisance rénale chronique, il a été constaté que l'administration de *Cordyceps sinensis* amélioré de manière significative à la fois la fonction du rein et dans l'ensemble la fonction immunitaire des patients traités, comparativement au groupe témoin non traité. (Guan Y,et al., 1992).

Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique ou de la fonction rénale souffrent souvent d'hypertension, protéinurie, et l'anémie. Dans une étude avec de tels patients, il a été constaté que, après un mois de *Cordycaps sinensis*, une réduction de 15% de la pression artérielle a été observée. Protéines urinaires a également été réduite. En outre, l'augmentation de la superoxyde dismutase (SOD) été observés. L'augmentation de la SOD, couplée à une diminution observée dans le sérum de lipoperoxydes, indique une augmentation de la capacité de piégeage des radicaux libres d'oxygène, ce qui entraîne une réduction des lésions cellulaires oxydatives (Jiang J.C., Gao Y.F., 1995).

### II.5. Effet hypoglycémiant

Un autre domaine d'intérêt particulier est l'effet de *Cordyceps sinensis* sur le système de métabolisme du glucose dans le sang. *Cordyceps* a été testé sur les animaux et les humains. Dans un essai randomisé, 95% des patients traités avec *Cordyceps sinensis* a vu une amélioration de leurs profils de glucose dans le sang, tandis que dans le groupe témoin, seul 54% des sujets ont une amélioration avec le traitement par d'autres méthodes. (Guo Q.C., Zhang C., 1995).

Dans les études *in vivo*, les polysaccharides isolés semblent améliorer le métabolisme du glucose sanguin et augmenter la sensibilité à l'insuline pour abaisser le taux de glucose dans le sang chez les animaux génétiquement diabétiques (Kihō T, et al., 2000), et à influencer positivement sur le métabolisme du sucre dans le sang chez les animaux atteints de diabète induit chimiquement. (Hsu T.H., et al., 2002) comme c'est le cas chez les animaux normaux, (Zhao C.S., et al. 2002) Le fil conducteur de toutes ces épreuves est l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et les enzymes hépatiques, la glucokinase et hexokinase.

### II.6. Maladies du foie

Un autre domaine d'intérêt de recherche considérable est la relation entre *Cordyceps Sinensis* et la fonction hépatique. De nombreuses études ont démontré une amélioration de la fonction hépatique. Par exemple, dans l'Orient aujourd'hui, *Cordyceps* est couramment utilisé comme adjuvant dans le traitement des hépatites chroniques B et C. Dans une étude, l'extrait de *Cordyceps* a été utilisé en combinaison avec plusieurs autres extraits de champignons médicinaux comme traitement d'appoint à la lamivudine pour le traitement de l'hépatite B. La lamivudine est un médicament antiviral couramment utilisé dans le traitement de l'hépatite. Dans cette étude, le groupe recevant *Cordyceps sinensis* avec d'autres extraits de champignons médicinaux avait de bien meilleurs résultats dans un court laps de temps que le groupe de contrôle qui n'ont reçu que la lamivudine (Wang R, et al., 2002).

Dans une autre étude sur des patients qui ont été diagnostiqués avec une cirrhose post hépatique, (Liu C, et al., 1986) après trois mois de consommation de *Cordyceps*, chaque patient a montré une amélioration dans les tests de la fonction hépatique.

## **II.7. Toxicité et effets secondaires**

Bien que le Cordyceps soit identifié comme supplément diététique par la FDA (**Wang Z ,2002**) le *Cordyceps sinensis* est encore considéré comme une substance inconnue. Car peu d'informations sont disponibles concernant les effets secondaires et la toxicité.

Quelque rares cas de sécheresse de la bouche, de nausées, ou de diarrhée ont été rapportés. Les rapports de la toxicité envers l'humain n'ont pas été prouvés. Dans les essais sur les animaux, aucun effet léthal n'a été signalé chez des souris ayant reçu des injections intra péritonéales d'un extrait de Cordyceps après 7 jours ni à 3 mois. (**Holliday et al., 2005**).

### **III. Méthodes de dosages des protéines**

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes : sensibilité, interférents, réponse plus ou moins différente selon la composition en acides aminés, ce sont généralement les méthodes chromatographiques, électrophorétique et colorimétriques. Qui sont les plus utilisées d'une manière couplé pour compléter les résultats obtenus par chacune de ses méthodes afin d'optimiser le résultat final par l'identification des paramètres caractérisant cette protéine **(Forbes, 2010)**.

#### **III.1. Méthodes colorimétriques**

La spectrophotocolorimétrie est une méthode d'analyse quantitative, elle consiste à mesurer l'absorbance de la lumière visible par un soluté coloré.

##### **IV.1.1. Méthode de Bradford**

La méthode de Bradford développée en 1976 est un dosage colorimétrique basé sur le changement de l'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie après liaison avec les protéines. C'est une méthode quantitative qui permet de doser des protéines même à l'état des traces (faible concentration), elle est relative et nécessite de tracer une courbe d'étalonnage **(Bradford, 1976)**.

##### **III.1.2. Principe**

Préparation des solutions : le dosage des protéines par la méthode de Bradford

Nécessite l'utilisation de trois solutions différentes :

- **La solution 1** : correspond à la solution dont on veut déterminer la concentration des protéines ;
- **La solution 2** : est une solution d'une concentration connue d'une protéine considérée comme une référence, elle est utilisée pour préparer la gamme étalon :

série de tubes contenant le même volume de cette solution avec des concentrations différentes et successives ;

- **La solution 3** : est une solution d'un réactif qui développe une coloration en réagissant avec les protéines. Le même volume de cette solution est rajouté en même moment et dans les mêmes conditions dans tous les tubes de la gamme étalon et aussi dans les tubes contenant l'échantillon à doser (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

La mesure de l'absorbance de la gamme étalon, puis traçage une droite : absorbance en fonction de la concentration et on obtient l'équation :  $y = \alpha x + \beta$  avec :

y : absorbance

x : concentration (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

La détermination de la concentration de l'échantillon consiste à mesurer son absorbance et à calculer ensuite sa concentration en utilisant l'équation obtenue lors de l'étalonnage (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

La méthode de Bradford est une méthode simple, rapide qui donne des résultats avec une grande sensibilité, en plus, elle nécessite un seul réactif et elle n'est pas coûteuse (**Lott et al., 1983**).

### III.1.3. Solutions utilisées

#### ➤ **La solution du bleu de coomassie**

Le bleu de coomassie G 250 est le réactif de la méthode de Bradford, c'est un colorant non spécifique, il se lie avec toutes les protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 3 KDa (**spitz, 2006**) ; à l'état libre il se caractérise par une forme cationique, une couleur entre le rouge et le marron et le spectre d'absorbance maximal est entre 465 et 470 nm ; le colorant une fois lié aux protéines, change sa forme cationique en une forme anionique, sa couleur devient bleu et son absorbance est mesurée à 595 nm. La figure 5 ci-dessous représente la structure d'une molécule de bleu de coomassie G 250 (**Owusu-Apenten, 2002**).

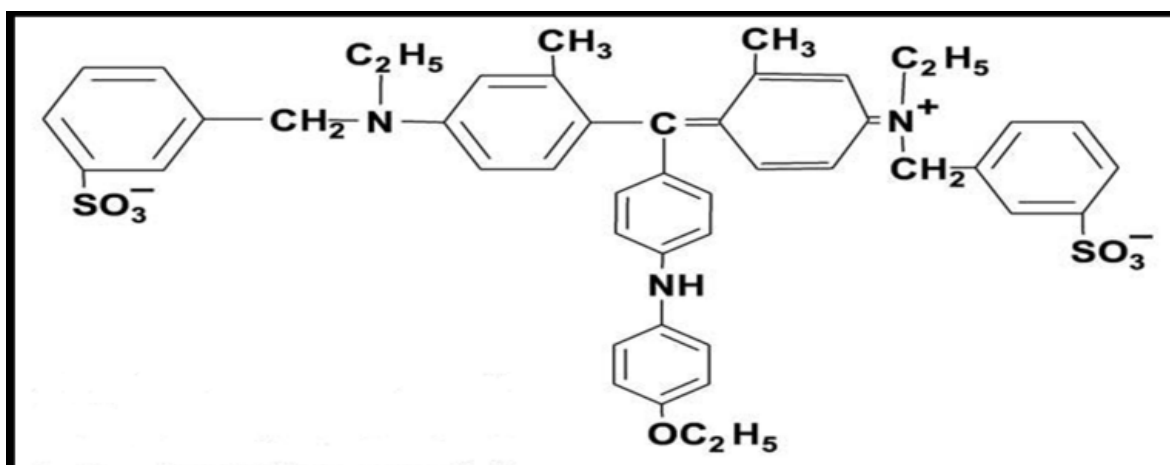


Figure 5 : Structure d'une molécule du bleu de coomassie (Owusu- Apenten,2002).

Les molécules de ce réactif se lient fortement avec les résidus chargés positivement (Arginine, Lysine et Histidine) de sérum albumine bovine (BSA), par des liaisons ioniques entre les groupements chargés positivement des acides aminés basiques et les groupements sulfonate chargés négativement de bleu de coomassie.

Le bleu de coomassie se lie aussi avec les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine et Tryptophane) de la BSA par des liaisons hydrophobes ou par les forces de Van Der Waals (Van Hold et al., 2006).

### ➤ La solution BSA

L'albumine est une protéine du sang synthétisée par le foie (Camus, 1983), son poids moléculaire est de 66 kDa (Ewing et al., 1997), est une protéine de transport de nombreuses substances endogènes et exogènes dans le sang tel que les hormones et les médicaments (Naik et al., 2010).

La BSA est une molécule en forme de coeur (Jachimska et Pajor, 2012) composée de trois domaines et chacun est divisé en deux sous-domaines (Agarwal et Salahuddin, 1987).

En fonction du PH de la solution, la BSA peut adopter différentes conformations, les fonctions de ces transitions et leurs significations physiologiques sont au stade d'étude (Jachimska et Pajor, 2012).

## **III.2. Méthodes non colorimétriques**

### **III.2.1 Définition de l'électrophorèse**

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques (Agnèse, 1994). Le terme «électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec *phoros*, qui signifie « porter d'un côté à l'autre » (Platenik, 2009).

L'électrophorèse sur gel fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche de gel. Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux.

Diverses macromolécules biologiques importantes comme les protéines par exemple possèdent des groupes ionisables qui, à un pH donné, se transforment en espèces chargées électriquement sous forme tantôt de cations (+), tantôt d'anions (-). En fonction de la nature de la charge du réseau, les particules chargées migreront soit vers la cathode, soit vers l'anode.



### **III.2.2. Définition de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS**

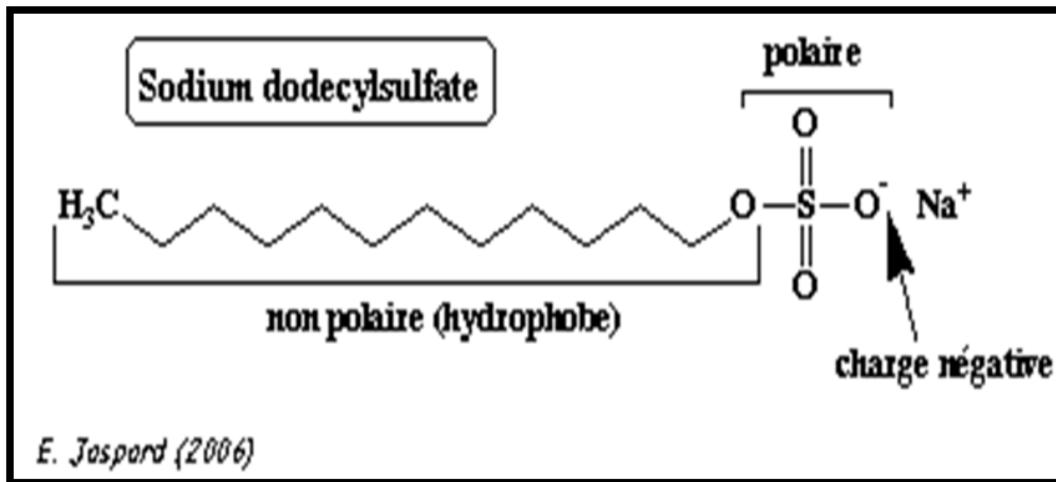
L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode analytique la plus souple dans l'analyse de protéine. Elle est moins coûteuse et reproductible pour comparer et caractériser des protéines même dans les mélanges très complexes. Elle exploite le fait que les protéines dans les solutés sont des ions avec une charge positive ou négative selon le pH de l'environnement. Pendant la séparation électrophorétique des ions sont conduits par un réseau constitué par le gel hydrophile du polyacrylamide. La vitesse de migration dépend de la charge nette de la molécule, de sa taille, de la taille des mâches de gel, des interactions possibles entre le polyacrylamide et les macromolécules, et de la force du champ électrique (**Laemmli, U. 1970**).

#### **III.2.2.1. Principe**

L'électrophorèse PAGE, repose comme toute technique électrophorétique, sur la séparation de molécules chargées dans un champ électrique. Une cuve à électrophorèse est reliée à deux bornes une cathode (-) et une anode (+) alimentées par un générateur électrique : les molécules que l'on intercale dans ce champ migreront, selon leur charge, vers le pôle complémentaire.

La particularité de la SDS-PAGE est de soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant. Les protéines sont soumises à l'action de deux composés :

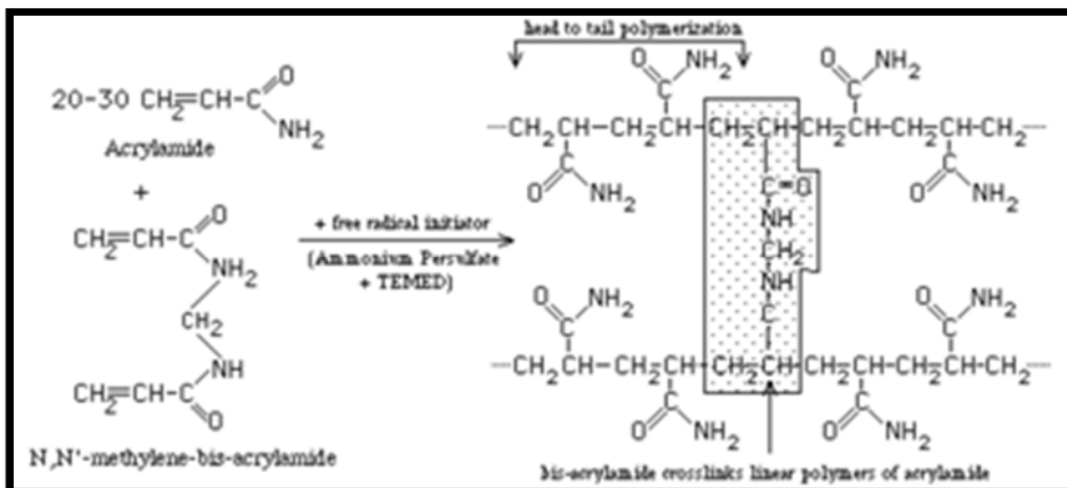
- **le  $\beta$  mercaptoéthanol** : composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociés.
- **le SDS (sodium dodécyl sulfate)** : c'est un composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative. Ainsi les protéines recouvertes par le SDS auront donc toute une charge négative. Influencées ainsi par le SDS, elles migreront donc toutes vers l'anode (+) : la charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu et donc seule leur masse moléculaire influencera leur migration (**Laemmli, U. K. 1970**).



**Figure 6 :** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèses ou SDS-PAGE (Laemmli, U. K. 1970).

Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. C'est un gel réticulé, obtenu par polymérisation :

- d'acrylamide qui forme des chaînes
- bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide



**Figure 7 :** Structure de l'acrylamide et de bis-acrylamide (Laemmli, U. K. 1970).

La réaction de polymérisation est:

- initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium.

- catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane - toxique) et sa formule chimique est (C<sub>45</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>S<sub>2</sub>).

### **III.3. La spectroscopie de masse**

Le spectromètre de masse, initialement conçu par la britannique Joseph John Thomson, permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse monoisotonique. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Cette technique d'analyse chimique a pris un essor considérable, car elle se trouve utilisée dans de nombreux domaines de recherche (Ifa *et al.*, 2008).

#### **III.3.1. La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)**

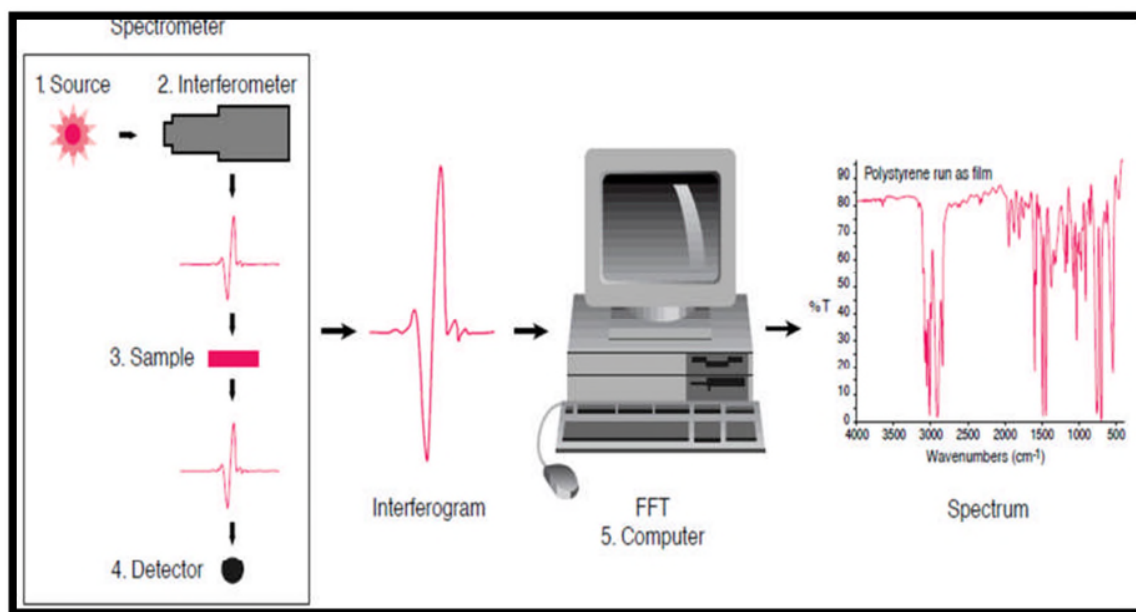
Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel, ces radiations sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Le domaine IR s'étend de 0.7 µm à 50 µm. Il est arbitrairement divisé en trois catégories, le proche IR (0.7 à 2.5 µm), le moyen IR (2.5 à 25 µm) et le lointain IR (25 à 50 µm) (Essendoubi, 2007).

#### **III.3.2. Principe**

Le spectre IR-TF d'une molécule donnée, est composé d'un ensemble des bandes d'absorption de ces liaisons atomiques ; le spectre d'un échantillon biologique complexe est la superposition des spectres de toutes ces molécules (aspect qualitatif) et en fonction de leurs concentration (aspect quantitatif) (Petibois *et al.*, 2000).

Lors de la vibration de la molécule, l'espacement entre les charges et leurs répartitions changent et elles interagissent avec le champ électrique du rayonnement infrarouge (Essendoubi, 2007).

Comme il est montré dans la (**figure 7**) (**Road, 2001**) les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre IR-TF, il est constitué d'une source lumineuse, un interféromètre, un porte échantillon, un détecteur et un convertisseur analogique numérique correspondant à la transformée de Fourier ; l'interféromètre est constitué d'un miroir fixe M1, un miroir mobile M2 et une lame séparatrice S (**Manca, 1999**).

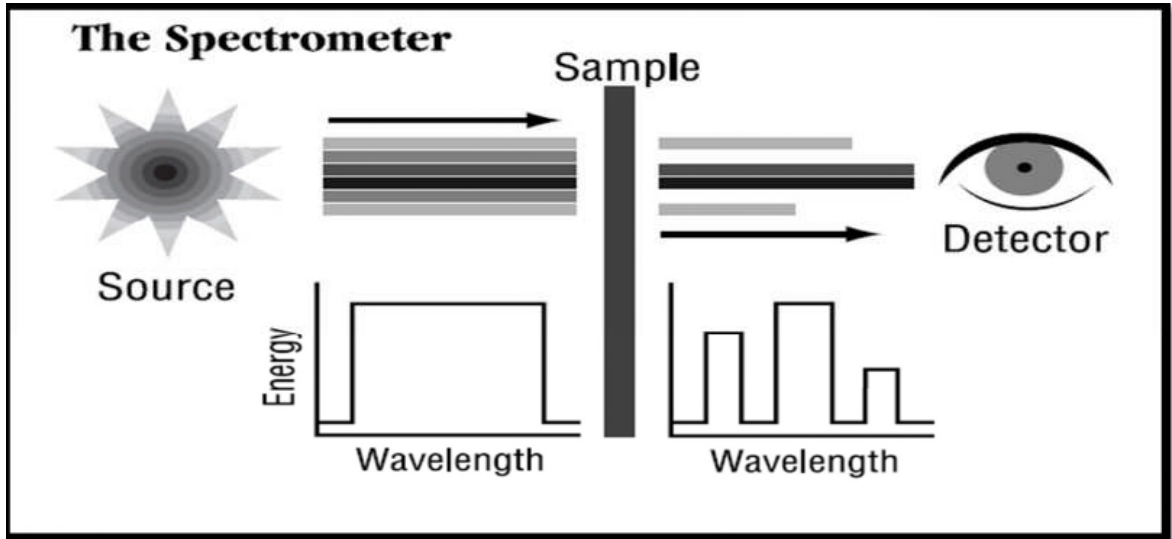


**Figure 8** : Principe de la spectroscopie IR-TF (**Road, 2001**).

Les rayons IR passent par l'interféromètre et traverse l'échantillon, le détecteur recueille et amplifie l'interferogramme, l'interprétation de ce dernier nécessite son passage par un convertisseur correspondant à une méthode mathématique appelée la transformée de Fourier ensuite l'information spectrale est représentée sur ordinateur.

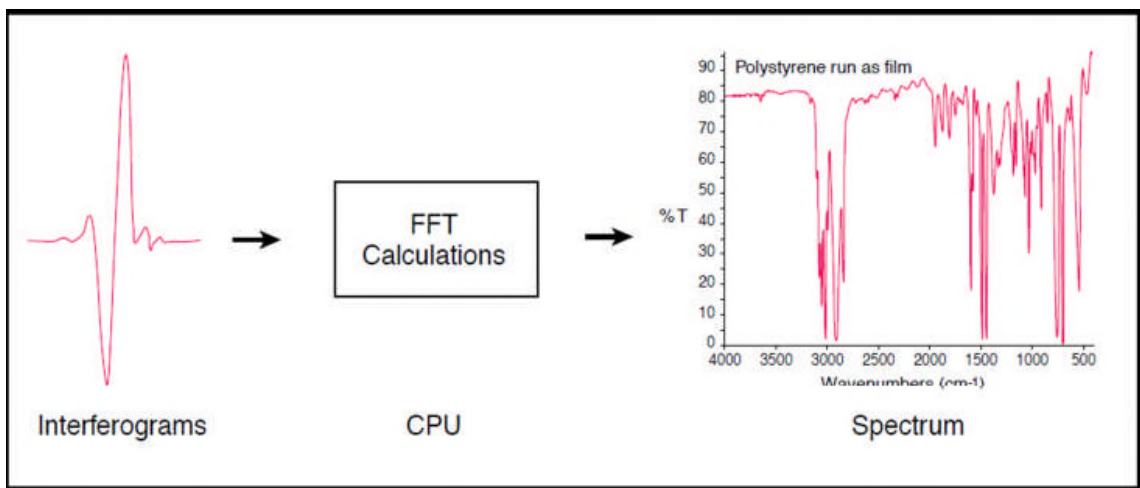
La moitié du faisceau lumineux est transmise vers le miroir M1 et l'autre moitié versale miroir M2, après réflexion sur les deux miroirs, les deux parties du faisceau lumineux se recombinaient au niveau de la séparatrice et passe par l'échantillon, certaines radiations sont absorbées par ce dernier et les autres le traverse; l'interférogramme qui correspond au signal obtenu de la distribution spectrale de la source lumineuse et l'absorbance de l'échantillon est recueilli et amplifié par le détecteur, le convertisseur (transformée de

Fourier) transforme le signal analogique (l'interférogramme) en un signal numérique manipulable par le système informatique (Road, 2001)



**Figure 9 :** Le devenir des radiations IR émises (Road, 2001).

Une partie des radiations IR émises est absorbée par l'échantillon et l'autre le traverse ; le détecteur recueille le signal d'absorption et d'émission sous forme d'un interférogramme.



**Figure 10 :** Conversion d'interférogramme en spectre (Road, 2001).

Le signal obtenu ne peut pas être interprété sous forme d'interférogramme, il est converti par la transformé de Fourier en un spectre.

### **III.3.3. Les avantage**

- La vitesse : la plupart des mesures par spectroscopie IR-TF sont faites en quelques secondes.
- La sensibilité : les détecteurs utilisés sont beaucoup plus sensibles, la sortie optique est beaucoup plus haute qui a comme conséquence des niveaux plus bas de bruit, cette sensibilité permet de détecter les plus petites molécules.
- La simplicité mécanique : le miroir mobile est la seule pièce sans interruption mobile dans l'instrument c'est pour cela que la panne mécanique a une possibilité très petite.
- L'instrument est intérieurement calibré (**Road, 2001**).

## I. Matériels biologiques

Le matériel utilisé est l'extrait de champignon *Cordyceps sinensis*



Figure 11 : Photographie des spores de *Cordyceps sinensis* utilisées pendant l'étude.

### I.1. Méthodes d'extraction

Avant toute extraction, le séchage de CS est effectué dans l'étuve durant 48h à 40°C.

#### ➤ Broyage

Avant l'extraction, le CS séchés est passé dans un broyeur mécanique de laboratoire, puis conserver dans les tubes à 4°C.

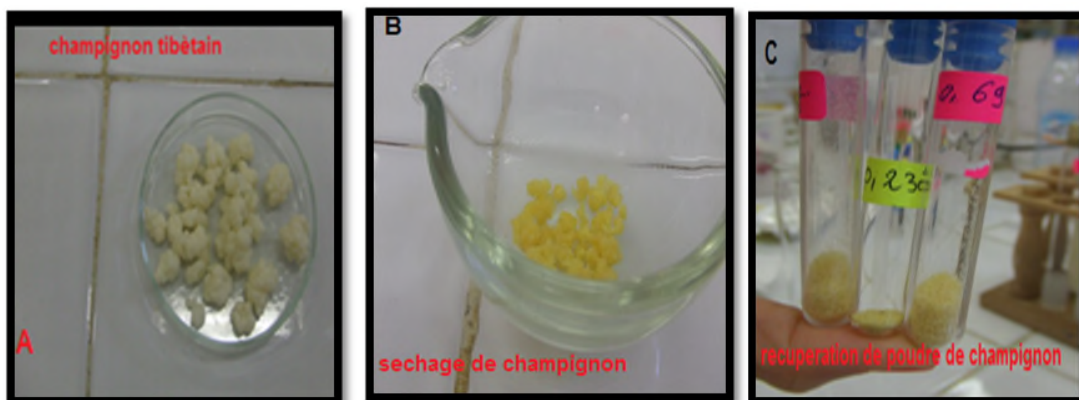


Figure 12 : Les étapes de préparation de poudre de *Cordyceps sinensis*.

### I.1.1. Extraction à l'eau chaude

Dans le but d'étudier l'extrait de *Cordyceps sinensis*, une quantité de 0,230g de la poudre broyée a été additionnée à 23 ml d'eau distillée puis l'échantillon est mis dans un bain marie à une température 95°C pendant 30 min, afin de dissoudre la poudre.

Une fois récupéré l'échantillon on a observé que la poudre n'est pas dissoute dans l'eau, ceci peut être expliqué par la présence de composés hydrophobes. Pour un autre solvant a été utilisé il s'agit du méthanol.

### I.1.2. Extraction au méthanol

Une quantité de 0,230g de la poudre de *Cordyceps sinensis* est ajoutée à 7ml de méthanol le tout est mis dans un bain marie à 95°C pendant 30 min, dans le but de dissoudre la poudre.

Une fois récupéré l'échantillon, on remarque une très faible dissolution de la poudre dans le méthanol et pour cela on a utilisé directement le lait fermenté avec le pour l'analyse.

## I.2. Dosage des protéines

### I.2.1. Préparation des solutions

- **La solution BSA** : préparation de 20ml de la solution BSA à concentration de 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, 1996).
- **La solution de bleu de coomassie** : les solutions de bleu de coomassie sont préparées selon les instructions de fabricant et sont représentées dans le tableau II la solution obtenue est mise sous agitation magnétique pendant 30 min, puis filtrée par papier Whatman (Sigma- Aldrich, 1996).

Tableau II : Composition du bleu de coomassie (Sigma- Aldrich, 1996).

Les réactifs	La quantité en %	La composition 1ml de la solution
Bleu de coomassie G250	0,045 %	0,045mg
Ethanol	4%	0.04ml
Acide phosphorique	10%	0.1ml



### I.3. La méthode de Bradford

#### I.3.1. La courbe d'étalonnage

La gamme étalon est composée de plusieurs tubes contenant une solution de BSA à concentrations différentes .

La mesure de l'absorbance à été réalisée après addition de la solution du bleu de Coomassie aux solutions de l'eau distillée-BSA précédemment préparées.

La mesure de l'absorbance de la gamme étalon est réalisée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 596 nm et cela après incubation pendant 30 min à l'obscurité

Suite aux résultats des absorbances nous avons tracé une courbe d'étalonnage représentée dans la (figure 13).

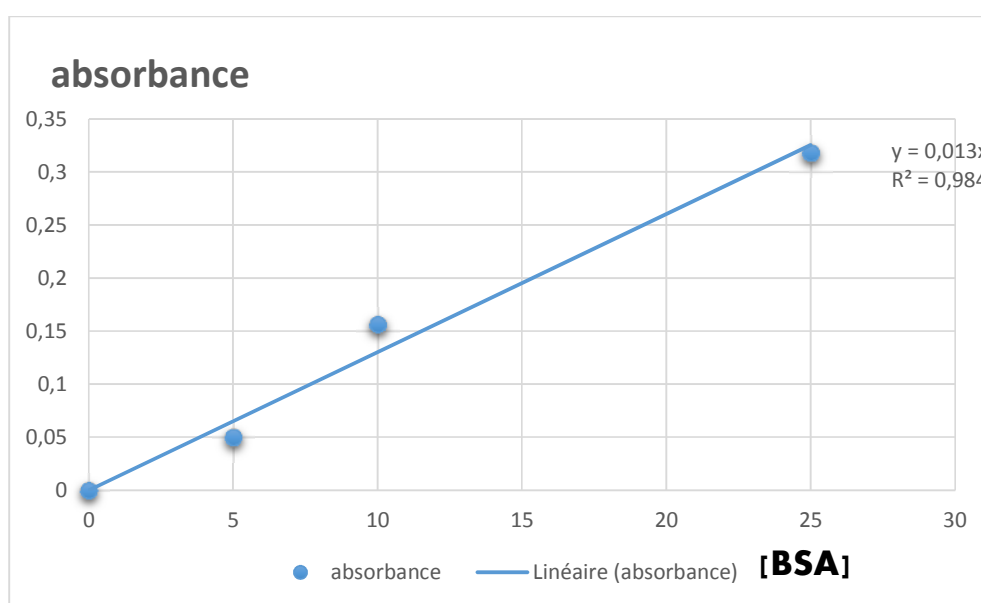


Figure13 : Résultats de la courbe d'étalonnage.

#### I.3.2. dosage des protéines des échantillons

Une dilution de 1/1000 a été réalisée pour chaque échantillon. De la nouvelle concentration un volume de 50  $\mu$ L de chaque échantillon est ajouté à 1450  $\mu$ L de réactif de Bradford. On laisse incuber le mélange pendant 30min à l'obscurité puis on mesure les densités optique à 596 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, les concentrations sont

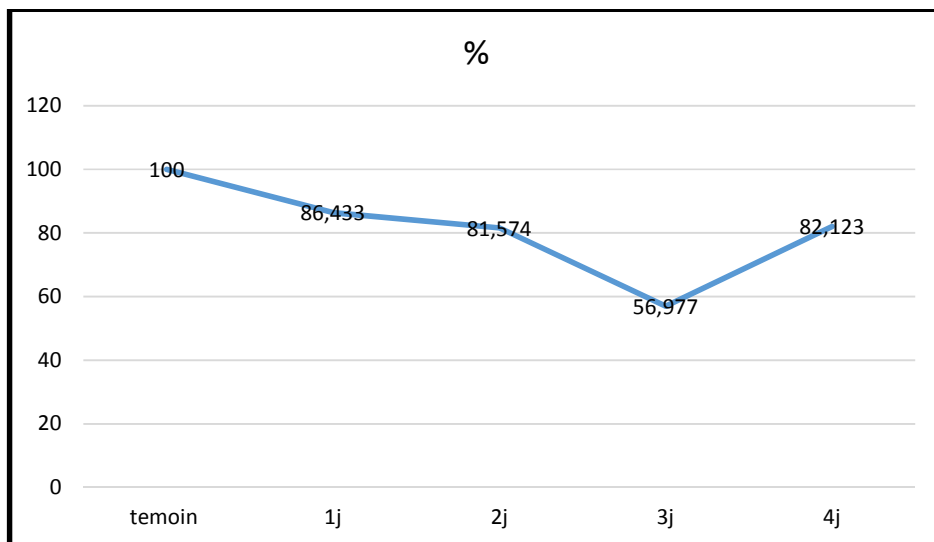
déterminées par référence à une gamme étalon à base de BSA préparée dans les mêmes conditions.

Nous avons considérés que la concentration du lait témoin c'est à dire le lait seul à j0 est le 100% et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau III : Tableau récapitulatif des résultats de la méthode de Bradford**

Nature	Duré d'incubation	Pourcentage %
Lait témoin	0 jour	100%
Lait + cham	1 jour	86,433%
Lait + cham	2 jours	81,574%
Lait + cham	3 jours	56,977%
Lait + cham	4 jours	82,123%

Suite à ces résultats nous avons tracé une courbe représentée comme suit :

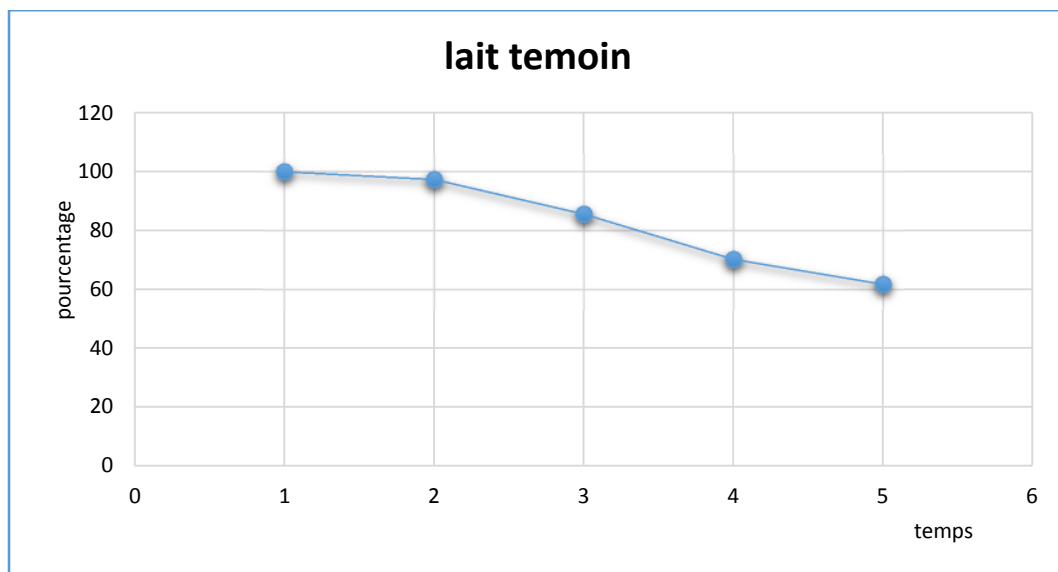


**Figure 14 :** Représentation graphique de la concentration protéique du lait témoin et des échantillons.

En comparant la courbe de changement de la concentration des échantillons en fonction du temps, nous avons réalisé celle du lait témoin en fonction du temps et dans les mêmes conditions (tableau IV , figure 15).

**Tableau IV : Pourcentage des concentrations du lait témoin**

Lait témoin	Pourcentage %
J0	100%
J1	97,397
J2	85,595
J3	70,268
J4	61,767



**Figure 15 :** Représentation graphique de la concentration protéique du lait témoin.

D'après la représentation graphique de la figure15, on remarque l'existence d'une différence entre le lait témoin utilisé et les échantillons testés. En effet, le pourcentage des concentrations de nos échantillons de lait fermenté avec ce champignon varient entre (56,977%- 86,433%).

En plus de ces observations on observe que lorsque le poids du *Cordyceps sinensis* augmente ; la concentration protéique des échantillons diminue. En effet pour une concentration de **(50,973 g/ml)** le poids de champignon a augmenté de **(6,92g)** à **(6,97 g)**.

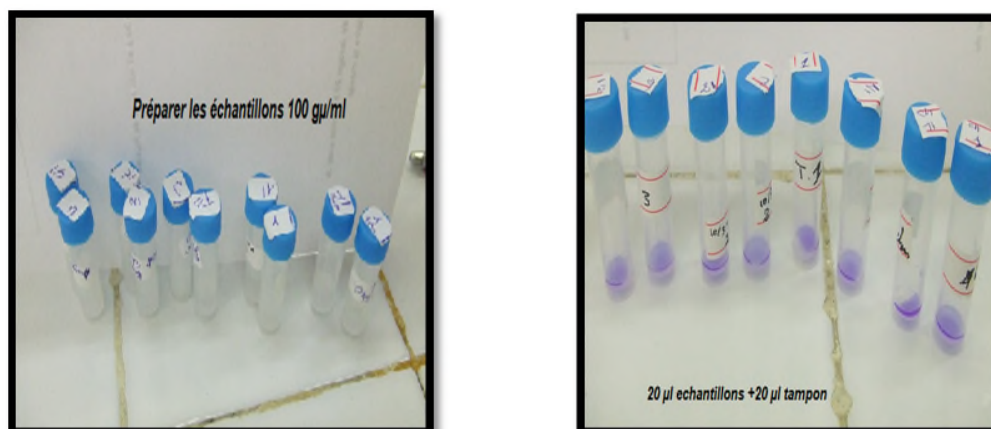
La comparaison des deux courbes de pourcentage des concentrations permet d'observer une baisse de la concentration protéique du lait témoin par rapport à celle des échantillons, en parallèle on observe une diminution de la concentration des échantillons jusqu'au j3 après on observe une augmentation légère de la concentration protéique. Toute fois la courbe de tendance est en baisse.

Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs facteurs : Tous d'abord, le facteur temps, les champignons peuvent métaboliser les protéines contenues initialement dans le lait à des fins diverses tel que leur croissance ; le volume utilisé de lait peut expliquer cette différence de valeurs, étant donné qu'avec la diminution de la quantité de lait, le taux de protéines diminue. Cette différence de concentration peut être expliquée aussi par la qualité du lait utilisé. Il est impossible à l'heure actuelle de comparer ces résultats avec ceux d'autres équipes, car aucune publication n'est apparue sur ce domaine.

## **II. Electrophorèse**

C'est un procédé biochimique qui permet le fractionnement des molécules biologiques comme protéines, acides nucléiques par le passage du courant électrique sur support poreux en fonction de leur poids moléculaire. **(Laemmli, U. K. 1970)**.

En premier lieu, dans un tube on mélange 20 µl de chaque échantillon à une concentration de 100 µg/ml avec 20 µl (V/V) de tampon de dénaturation, En second lieu, le contenu de chaque tube est placé dans un bain marie réglé à 95°C pendant 5 min.



**Figure16** : Préparations des échantillons.

## **II.1. Réalisation de l'électrophorèse**

Il s'agit d'une électrophorèse monodimensionnelle en présence du Sodium Dodécyl-Sulfate sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE) réalisée selon la méthode de **Laemmli (1970)** avec certaines modifications.

### **II.1.1. Préparation des gels**

Dans la méthode de séparation par SDS-PAGE nous devons préparer deux types de gels : Un gel de séparation et un gel de concentration.

Avant de préparer les gels on doit procéder au montage des plaques, après les avoir nettoyées à l'eau distillée. On les place l'une contre l'autre.



**Figure 17 :** Photographie montrant le montage des plaques d'une électrophorèse monodimensionnelle.

### **II.1.2. Le gel de séparation**

Le gel de séparation est un gel à 10%. Il est constitué d'acrylamide à 30%, de Bisacrylamide à 8%, de Tris HCL à pH=8.8, de SDS à 10% (p/v) et d'eau distillée. La réaction de polyacrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate (APS) à 10% (p/v) et le TEMED

Une fois tous les constituants mélangés les catalyseurs sont ajoutés en dernier lieu, il est coulé entre les plaques. Afin de ne pas créer des bulles jusqu'à un niveau délimité sur la plaque pour laisser la place au gel de concentration. Au bout de 10 min le gel prend sa forme, et on rajoute une fine couche d'isobutanol ou bien de l'eau distillée pour égaliser la surface du gel. Ce dernier est enlevé et rincé à l'eau distillée.

### **II.1.3. Le gel de concentration**

Le gel est préparé de la même façon que le gel de séparation avec une seule différence au niveau du Tris HCL qui a un pH de 6.8. Le gel est coulé sur le gel de séparation, les peignes sont posés bien centrés entre les plaques et sans faire de bulles. Le gel prend sa

forme après 5min, les peignes sont retirés soigneusement pour ne pas casser les puits. Enfin, on verse du tampon pour laver les puits puis on dépose les échantillons.

#### **II.1.4. Le tampon de migration**

La composition du tampon de migration est illustrée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V** : Composition chimique du tampon de migration

<b>Tris base</b>	<b>7,56g</b>
<b>Glycine</b>	36g
<b>SDS 10%</b>	40ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	250ml

## **II.2. La migration**

Après le dépôt des différents échantillons ; la cuve d'électrophorèse est remplie à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse. Ensuite, le bac supérieur situé entre les deux plaques est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées. Ensuite, ce dernier est placé dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon. Enfin, la cuve est fermée et est reliée à un générateur de 150 Volt qui va assurer le passage du courant électrique. La migration est menée à une intensité constante de 50 mA/gel.

### **II.2.1. Révélation des bandes de migration électrophoretique**

A la fin de la migration le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

### **II.3. Coloration**

Le gel est immergé 3h ou toute la nuit dans une solution de coloration composée de constituants cités dans le tableau suivant :

**Tableau VI** : composition de la solution de coloration.

<b>Constituants</b>	<b>Quantités en %</b>
<b>Bleu de coomassie R250</b>	<b>à 0.25% 0, 3g/ml</b>
<b>méthanol</b>	<b>45%</b>
<b>Acide acétique</b>	<b>10%</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>45%</b>

### **II.4. Décoloration**

Après l'étape de coloration le gel est immergé dans une solution dite de décoloration dans les constituants sont cités dans le tableau suivant :

Cette étape est répétée trois fois pour permettre une bonne révélation des bandes protéiques.

**Tableau VII** : Composition de la solution de décoloration

<b>Constituants</b>	<b>Quantités en %</b>
<b>Méthanol</b>	<b>40%</b>
<b>Acide acétique</b>	<b>10%</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>70%</b>



III.1. L'analyse électrophorétique des protéines

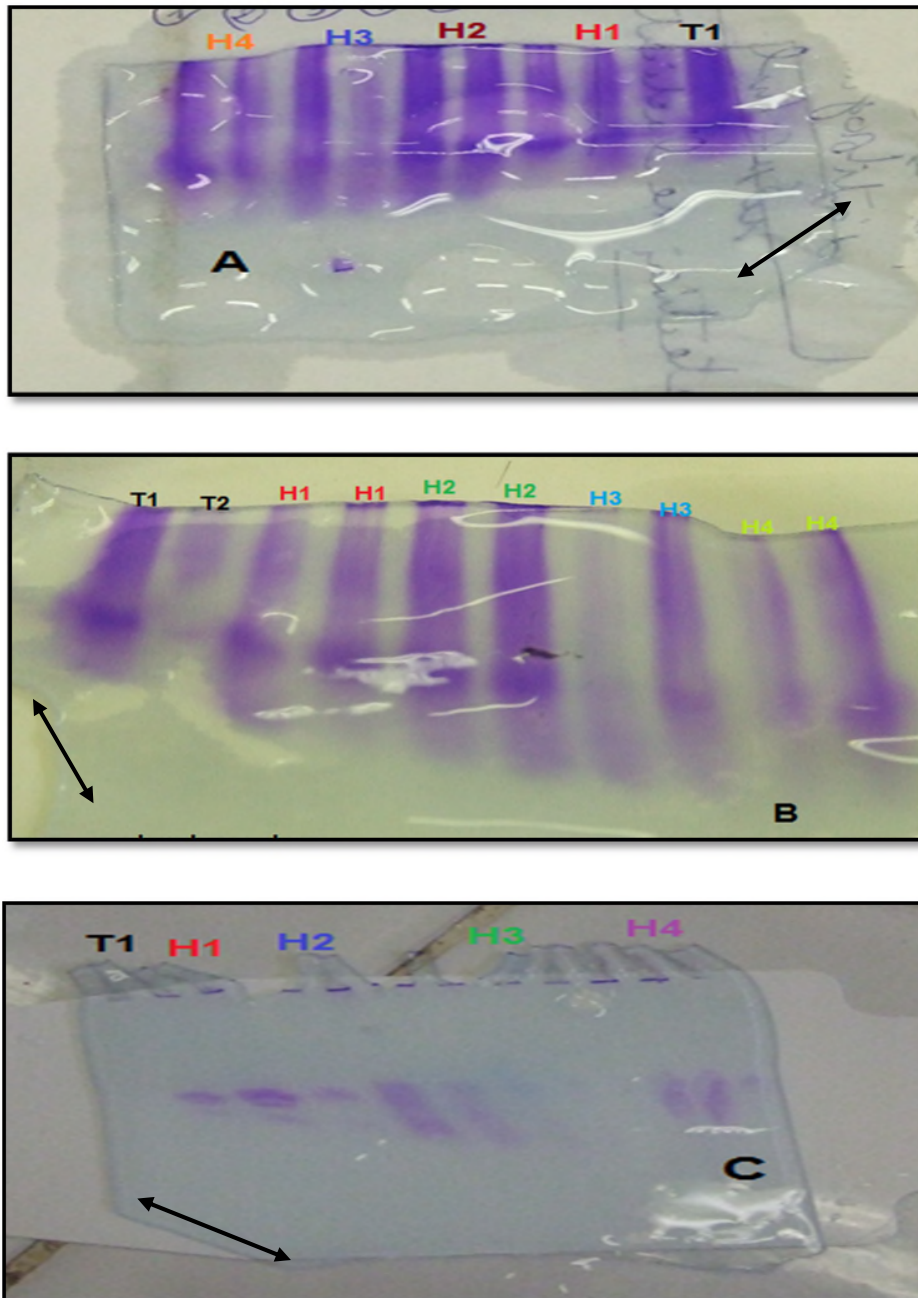


Figure 18 : Eléctrophoregrammes du lait en SDS-PAGE.

A travers les profils électrophoretique obtenus (**figure 18**) nous relevons des similitudes dans le nombre et la localisation des bandes majeures entre les échantillons testés.

Nous distinguons une bande protéique majoritaire dans le lait témoins et les échantillons testés d'autres bandes sont aussi présentes dans la totalité des échantillons, ce qui nous laisse suggérer que ces différentes bandes communes aux différents échantillons testés coprésentes aux constituants protéiques du lait.

On remarque que dans l'échantillon **H3** son profil est différent de celui de **H1, H2, H4**, car une des bandes est inexistante dans cet échantillon.

On remarque aussi que chaque échantillon présente de nouvelles bandes différentes entre ces échantillons mais aussi par rapport au témoin, il est important de signaler aussi que les bandes représentant **H3** qui est le lait + champignon à J3 (56,977%) sont les moins nombreuses en comparaisant avec **H1, H2 et H4**. Les différences observées peuvent être dues à la qualité du lait mais aussi probablement à une transformation de ce lait induite par le champignon.

Il est possible que l'utilisation de gel de l'électrophorèse avec des concentrations autre que 12% puissent donner de meilleure résolution et ainsi une meilleure caractérisation.

### **III.2. spectroscopie IR-TF**

Nous avons préparé à partir des solutions mères des solutions à concentration de 5 µg/ml. Par une seringue, nous avons déposé une à deux gouttes de chaque solution (5µg/ml) entre deux plaques KBr (Bromure de potassium).

Chaque échantillon est ensuite soumis à un rayon IR.

Les résultats obtenus sont représentés dans les **figures 19, 20, 21** :

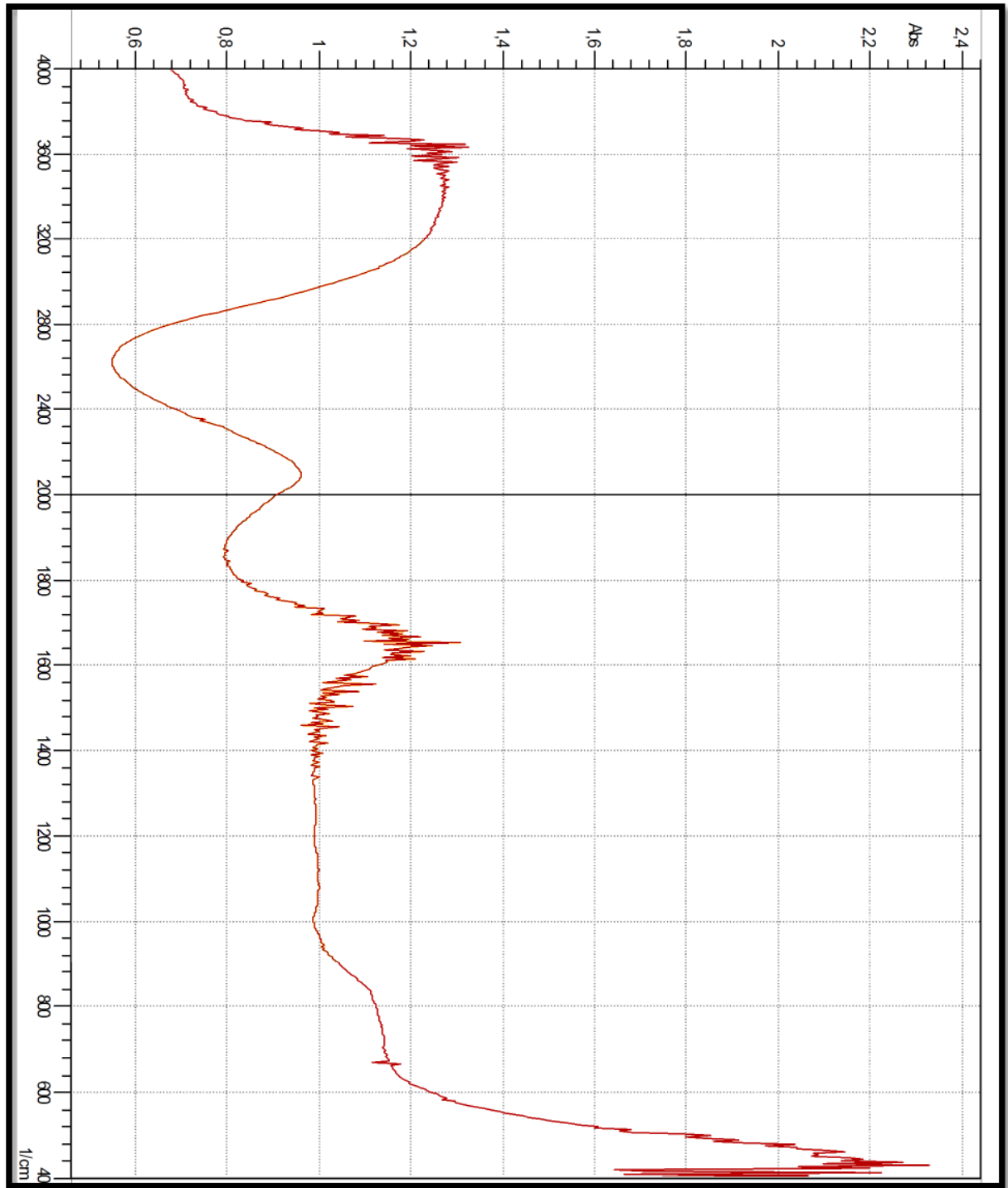


Figure 19 : profil infrarouge du lait témoin.

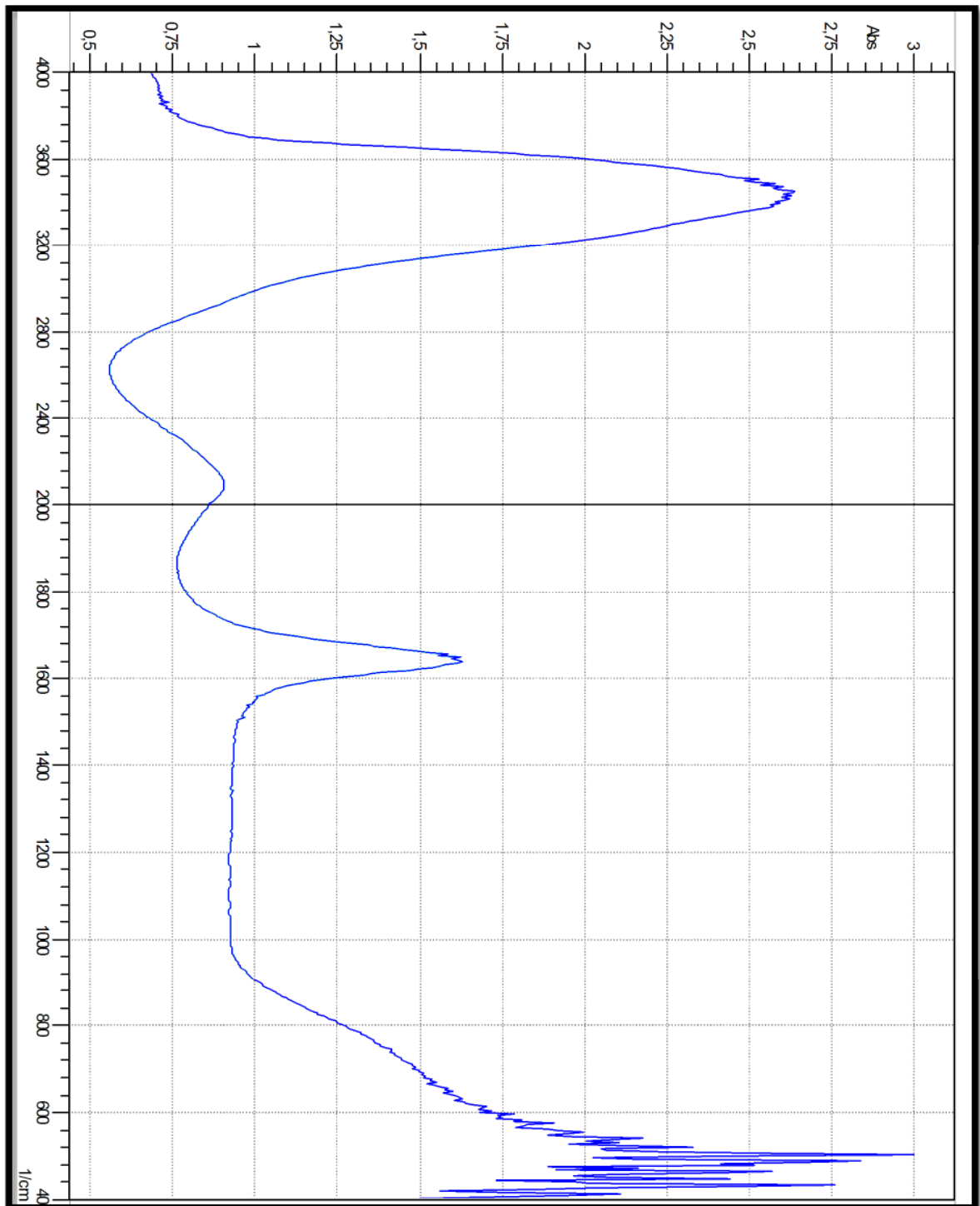


Figure 20 : profil de l'infrarouge du H4

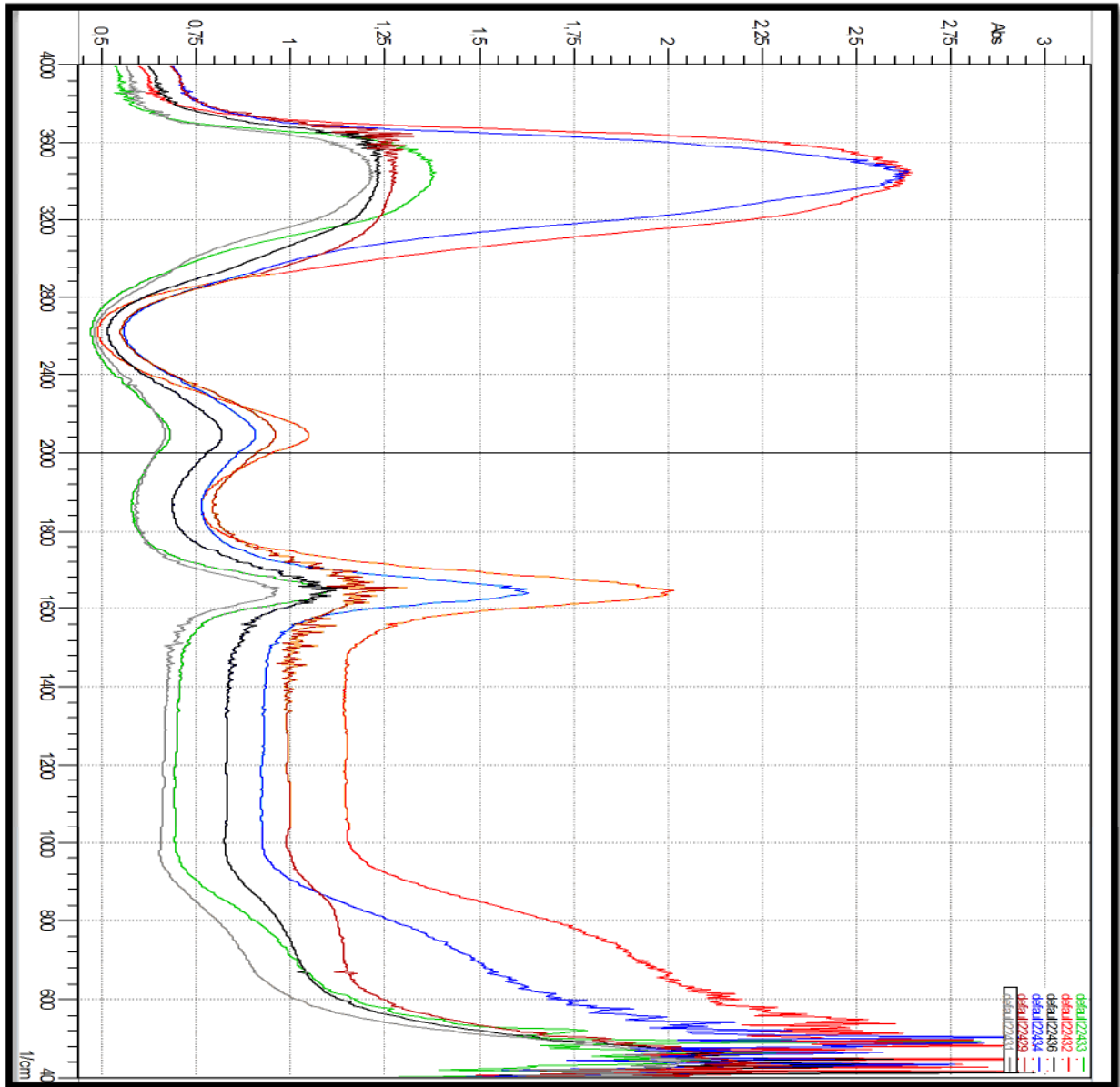


Figure 21 : Les profils de tous les échantillons et du lait témoin.

Les spectres représentant les résultats de la spectroscopie infrarouge.

Les **figures 19,20 et 21** montrent des graphiques où dans les domaines d'absorbance allant de 4000 à 2000  $\text{cm}^{-1}$

Nous remarquons la présence des espèces chimiques correspondant notamment aux amines, Aux composés aromatiques, à des acides libres ou liés saturé ou insaturé.

On remarque une différence dans les profils d'absorbance allant de 3800-3345  $\text{cm}^{-1}$  pour H2 et H4 par rapport aux autres échantillons testés on suppose qu'il y a plus de fonctions alcanes et d'acides aminés aromatiques dans ces deux échantillons par rapport aux autres qui eux comme attendu montre de fort taux de fonctions amines.

Il apparait toujours que les échantillons H2 et H4 soient différent des autres car on remarque un pic différentiel dans le domaine d'absorbance 1800-1600  $\text{cm}^{-1}$  cette différence semble être liée à l'acquisition / apparitions de liaisons covalentes C-C

De ces profils de spectroscopie infrarouge on suggère que l'incubation du lait en présence de champignon semble appliquer une transformation de la composante protéique mais aussi d'autres composés présents dans le lait, ces transformations semblent être en corrélation avec les temps d'incubation.

Le *Cordyceps sinensis* est un champignon médicinal ayant une longue histoire et un potentiel prometteur.

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontrés que le CS possède des activités biologiques diverses. Le CS en sa forme normale et les produits mycéliens fermentés présentent un large spectre d'action pharmacologique au niveau du système rénal, immunologique, hépatique, nerveux cardio-vasculaire et aussi une activité anticancéreuse.

Au cours de cette étude et dans le but d'identifier les composés de *Cordyceps sinensis* à partir de ses extraits nous avons procédé à deux méthodes d'extraction, avec de l'eau chaude et une autre utilisant du méthanol, mais les résultats montrent une très faible dissolution de la poudre dans les deux solvants. Pour cela nous avons choisi d'analyser directement le lait fermenté.

Au terme de ce travail, nous avons réalisé des dosages des composés protéiques du lait fermenté et du lait seul par la méthode de Bradford dans le but de faire une comparaison et de suivre leur évaluation de la concentration protéique et les résultats obtenus ont permis de déduire qu'à partir de la courbe de pourcentage des concentrations de ces échantillons et celle du lait seul que la tendance des concentrations des protéines est en baisse.

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE qui est un procédé biochimique permettant le fractionnement des molécules biologiques comme les protéines, a permis de révéler à travers les profils électrophorétiques des similitudes dans le nombre et la localisation des bandes majeures entre les échantillons testés et celle du lait seul.

L'analyse par spectroscopie IR-TF à son tour aussi permis à partir des profils infrarouges d'indiquer une différence dans les profils d'absorbance des échantillons et du lait seul., De ces profils de spectroscopie infrarouge on suggère que l'incubation du lait en présence du champignon semble induire une transformation de la composante protéique, et cette dernière peut-être aussi due à d'autres facteurs inconnus.

Suites à ces résultats et comme perspectives, il serait nécessaire d'effectuer plus d'études pratiques sur ce sujet, et approfondir les

- D'identifier d'autres composés détectés et qui restent inconnus.
- Tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*.

- De faire une étude à différents stades de fermentation du lait avec *Cordyceps sinensis*, dans le but de suivre la synthèse des autres composants autre que les protéines.
- Optimiser d'autres protocoles d'extraction à fin d'analyser directement la poudre de *Cordyceps sinensis*.
- Doser d'autres composés par différents méthodes.
- Etudier et analyser les différentes activités biologiques de *Cordyceps sinensis*.



*A*

1. **Alais L .N.**, 1987. Biochimie alimentaire, Ed massons. P: 142.
2. **Artjariyasripong S., Mitchell J.I., Hywel-Jones N.L., Jones E.B.G.**, 2001. Relationship of the genus *Cordyceps* and related genera, based on parsimony and spectral analysis of partial 18S and 28S ribosomal Gene sequences. Mycoscience 42, 503–517.

*B*

3. **Bao Z.D., Wu Z.G., Zheng, F., 1994** . Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in old patients. Chin. J. Integr. Med. 14 (259), 271–273.
4. **Bradford M.M.**, 1976. 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.
5. **Buenz E.J., Weaver J.G., Bauer B.A., Chalpin S.D., & Badley A.D.**, 2004. *Cordyceps sinensis* extracts do not prevent Fas-receptor and hydro-gen peroxide-induced T-cell apoptosis. Journal of Ethno pharmacology, 90, 57–62.

*C*

6. **Camus E.**, 1983. Diagnostic de la trypanosomose bovine sur le terrain par la méthode de centrifugation hématocrite. *Rev. sei. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (3), 751-769.
7. **Chen C.S., Hseu, R.S.**, 1999. Differentiation of *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. Specimens using restriction fragment length polymorphism of 18S rRNA gene. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society 37, 533–545.
8. **Chiou W.F., Chang P.C., Chou C.J., & Chen C.F.**, 2000. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Codyceps sinensis*. Life Science, 66, 1369–1376.
9. **Cleaver P., Holliday J., & Powers M.**, 2011. US Patent No. US8, 008,060 B2.

*D*

10. **Dong C.H., & Yao Y.J.**, 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. Journal of Applied Microbiology, 99, 483–492.
11. **Dong C .H., & Yao, Y-J .**, 2007. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. LWT – Food Science and Technology, 41, 669–677.

12. **Dong C.H., & Yao Y.J., 2010.** On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1027–1035.

**E**

13. **Eisenberg D.M., Miller F.H., Curto D.A., Kaptchuk T.J., Brennan T.A., 1998.** Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 280, 1610–1615.

14. **Essendoubi M., 2007.** Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures Du genre *Candida* d'origine clinique. *Thèse Doc. Univ. Reims Champagne-Ardenne. France : 218p.*

15. **Ewing J.F., Young D.V., Janero D.R., Garvey D.S. et Grinnell T.A., 1997.** Nitrosylated bovine serum albumin derivatives as pharmacologically active nitric oxide congeners. *J. Pharmaco. Expe. Therap.* 283 (2): 947-954.

**F**

16. **Forbes M.W., 2010.** Optical spectroscopy of mass-selected ions in the gas phase. *These. Doc. Uni.Toronto.* 298p.

**G**

17. **Guan Y.J., Hu G., Hou M., Jiang H., Wang X., Zhang C., 1992 .** Effect of *Cordyceps sinensis* on T-lymphocyte subsets in chronic renal failure. *Integr. Med.*, 12 (323), 338–339.

18. **Guan J., Yang.F Q., & Li S ., 2010.** Evaluation of carbohydrates in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecules*, 15, 4227–4241.

19. **Guo Q.C., Zhang C., 1995.** Clinical observations of adjunctive treatment of 20 diabetic patients with JinShuiBao capsule. *Med.*, 5, 22.

**H**

20. **Halpern, G.M. 2007.** *Champignons de guérison* . Square One Publishers. Square One Publishers. pp. 65–86. ISBN 978-0-7570-0196-3 .

21. **Holliday, J., Cleaver P., L-P., Megan P-D., 2004.** analyse de la qualité et des techniques d'hybridation of Medicinal champignon *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc (ascomycètes)" *international Journal des champignons médicinaux* (2): 152. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v6.i2.60 . ISSN 1521-9437 .

22. **Holliday J., 2005.** In Coates, Paul M. *Encyclopaedia of Dietary Supplements* 1. En Coates, Paul M. *Encyclopaedia of Dietary Supplements* 1. Marcel Dekker. Marcel Dekker. pp. 4 of *Cordyceps* Chapter. p 4 de *Cordyceps* chapitre.

23. **Holliday J., Cleaver M .**, 2008. valeur médicinale de la chenille Champignons espèces du genre *Cordyceps* A Review." *International Journal of champignons médicinaux* (New York: Begell House) **10** (3): 219. doi : 10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.30 . ISSN 1521-9437.

24. **Hsu T.H., Lo H.C.**, 2002. Biological activity of *Cordyceps* Link species (Ascomycetes) Derived from a natural source and from fermented mycelia on diabetes in STZ-induced rats. *Int. J. Med. Mushroom*, 4, 111–125.

I

25. **Ifa D.R., Manicke N.E., Dill A.L. Cooks R.G.**, 2008. Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. *Science. Vol.321.USA. 804-805pp.*

J

26. **Jachimska B. Pajor A.**, 2012. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry* 87: 138-146.

27. **Jen C.Y., Lin C.Y., Huang B.M., & Leu S. F.**, 2011. Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis through caspase-9 pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–11.

28. **Jiang J.C., Gao Y.F.**, 1995. Summary of treatment of 37 chronic renal dysfunction patients with JinShuiBao. *Med.*, 5, 23–24.

29. **Ji Y.B.**, 1999. Pharmacological action and application of anticancer traditional Chinese medicine Ha'erbin, China: Heilongjiang Science and Technology Press (in Chinese) p. 94.

K

30. **Kiho T., Yamane A., Hui J., Usui S., Ukai S.**, 2000. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CSF30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Phytother. Res.*, 4 (8), 647–649.

31. **Kim, G.Y., Ko, W.S., Lee J.Y., Lee J.O., Ryu C.H., Choi B.T.**, 2006. Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow derived dendritic cells *in vitro*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 354–360.

32. **Kinjo N., Zang M.**, 2001. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. *Mycoscience* 42, 567–574.

L

33. **Laemmli U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* 227, 680 – 685 .

34. **Liu C., Xue H.M., Xu L.M., Zhao P.Z., Zhang L.B., Tang M.G .,** 1986. Treatment of 22 patients with post hepatic cirrhosis with a preparation of fermented mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Med.*, 6, 30–31.
35. **Li S., P Li., Dong T.,** 2001b. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis. 22, 144–150.
36. **Li S., P Li., P Ji., H Zhang ., P Dong ., T. T., & Tsim, K.W .,**2001c. The contents and their change of nucleosides from natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 36, 436–439.
37. **Li S.P., Su Z.R., Dong T.T., & Tsim K. W.,** 2002. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. *Phytomedicines*, 9, 319–324.
38. **Li S.P., Li P., Lai C.M., Gong Y.X., Kan K.K., Dong T., et al.,** 2004. Simultaneous determination of ergosterol, nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurised liquid extraction and high performance Liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1036, 239–243.
39. **Li C., Chiang C. S., Tsai M.L., Hseu R., Shu W., Chuang C., Sun Y., Chang Y., Lin J., Chen C., Huang C., & Hsu I.** 2009. Twosided effect of *Cordyceps sinensis* on dendritic cells in different physiological stages. *Journal of Leukocyte Biology*, 85, 987–995.
40. **Lott J-A., Stephan V-A., Pritchard K-A.,** 1983. Evaluation of coomassie Brilliant blue G 250 method for urinaryprotein. *Clin-Chem.* 29(11): 1946-1950.

*M*

41. **Manca C.,** 1999. Reactivite du nitromethane induite par irradiations selectives : determination des formes ACI et ACI-ION. Thèse Doc. Univ. Aix-Marseille I. France. 42p.
42. **Matsuda H., Akaki J., Nakamura S., Okazaki Y., Kojima H., Tamesada M., & Yoshikawa M.,** 2009. Apoptosis-inducing effects of sterols from the dried powder of cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin(Tokyo)*, 57, 411–414.
43. **Maurice N.,** 1997. De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed : Lavoisier, Paris.; 12- 14.
44. **Mizuno T.,** 1999. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps Link (Ascomycetes)* and *Isaria Fr. (Mitosporic fungi)* Chinese caterpillar fungi, *Tochukaso .1*, 251–162.

N

45. **Naik P.N., Chimatadar S.A., Nandibewoor S.T.**, 2010. Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100: 147-159.
46. **Neurophilosophy**: lavage de cerveau par un parasite" . 2006-11-20 . 2006-11-20. Retrieved 2008-07-02 . Consulté le 2008-07-02. Les refÉrence pour la generalit de cs
47. **Nikoh N., Fukatsu T.**, 2000. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 629–638.

O

48. **Owusu-Apenten R.K.**, 2002. Food protein analysis. Quantitative effects on processing. *Marcel Dekker, Inc. New York*. 482p.

P

49. **Pandey N., Budhathoki U.**, 2007. Protein determination through bradford's method of Nepalese mushroom. *Scientific World* 5(5): 85-88.
50. **Paterson, R.R.M.**, 2007. Ganoderma disease of oil palm – a white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Prot.* 26, 1369–1376 .
51. **Petibois C., Deleris G., Cazorla G.**, 2000. Nouvelle perspective pour la survie biologique des sportifs : analyse métabolique par spectrométrie IR-TF. *Science & Sports* 15 : 95-97.
52. **Pierangeli G., Vital G., and Windell R.**, 2009. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* King and Robinson and *Uncaria perrottetii* Merr Extracts *Medicinal Plants Res.* 511-518 .

Q

53. **Qian G., Pan G.F., & Guo J.Y.**, 2012. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research*, 1–5.

R

54. **Rhee K.H.**, 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic Properties. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 423–427.

55. **Road V.**, 2001. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Thermo Nicolet Corporation. Madison. USA. 8p.*

S

56. **Schauenberg P., Ferdinand P.**, 2006. Guide des plantes médicinales. Ed: Detachaux ET Niestlé. P-8.

57. **Sigma Aldrich**, 1996. Fiche technique. *USA. 2p.*

58. **Smith J.E., Rowan N.J., & Tan K. K.**, 2000. Functional food science and the medicinal mushrooms. *International Journal Medicinal Mushrooms*, 2, 277–285.

59. **Spitz J.A.**, 2006. Etude et imagerie de la polymérisation de l'actine. *Thèse Doc. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 214p.*

V

60. **Van H. E., Johnson W., Curtis S.**, 2006. The Binding of Coomassie Blue to Albumin. *CHEM 331L. Principles of Physical Chemistry Biochemistry*, 2nd Ed. 10p.

W

61. **Wang R., Xu Y., Ji P., Wang X., Holliday J.**, 2001. Clinical Trial of a Mixture of Six Medicinal Mushroom Extracts. [Http://alohamedicinals. Com/clinical\\_trials.htm](http://alohamedicinals.com/clinical_trials.htm).

62. **Wang R., Xie J., Ji P., Li S., Zhan H., Xia J., Sun H., Lei L., Yu J., Wang Y., Holliday J.**, 2002. Clinical Trial Report on Chronic Hepatitis Treatment Using Immune-assist Brand Mushroom Extract Mixture in Conjunction with the Drug LAMIVUDINE; [http://alohamedicinals.com/Hep\\_B\\_Study2.htm](http://alohamedicinals.com/Hep_B_Study2.htm).

63. **Winkler D.**, 2008a. Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the Fungal Commodification of the Rural Economy in Tibet AR. *Chenille-champignon (*Cordyceps sinensis*) et la marchandisation fongique de l'économie rurale au Tibet AR. Economic Botany 63.2: 291–306*  
*Economic Botany 63,2: 291-30.*

Y

64. **Yamaguchi N., Yoshida J., Ren L.J., Chen H., Miyazawa Y., Fujii Y., Huang Y.X., & Takamura S.**, 1990. Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy*, 2, 199–205 .

65. **Yoshikawa N., Yamada S., Takeuchi C., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M., & Nakamura K.**, 2008. Cordycepin (30- deoxyadenosine) inhibits the growth of B16–BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A3 receptor followed by glycogen

synthase kinase-3beta activation and cyclin D1 suppression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 377, 591–595.

66. **Yuan J., Wang J., Liu X., Kuang H., & Zhao S.**, 2007. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chemistry*, 105, 1755–1759.

Z

67. **Zhang X.Q., Pu Y.P., Yin L.H., & Zhong W.J.**, 2003. Studies on the scavenging effect on superoxide anion free radical and hydroxyl free radical of *Cordyceps sinensis*. *Chinese Journal of Gerontology*, 23, 773–775.

68. **Zhang Q., Wu J., Hu Z., & Li D.**, 2004. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium. *Life Science*, 75, 2911–2919.

69. **Zhao C.S., Yin W.T., Wang J.Y., Zhang Y., Yu H., Cooper R., Smidt C., Zhu J.S.**, 2002. *Cordyceps Cs-4* improves glucose metabolism and increases insulin sensitivity in normal rats. *J. Alternat. Complement. Med.*, 8 (4), 403–405.

70. **Zhou J.S., Halpern G., Jones K.**, 1998 The scientific rediscovery of an ancient Chinese Herbal Medicine: *Cordyceps sinensis*. *J. Alternat. Complement. Med.*, 4, 429–457.

71. **Zhu J.S., Halpern G. M., & Jones K.**, 1998a. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: Part I. *Journal of Alternative & Complementary Medicines*, 4, 289–303.

72. **Zhu J.S., Halpern G.M., & Jones K.**, 1998b. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: Part II. *Journal of Alternative & Complementary Medicines*, 4, 429–457.

**Tableau I** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait.

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Cham +lait 28-01-2014	0.116	10.265
Cham +lait 30-01-2014	0.227	20.088
Cham +lait 23-02-2014	1.114	98.584
Cham +lait 10-03-2014	0.343	30.353
Témoin lait seul de 23/2/14	0.225	19.911

**Tableau II** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait dans la source de champignon avec un poids supérieur à 7g et récupération du lait chaque 24h.

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Cham +lait 10-03-2014	0.569	50.353
Cham +lait 13-03-2014	0.160	14.159
Cham +lait 16-03-2014	0.259	22.920
Cham +lait 18-03-2014	0.482	42.654
Témoin lait seul de de10	0.578	51.150

**Tableau III** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait dans la Source 2 de champignon avec un poids de (6 .92g) et récupération du lait (48h)

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Cham +lait 18-03-2014	0,617	54,610
Cham +lait 20-03-2014	0,843	74 ,610
Cham +lait 24-03-2014	0 ,735	65,044
Témoin lait seul de 18	0 ,895	79,203



**Tableau IV** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait (30ml) dans la Source 2 de champignon (6.92g) pendant 24h

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Lait témoin de 25-03-2014	0,649	57,433
Lait témoin de 26-03-2014	0,418	36,991
Cham +lait de 26-03-2014	0,481	42,566
Cham +lait de 27-03-2014	0,165	14,601

**Tableau V** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait (60ml) dans la Source 2 de champignon (6.97g) pendant 48h

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Lait témoin 27-03-2014	0,471	41,681
Cham +lait de 29-03-2014	0,716	63,362
Cham +lait de 30-03-2014	0,576	50,973

**Tableau VI** : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du lait.

N° Echantillon	$\Delta$ Absorbance	Concentration (g/ml)
Lait témoin 30-03-2014 meme jour	0,855	75,663
Lait témoin 31-03-2014	0,790	69,911
Cham +lait de 31-03-2014 (36h)	0,700	61,946
Cham +lait de 01-04-2014 (48h)	0,346	30,619

**Tableau VII :** Les concentrations moyennes du lait témoin avec les concentrations moyenne du lait avec champ

Concentrations moyenne du lait témoin g/ml	Concentrations du lait avec champignon g/ml
19,911	15,176
51,150	35,722
79,203	46,754
41,681	52,005
72,787	46,282

**Tableau VIII :** concentrations du lait en fonction du temps

Lait témoin	Concentration (g/ml)
J0	59.758
J1	79.203
J2	51.150
J3	41.991
J4	36.911

**Tableau IX :** Résultats de l'absorbance de la gamme étalon

Concentrations (mg/ml)	0	5	10	25
$\Delta$ Absorbance	0	0.050	0.156	0.318

**Tableau X : Composition chimique du gel de séparation**

Composants	Quantités
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,9ml
<b>1,5 M Tris pH 8.8</b>	1,3ml
<b>30% Acrylamide</b>	1,7ml
<b>10% SDS</b>	50ul
<b>10% APS</b>	100ul
<b>TEMED</b>	10ul

**Tableau XI : Composition chimique du gel de concentration**

<b>Gel de concentration à 5%</b>	
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>1,4ml</b>
<b>1 M Tris pH 6.8</b>	<b>250ul</b>
<b>30% Acrylamide</b>	<b>330ul</b>
<b>10% SDS</b>	<b>20ul</b>
<b>10% APS</b>	<b>50ul</b>
<b>TEMED</b>	<b>5ul</b>

**Tableau XII : Les différents échantillons**

Abbreviations	Nom complet
<b>T</b>	Témoin 1
<b>T'</b>	Témoin 2
<b>H1</b>	Champignon 1
<b>H2</b>	Champignon 2
<b>H3</b>	Champignon 3
<b>H4</b>	Champignon 4



**Figure1** : les dilutions du lait 1/1000



**Figure2** : les différentes solutions utilisées pour l'électrophorèse

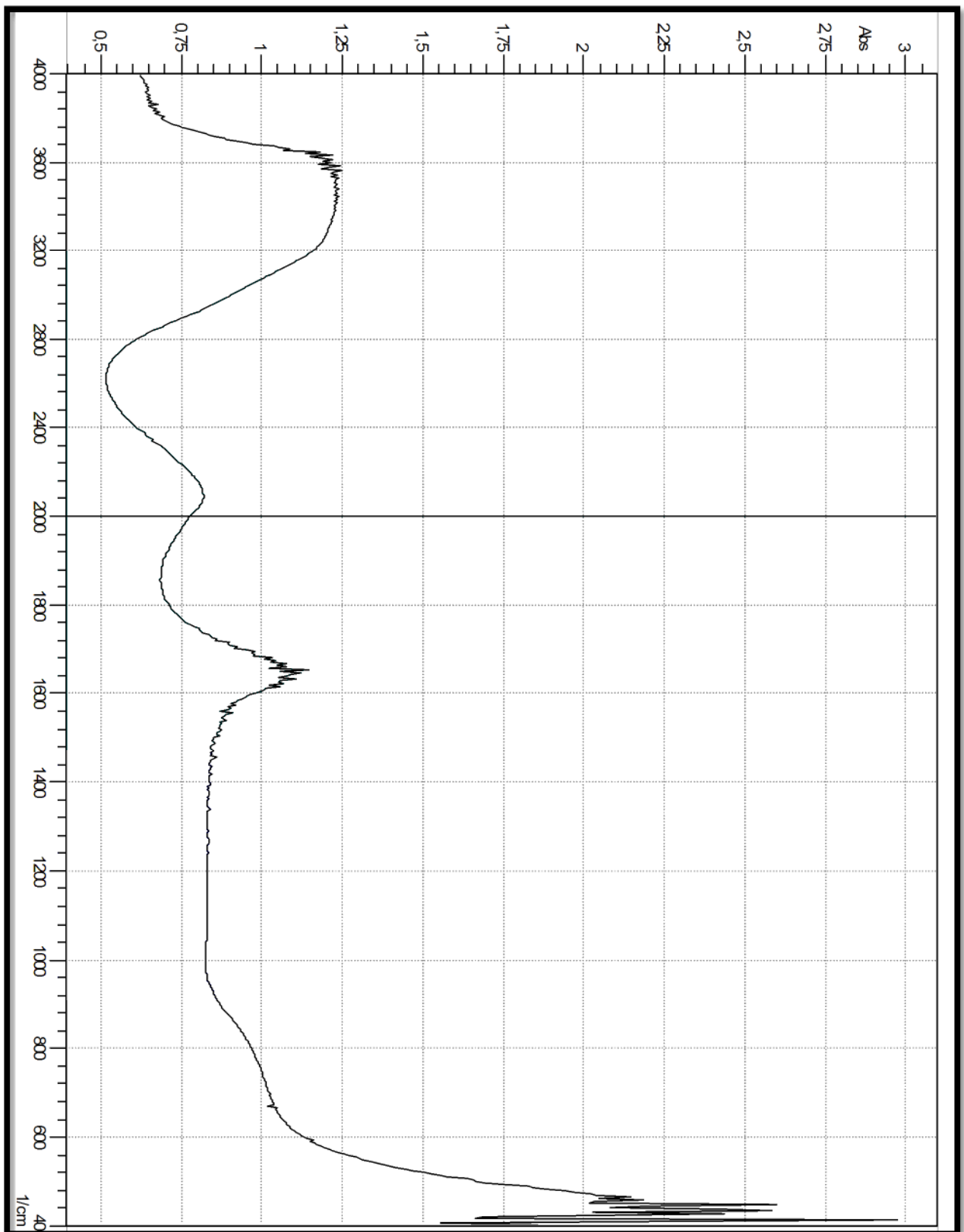


Figure 3 : profil de l'infrarouge du H1

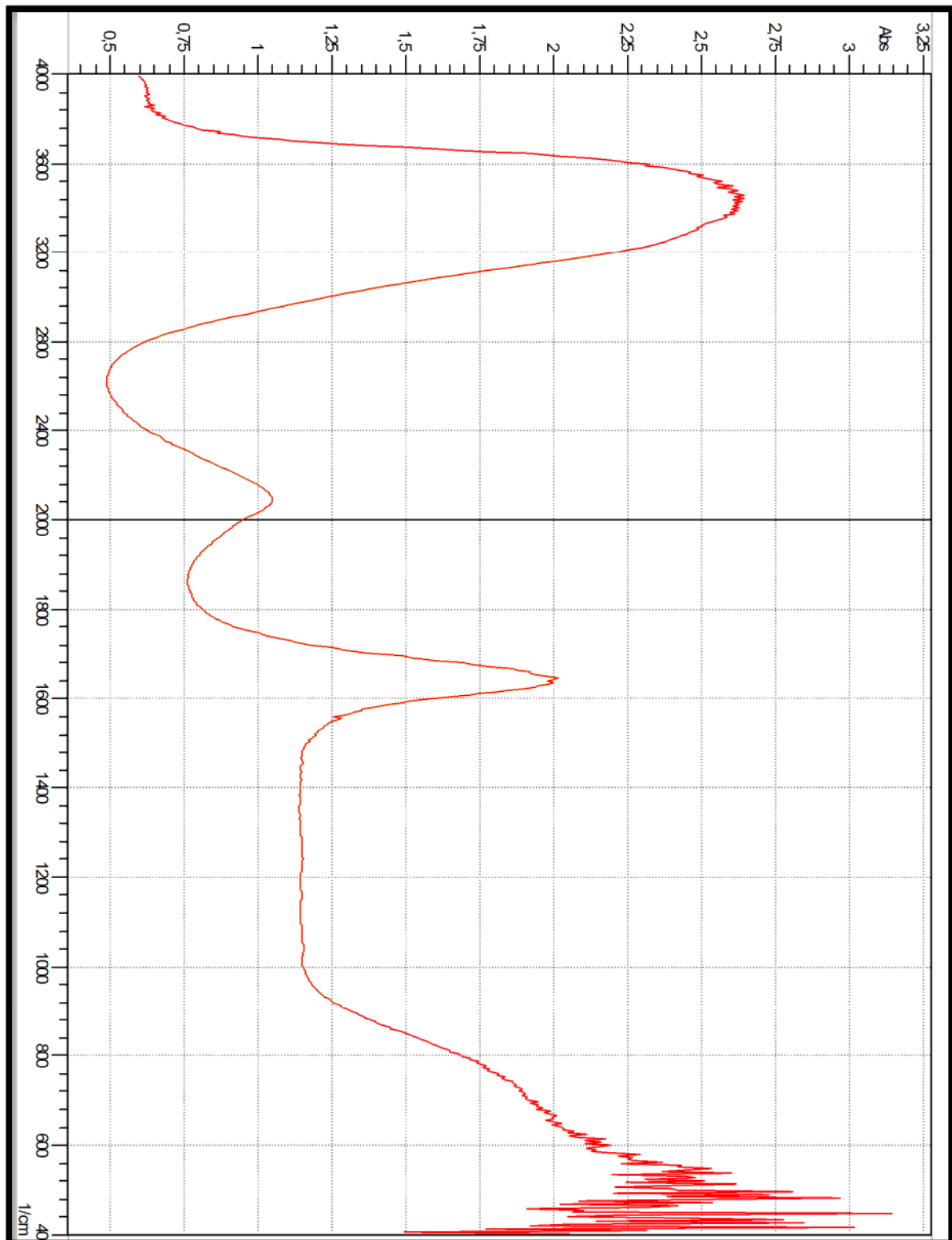


Figure 4 : profil de l'infrarouge du H2

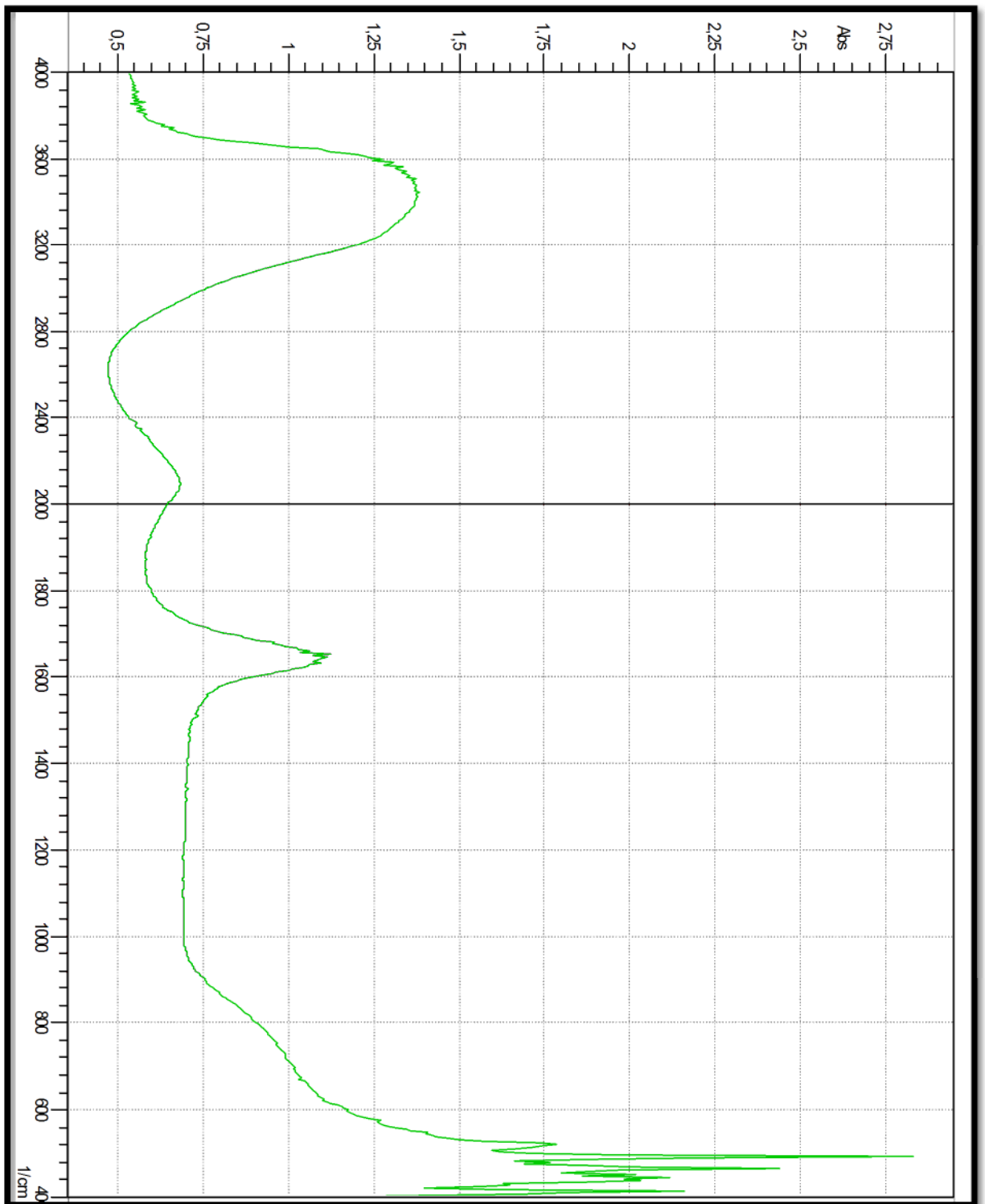


Figure 5: profil de l'infrarouge du H3

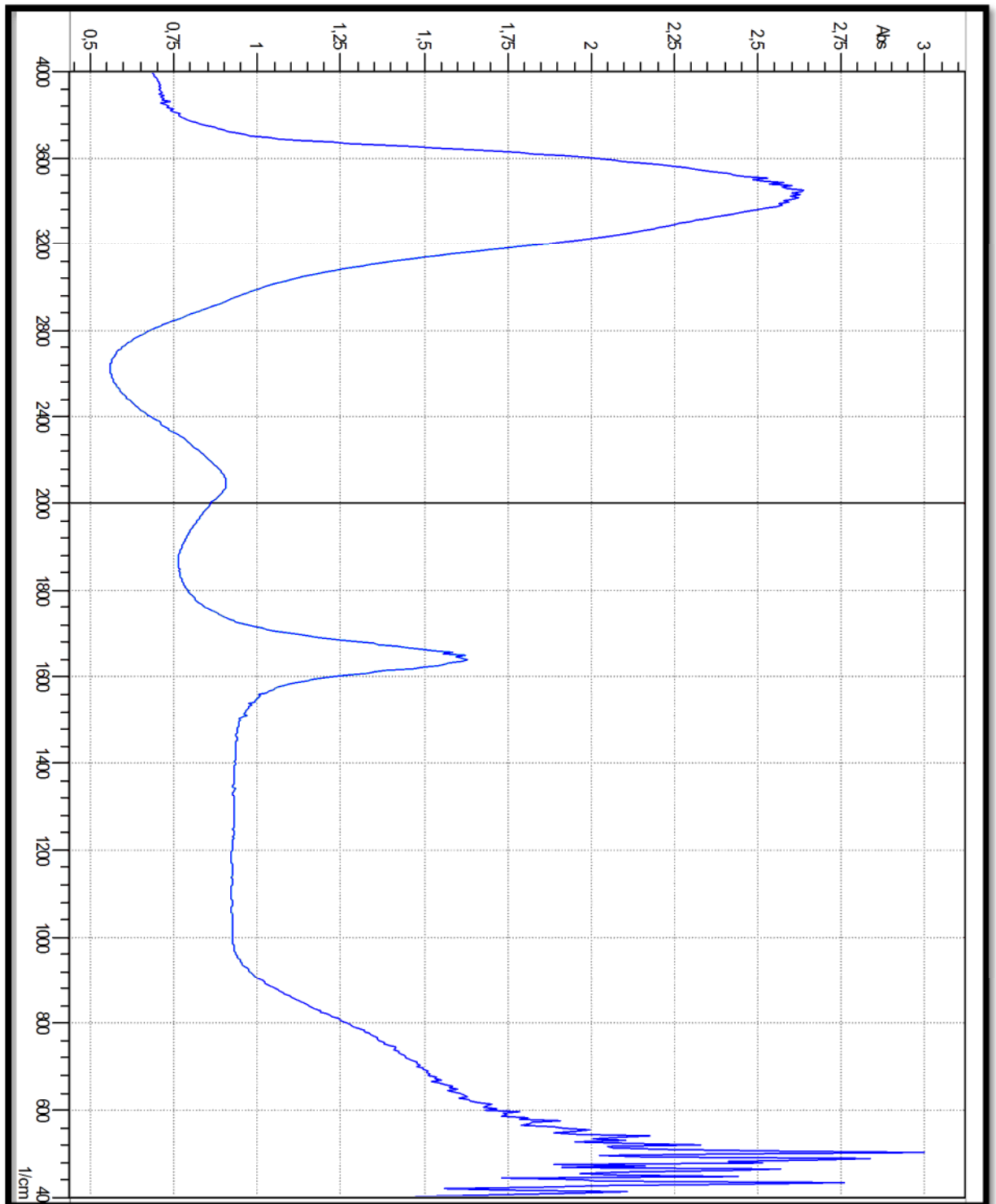


Figure 6 : profil de l'infrarouge du H4



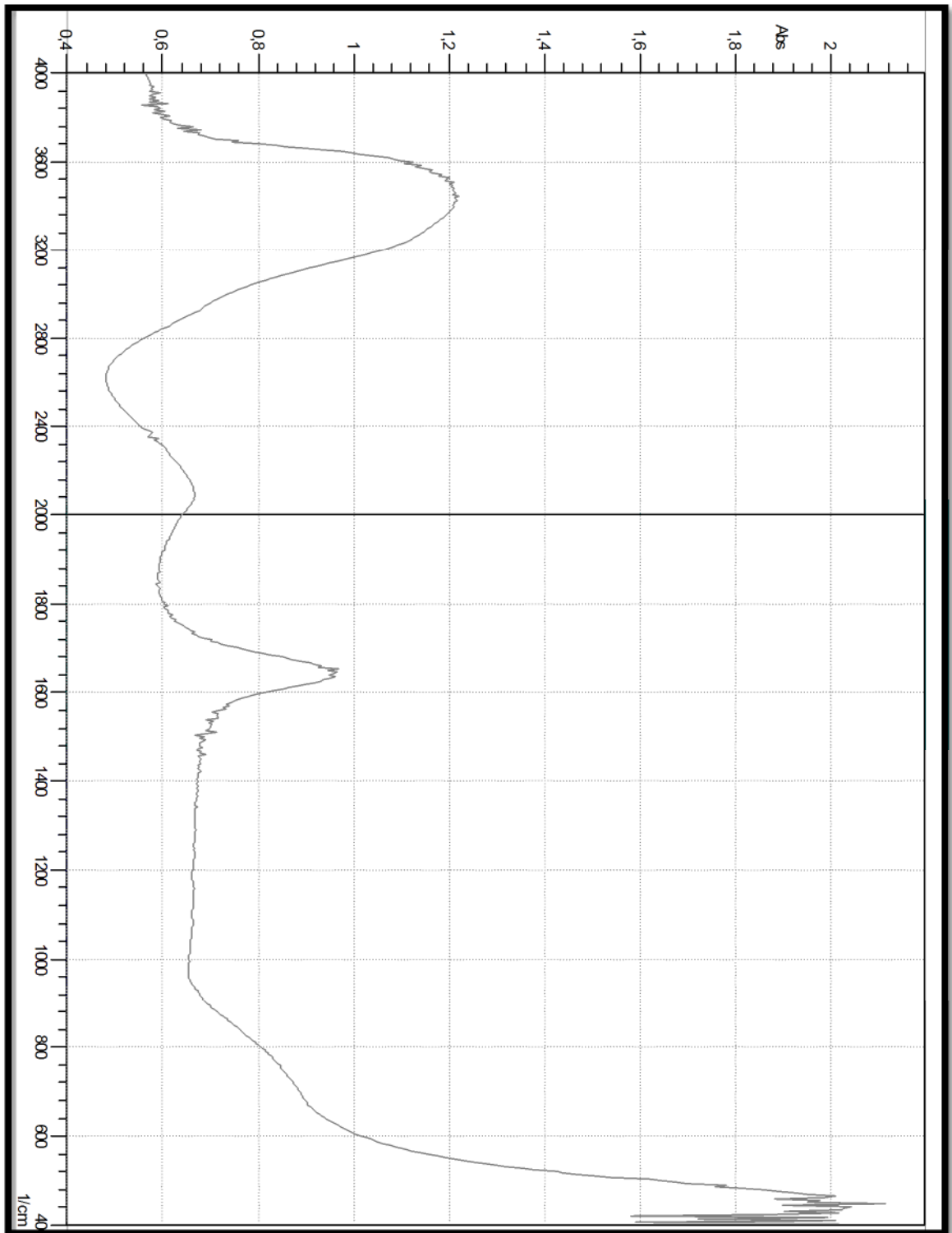


Figure 7 : profil de l'infrarouge du lait témoin T

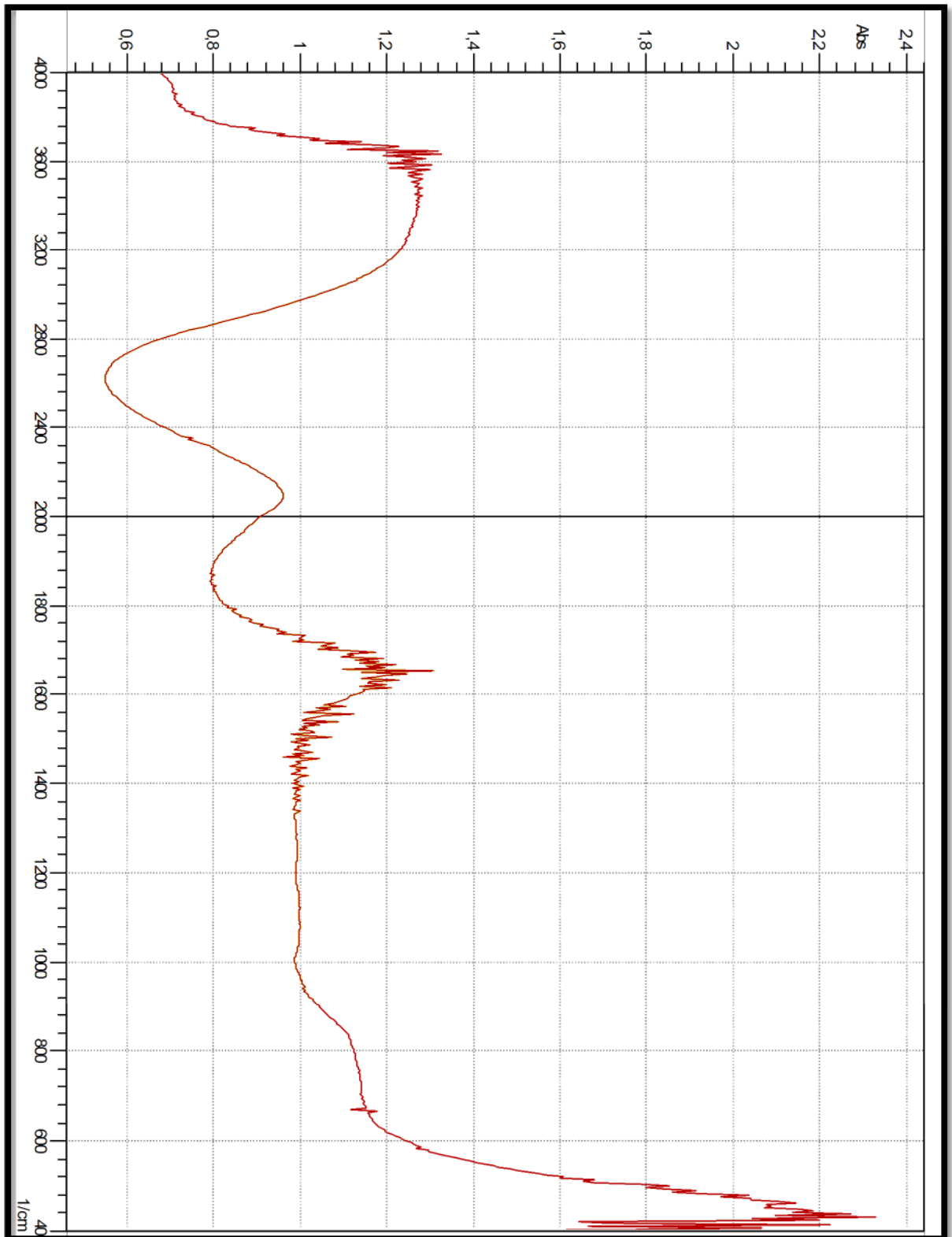


Figure 8: profil de l'infrarouge du lait témoin T'

# Glossaire

**Aflatoxine** : est une mycotoxine produite par des champignons proliférant sur des graines conservées en atmosphère chaude et humide. Elle est nuisible aussi bien chez l'homme que chez l'animal, et possède un pouvoir cancérigène élevé. Elle fut découverte en 1960 en Angleterre.

**Aliment tonique** : désignait autrefois un aliment jugé susceptible de redonner un degré normal de vigueur ou de rétablir la santé. Autrement dit, un tel aliment est censé donner du tonus.

**Anamorphe** : le qualificatif qui désigne la forme reproductrice asexuée d'un champignon ; par opposition, sa forme reproductrice sexuée est alors dite « téléomorphe ».

**Ascospore** : chez les Ascomycètes, désigne une spore issue d'une asque.

Cette spore élaborée dans une asque est issue d'une caryogamie suivie d'une méiose puis d'une mitose. Chaque asque forme 8 ascospores (rarement 4).

**Ascocarpe** : est l'appareil fructifère chez les Ascomycètes. S'élaborant à la surface du stroma, les ascocarpes libèrent à terme les ascospores.

**Carpophore** : Partie visible, non souterraine, des champignons à basides, généralement constituée d'un pied et d'un chapeau et portant des spores à la face inférieure du chapeau. C'est cette partie que l'on nomme usuellement champignon

**Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)** : mais on trouve plus fréquemment l'abréviation anglaise HPLC (*high performance liquid chromatography*) depuis les années 1990 — est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie « haute pression ». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique

**Cirrhose post-hépatite** : appelée également, atrophie jaune subaiguë, atrophie jaune subchronique, nécrose hépatique subaiguë, nécrose hépatique submassive ou cirrhose toxique, se caractérise par une cirrhose faisant suite à un ou plusieurs épisodes de nécrose du foie, nécrose survenant sur un mode aigu c'est-à-dire relativement rapidement

**Cordycépine** : est une substance extraite de champignons ascomycètes parasites des insectes, en particulier d'*Ophiocordyceps sinensis*. La cordycépine est analogue à l'adénosine : elle perturbe le métabolisme des purines en se substituant à l'adénosine et inhibe la dernière étape de la biosynthèse de l'ARN. Elle offre un intérêt dans la lutte contre certaines formes de cancer

**Cyclosporine** : est un agent immunosuppresseur dont l'utilisation thérapeutique, dès le début des années 1980, a permis un essor considérable du domaine de la transplantation d'organes en prévenant le rejet aigu des allogreffes. Aujourd'hui encore largement employée en transplantation (peau, cœur, rein, poumons, pancréas, moelle osseuse, intestin grêle), quoique concurrencée par des molécules plus récentes, la cyclosporine a également des applications en dermatologie et dans le traitement de certaines maladies auto-immunes

**Egouttage** : est l'étape de séparation du caillé, la phase solide, et du lactosérum ou petit lait, la phase liquide composée d'eau et de matières solubles telles que le lactose (75%), des minéraux (essentiellement du calcium), des vitamines et des protéines (10%), et d'évacuation de ce dernier. Durant cette phase, ce sont 80% de l'eau contenue dans le caillé qui sont extraits. Cette étape est importante puisque la nature du fromage fabriqué dépend de la méthode d'égouttage pratiquée. Il faut notamment savoir que la capacité à s'égoutter d'un caillé est directement en relation avec sa coagulation et que l'égouttage commence dès la coagulation du lait.

**Endoparasitoïde** : est un organisme qui se développe sur ou à l'intérieur d'un autre organisme dit « hôte », mais qui tue inévitablement ce dernier au cours de ce développement ou à la fin de ce développement, alors que de nombreux parasites ne tuent pas leur hôte

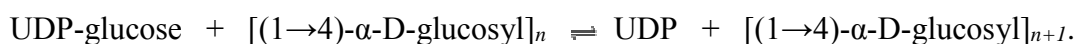
**Entérocoque** : résistant à la vancomycine (ERV) est un type de bactérie qui a acquis une résistance aux antibiotiques les plus courants. Lorsque des antibiotiques sont utilisés et qu'ils ne sont pas requis, certaines bactéries développent une remarquable capacité à résister au

traitement. Ces bactéries résistantes peuvent causer de graves infections qui risquent d'être difficiles ou impossibles à traiter. Elles se retrouvent normalement dans l'intestin et le tube digestif des humains

**Ergostérol :** (ergosta-5,7,22-triène-3 $\beta$ -ol), est un stérol cristallin synthétisé par des levures à partir de sucres ou dérivé de l'ergot du seigle. Il est transformé en vitamine D<sub>2</sub> par exposition aux rayons ultraviolets. Il est converti en viostérol par la lumière ultraviolette, puis en ergocalciférol, qui est une forme de la vitamine D. C'est un composant des membranes des cellules fongiques, remplissant la même fonction que le cholestérol chez les cellules animales (not. contrôle de la fluidité, précurseur d'autres molécules). La présence de l'ergostérol dans les membranes de cellules fongiques couplée à son absence dans les membranes des cellules animales en fait une cible pour des fongicides.

**Essai randomisé :** Les sujets (volontaires, malades ou non) recevant un certain traitement (produit, dosage, méthode...) ou un placebo sont choisis au hasard (*random*, en anglais). On évite ainsi les biais de sélection, qui pourraient conduire à constituer des groupes différents (origine sociale, historique médical, habitudes alimentaires, situations personnelles, etc.).

**Glycogène synthase :** est une glycosyltransférase essentielle de la glycogénogenèse, c'est-à-dire du stockage du glucose par polymérisation en glycogène :



Cette réaction est régulée efficacement par des effecteurs allostériques tels que le glucose-6-phosphate, et est indirectement déclenchée par l'insuline, sécrétée par le pancréas. Elle est inhibée par phosphorylation.

**Lamivudine :** (2',3'-didéoxy-3'-thiacytidine, 3TC) est un puissant inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse commercialisé sous le nom de Epivir. Elle peut inhiber les deux types (1 et 2) de transcriptase inverse de VIH ainsi que celle du virus de l'hépatite B. Pour qu'elle devienne active, il faut qu'elle soit phosphorylée sous sa forme triphosphate. Le triphosphate de 3TC inhibe ainsi l'ADN polymérase cellulaire. Elle est actuellement le médicament antirétroviral le plus utilisé, prescrit pratiquement systématiquement, et ceci depuis son introduction dans la trithérapie en 1995-1996, années où la mortalité due au Sida a chuté

considérablement. elle est administrée par voie orale, et elle est rapidement absorbée avec une bio-disponibilité supérieure à 80 %.

**Lépidoptères :** (Lepidoptera) sont un ordre d'insectes dont la forme adulte est communément appelée papillon et dont la larve est une chenille

**Linoléique :** Ce sont des molécules organiques insolubles dans l'eau (lipos) et solubles dans les solvants organiques apolaires comme benzène, chloroforme, éther, ...

Ils sont caractérisés par la présence dans la molécule d'au moins un acide gras ou chaîne grasse. Sont rattachés aux lipides, en raison de leur insolubilité dans l'eau, le cholestérol, les stéroïdes, la vitamine D, qui sont des dérivés polyisopréniques.

**Monophylie :** du grec *monos* « seul » et *phulon* « tribu », est la caractéristique d'un groupe qui contient l'espèce souche dont descendent tous ses membres

**Mycélium :** est la partie végétative des champignons ou de certaines bactéries filamenteuses comme les Actinomycètes (*Streptomyces*, *Mycobacterium*...). Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, que l'on trouve dans le sol ou le substrat de culture.

**Myélocyte :** Cellule de la moëlle osseuse (tissu interne des os), dérivée du myéloblaste et précurseur des globules blancs dits polynucléaires (dont le noyau irrégulier paraît multiple).

**Peroxydation des lipides :** (ou encore la *peroxydation lipidique* ou *lipoperoxydation*) est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes

**Phylogénie moléculaire :** est l'utilisation de séquences de macromolécules biologiques pour obtenir des informations sur l'histoire évolutive des êtres vivants, et notamment sur leurs liens de parenté (leur phylogénie).

**Placébo :** est un médicament sans principe actif. Il n'a donc de ce fait aucun effet pharmacologique dans la pathologie qu'il est censé traiter. Pour autant, il n'est pas toujours sans bénéfice sur la santé des patients, car il agit via l'effet placébo.

**Psychotrope** : est une substance qui agit principalement sur l'état du système nerveux central en y modifiant certains processus biochimiques et physiologiques cérébraux, sans préjuger de sa capacité à induire des phénomènes de dépendance, ni de son éventuelle toxicité<sup>1</sup>. En altérant de la sorte les fonctions du cerveau, un psychotrope induit des modifications de la perception, des sensations, de l'humeur, de la conscience (*états modifiés de conscience*) ou d'autres fonctions psychologiques.

**Sorbose** : est un cétohexose (un hexose du type cétose), c'est un ose constitué d'une chaîne de cinq éléments carbone ainsi que d'une fonction cétone.

**Sporophore** : est l'organe de la fructification » du mycélium des *Fungi* ou *mycota*. Il produit des spores, sous diverses formes.

**Xanthine oxydase ou XO** : est une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique.

## Résumé

*Cordyceps sinensis* est un champignon qui a longtemps été utilisé comme médicament dans la médecine chinoise dans le but de promouvoir la santé. Il a été rapporté pour être capable d'une variété d'activités biologiques, y compris la régulation des réponses immunologiques et inflammatoires, et pour avoir des propriétés anti-tumorales, protection du foie et augmentation de l'ATP cellulaire. La présente étude nous a permis en premier lieu de suivre les changements de la concentration protéique de nos échantillons et du lait seul en fonction du temps et d'observer une différence importante entre ces concentrations qui sont dues peut être aux divers facteurs. En seconde lieu l'analyse par électrophorèse a permis de révéler à travers les profils électrophoretiques des similitudes dans le nombre et la localisation des bandes majeures entre les échantillons testés et celle du lait seul. Tandis que l'analyse par spectroscopie IR-TF à travers les profils d'infrarouges a permis de suggérer que le facteur l'incubation peut influencer sur la transformation de la composante protéique du lait en présence de champignon mais aussi d'autres composés présents dans le lait, ces transformations semblent être en corrélation avec les temps d'incubation.

**Mots clés:** *Cordyceps sinensis*, activités biologiques, lait fermenté, concentration protéique, bradford, électrophorèse.

## Abstract

*Cordyceps sinensis* is a fungus that as long been used like drug in Chinese medicine to promote health it has even reported to be capable of variety biological activities, including the regulation of immunological end inflammatory reponses, and to have antitumor activities, liver protection, and increased cellular ATP properties. This study has allowed us first to follow changes in protein concentration in our samples and the only milk versus time and observe a significant difference between these concentrations may be due to various factors. In second place electrophoretic analysis also revealed through the electrophoretic profiles of the similarities in the number and location of major bands between samples tested and that the only milk While analysis by FT-IR spectroscopy via the infrared has profiles suggest that the factor of incubation can be influenced the transformation component of the milk protein in the presence of fungus also other compounds in milk, these changes appear to be correlated with the time of incubation.

**Keys words:** *Cordyceps sinensis*, biological activities, milk, protein concentration, Bradford, electrophoresis.