



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire: قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques / Biotechnologies / Écologie et Environnement

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude phylogénétique et purification d'une lectine du champignon
Laetiporus sulphureus souche TMES43 d'Algérie**

Présenté par : BENZAOUI Achouak

Le : 09/06/2024

DJABALLAH Nihel

Jury d'évaluation :

Président : MEDOUKALI Imene. MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri.

Encadrant : TOUMI Mohammed Es-seddik. MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri.

Examineur(s) : OUELBANI Rayenne. MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri.

**Année universitaire
2023 - 2024**

Remerciements

Un travail scientifique obéit à un esprit de collégialité, ainsi c'est l'occasion pour remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail. Par conséquent, il y a tellement de gens qu'on veut remercier qu'on a peur d'en oublier. Mais si tel était le cas, on s'excuse dès à présent...

Nous tenons également à remercier notre cher encadrant Dr. TOUMI Mohammed Es-seddik pour son temps et ses efforts, partageant son expérience et nous guidant jusqu'au bout, de ce travail avec ses motivations et conseils proposés au niveau théorique et Pratique ainsi que son collègue Dr. KEBAILI Fethi Farouk avec son équipe de recherche.

Nous exprimons nos estimations et nos remerciements aux membres de nous jury :

La présidente de jury Dr. MEDOUKALI Imene de nous faire l'honneur de présider le jury de notre mémoire. Et aussi Dr. OUALBANI Rayenne pour avoir accepté l'examen de notre travail, et pour les conseils motivants.

Nous devons passer nos salutations et remerciements à l'équipe du Laboratoire Génie microbologique et Applications département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire pour leur honorable collaboration dans la réalisation de cette étude.

Nihel et Achouak

Dédicaces

Je dédie ce Mémoire à :

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

Mes chères sœurs, source de joie et du bonheur

Toute ma famille, source d'espoir et de motivation

*Tous mes amis et ma chère collègue DJABALLAH
Nihel*

Mon cher superviseur TOUMI Mohammed Es-seddik

Vous chers lecteurs

BENZAOUI Achouak

Je dédie cette mémoire a :

Ma mère bien-aimée et mon cher père, source d'amour, de tendresse et d'inspiration, sont mon véritable soutien sans eux, je n'aurais pas terminé mon parcours universitaire.

Mon grand frère est la Source de motivation et de volonté et mes chères sœurs sont la source du Bonheur et des sourires

Mes chers amis et collègues

Ma chère collègue BENZAOUI Achouak des moments nous ont rapprochés

Mon cher superviseur Dr. TOUMI Mohammed Es-seddik

Mes chers professeurs

Chers lecteurs

DJABELLAH Nihel

Résumé

Résumé :

La flore algérienne des champignons reste inexploitable, une richesse en des espèces médicinales et comestibles a été négligée dans la culture alimentaire et populaire en Algérie, dans la présente étude, nous avons traité deux objectifs : afin de donner une connaissance sur un champignon connu dans le monde par ces propriétés nutritionnelles et thérapeutiques importantes appelée Polypores soufré et dont le nom scientifique est *Laetiporus sulphureus* souche TMES43, ainsi que la purification d'une lectine à partir de la poudre de champignon.

Nous avons utilisé des marqueurs moléculaires pour donner une approche phylogénétique sur sa classification par rapport aux autres champignons de la même famille polypores par les méthodes de bioinformatique.

Le résultat d'alignement et l'analyse phylogénétique par le MEGA 11 des gènes ITS, ont montré que l'espèce étudiée présente une relation parenté avec le champignon *Laetiporus sulphureus* de la Chine (OR250352), la suède (PP455305), de tchèque (EU840554), et les autres taxons du clade 51, qui sont caractérisés par des distances évolutives proches, ce qui nous a montré qu'ils ont le même ancêtre (le même origine ancestrale). Ce clade représente un sous-groupe du clade principale 62, qui ressemble un nombre 29 souches de polypores.

Le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine a montré que le lactose est le sucre inhibiteur sélectif, il a une concentration minimale inhibitrice concentration (MIC) égale à 0,3125 mM, par rapport au galactose, le blocage de l'interaction entre le site de reconnaissance saccharidique CDR de la lectine avec les glycoprotéines membranaires des hématies est assuré par une MIC de 0,625 mM. Une inhibition a été observée par la seule glycoprotéine testé la mucine du porc avec une MIC 2.5 mM. Les autres sucres et glycoprotéines testés n'ont pas inhibé l'agglutination.

Après leur incubation dans de différentes conditions de température, de pH, et d'EDTA (10 mM), la lectine exerce une activité agglutinante maximale et stable dans le milieu à un pH neutre = 7 caractérisée par un titre de 128 UHA, mais au-delà de cette valeur de pH, elle diminue pour s'annuler dans les milieux fortement basiques ou acides.

Mots-clefs : *Laetiporus sulphureus*, ITS, nuc-LSU, phylogénie, lectine, agglutination et affinité.

Abstract

Abstract:

The Algerian flora of mushrooms remains unexplainable, a wealth of medicinal and edible species has been neglected in the food and popular culture in Algeria, in the present study, we have treated two objectives: in order to provide knowledge on a mushroom known in the world by these important nutritional and therapeutic properties called Polypores Sulfur and its scientific name is *Laetiporus sulphureus* strain TMES43, as well as the purification of a lectin from the mushroom powder.

We used molecular markers to provide a phylogenetic approach on its classification compared to other fungi of the same polypore family using bioinformatics methods.

The alignment result and the phylogenetic analysis by MEGA 11 of the ITS genes showed that the species studied presents a related relationship with the mushroom *Laetiporus sulphureus* from China (OR250352), Sweden (PP455305), Czech (EU840554), and the other taxa of clade 51, which are characterized by close evolutionary distances, which showed us that they have the same ancestor (the same ancestral origin). This clade is represented as a subgroup of the main clade 62, which resembles a number 29 polypore strains.

The test for inhibition of the hemagglutination activity of the lectin showed that lactose is the selective inhibitor sugar, it includes a least inhibitory concentration (MIC) rise to 0,3125 mM, compared to galactose, blocking the interaction between the CDR saccharide recognition site of the lectin with the membrane glycoproteins of red blood cells is ensured by a MIC of 0,625 mM. Inhibition was observed by the only glycoprotein tested, pig mucin with a MIC of 2,5 mM. The other sugars and glycoproteins tested did not inhibit agglutination.

After their incubation under different conditions of temperature, pH, and EDTA (10 mM), the lectin exerts a maximum and stable agglutinating activity in the medium at a neutral pH 7 characterized by a titer of 128 UHA, but beyond this pH value, it decreases to zero in strongly basic or acidic environments.

Keywords: *Laetiporus sulphureus*, ITS, nuc-LSU, phylogeny, lectin, agglutination and affinity.

لا تزال نباتات الفطر الجزائري غير قابلة للاستغلال، وقد تم إهمال ثروة من الأنواع الطبية والصالحة للأكل في الغذاء والثقافة الشعبية في الجزائر، وقد تناولنا في هذه الدراسة هدفين: من أجل تقديم المعرفة حول فطر معروف في العالم. من خلال هذه الخصائص الغذائية والعلاجية الهامة التي يطلق عليها اسم *Polypores Sulphur* واسمها العلمي *Laetiporus sulphureus* سلالة TMES43، بالإضافة إلى تنقية مادة اللكتين من مسحوق الفطر.

استخدمنا الواسمات الجزيئية لتوفير نهج تطوري لتصنيفها مقارنة بالفطريات الأخرى من نفس عائلة polypore باستخدام طرق المعلوماتية الحيوية. أظهرت نتيجة المحاذاة والتحليل التطوري بواسطة MEGA 11 لجينات ITS أن الأنواع التي تمت دراستها تمثل علاقة ذات صلة مع فطر *Laetiporus sulphureus* من الصين (OR250352)، والسويد (PP455305)، والتشيكية (EU840554)، والأصناف الأخرى من الفرع الحيوي رقم 51 والتي تتميز بمسافات تطورية متقاربة مما أظهر لنا أن لها نفس السلف (نفس أصل الأجداد). يتم تمثيل هذا الفرع الحيوي كمجموعة فرعية من الفرع الرئيسي 62، والذي يشبه العدد 29 من سلالات متعددة المسام.

أظهر اختبار تثبيط نشاط التراص الدموي للكتين أن اللاكتوز هو السكر المثبط الانتقائي، وله تركيز مثبط أدنى (MIC) يساوي 0.3125 mM، مقارنة بالجالاكتوز، مما يمنع التفاعل بين موقع التعرف على السكريد CDR للكتين. يتم ضمان وجود البروتينات السكرية الغشائية لخلايا الدم الحمراء بواسطة MIC قدره 0.625 mM. وقد لوحظ التثبيط بواسطة البروتين السكري الوحيد الذي تم اختباره، وهو موسين الخنازير الذي يحتوي على MIC قدره 2.5 mM. أما السكريات والبروتينات السكرية الأخرى التي تم اختبارها فلم تمنع التراص.

تم تحضير اللكتين المنقى تحت ظروف مختلفة من درجة الحرارة، ودرجة الحموضة، و EDTA (10 mM). يمارس اللكتين نشاط ترصص أقصى ومستقر في الوسط عند درجة حموضة محايدة 7 ويتميز بعيار UHA 128، ولكن بعد قيمة الرقم الهيدروجيني هذه، فإنه ينخفض إلى الصفر في الإضافة القاعدية أو الحمضية القوية، ويظل نشاط HA مستقرًا في درجات الحرارة المعتدلة 40 إلى 60 درجة مئوية؛ يصل إلى الحد الأقصى للعيار UHA 512، بعد الحضانة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وخارج هذا المجال، انخفض النشاط حتى اختفى عند درجة حرارة 100 درجة مئوية.

الكلمات المفتاحية: *Laetiporus sulphureus*، ITS، nuc-LSU، النشوء والتطور، اللكتين، التراص والألفة.

Liste de figures

Liste des figures

Figure	Légende	Page
1	Champignons de la famille de polypores : a- <i>Polyporus alveolaris</i> , b- <i>Trametes versicolor</i> , c- <i>Laetiporus sulphureus</i> , d- <i>Ganoderma lucidum</i> , e- <i>Plyporus squamosus</i> , f- les pores sous microscope de <i>Polyporus squamosus</i> .	5
2	Champignon <i>Polyporus sulphur</i> (<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bulliard) Murrill (1920)).	6
3	Distribution géographique du champignon Polypores soufré.	8
4	Structure de l'opéron ribosomal des eucaryotes constitue de différents fragments nucléiques utilisés dans l'identification moléculaire et l'étude phylogénétique (Wurzbacher C., <i>et al.</i> , 2019).	13
5	Structure tridimensionnelle d'une nouvelle lectine issue du champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> (PDB : 1W3A) (Mancheno J.M., <i>et al.</i> , 2005).	18
6	Champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> attachée au tronc d'Eucalyptus.	21
7	Test d'hémagglutination (HA) en présence d'un témoin négatif.	28
8	Le procédé de la dialyse.	29
9	Montage utilisé dans la purification de la lectine de champignon polypores soufrés (<i>L. sulphureus</i>).	30
10	Arbre phylogénétique des gènes ITS de différentes espèces de la famille Polypores à une échelle de 0,02 (degré d'évolution).	34
11	Arbre phylogénétique des gènes nuc-LSU de différentes espèces de la famille Polypores à une échelle de 0,02 (degré d'évolution).	35
12	Résultats du test d'agglutination de l'extrait protéique du champignon <i>L. sulphureus</i> .	36
13	Résultat du test d'inhibition de l'hémagglutination.	37

Liste de figures

Suite

Figure	Légende	Page
14	Profil chromatographie échangeuse d'anions de la fraction protéique F 80%.	39
15	Test d'agglutination des pics obtenus après élution par la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions.	40
16	Test limite d'agglutination de différente fraction protéique obtenu durant la procédure d'extraction et purification de la lectine de polypores soufrés.	42
17	Résultat de la limite d'inhibition d'agglutination avec le lactose et le D (+) galactose.	43
18	Effet de la variation de température sur la stabilité de la lectine purifiée.	44
19	Effet de différents milieux pH sur l'activité hémagglutinante de la lectine de <i>L. sulphureus</i> .	44

Liste de tableaux

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Aspects structurels et biologiques de diverses lectines rapportées de champignons comestibles	17
2	Les séquences des gènes ITS et nuc-LSU de l'opéron ribosomique du champignon <i>L. sulphureus</i> souche TMES43	22
3	Taxons inclus dans l'analyse phylogénétique des ITS	24
4	Taxons inclus dans l'analyse phylogénétique des nuc-LSU	25
5	Inhibition de l'activité hémagglutinante de <i>Laetiporus sulphureus</i> souche TMES43 par de différents sucres et glycoprotéines	37
6	Purification de la lectine à partir <i>Laetiporus sulphureus</i>	39
7	Test de la limite de l'inhibition de <i>L. sulphureus</i> avec lactose et D-galactose	41

Liste des abréviations

AAA: Agrocybe aegerita agglutinin

AAL: Agrocybe aegerita lectin

Ac: Acide

AMS: Sulfate d'ammonium

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APL : Auricularia polytricha lectin

ARN: Acide Ribonucléique

BEL: Boletus edulis lectin

BSA: Bovin serum albumine

CDR : Domaine de reconnaissance saccharidique

CML : Cordyceps militaris lectin

DEAE-Sephacel : Diethylaminoethyl-Sephacyl gel

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

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

Fuc: fucose

Gal: galactose

GalNAc: N-acétylgalactosamine

GlcNAc : N-acétylglucosamine

HA : Hémagglutination

IHA : Inhibition de l'hémagglutination

ITS: Internal Transcribed Spacer

KDa: kilo Dalton

Lec : Lectine

Liste des abréviations

LSL : *Laetiporus sulfureus* lectin

Man : Mannose

MIC : Concentration inhibitrice minimale

MOA : *Marasmius oreades* Mannose-recognizing agglutinin

Muc/PSM : Mucine porcine de stroma

MycoDB : Base de données mycologiques

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique

nuc-LSU : Ribosomal Nuclear-Large Subunit gène

nuc-SSU : Ribosomal Nuclear-Small Subunit gène

PBS : Phosphate-buffered saline

PDB : Protein data bank

PM : Poids moléculaire

PPL : *Pleurocybella porrigens* lectin

PSL : *Polyporus squamosus* lectin

PSLec : *Polyporus sulphureus* lectin

RBC : Globule rouges ou Red blood cells

Rpm : Rond par minute

Sac : Activité spécifique (UHA/mg de protéines)

Sommaire

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tables et tableaux

Introduction 1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Biodiversité de champignon Polyporus sulphur

1. Champignons Polypore..... 4

2. Polypores soufré (Polyporus sulphur /Laetiporus sulphureus) 5

2.1. Taxonomie 6

2.2. Description 7

3. Critères d'identification morphologiques (macro et microscopiques)..... 8

3.1. Caractères macroscopiques 8

3.2. Caractères microscopiques..... 9

4. Propriétés nutritionnelles et médicinales 10

5. Etude phylogénétique de polypore soufré..... 11

Chapitre 2 : Lectines de polypore sulphur

1. Lectines 13

2. Biochimie des lectines..... 13

2.1. Site de reconnaissance 14

2.2. Multivalence 14

3. Classification des lectines fongiques 15

Sommaire

3.1. Lectines fongiques réparties des familles des Galectine, R-Type, Jacalin et Monocot Related.....	16
3.2. Famille des lectines type ABL- Like (Fungal Fruiting Bodies)	16
3.3. Famille des Fuc-lectines AAL-like	16
3.4. Famille des Pholiota squarrosa like lectines PhoSL.....	16
4. Propriétés Biochimiques et activités biologiques de certaines lectines des champignons .	17
5. Lectine de polypores soufrés	18
6. Techniques de purification des lectines	18
7. Applications biologiques	19
7.1. Applications immunologiques.....	19
7.2. Traitement et diagnostic du cancer	19

Matériels et méthodes

1. Récolte et préparation de la matière fongique	21
2. Classification phylogénétique du champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> souche TMES43 ...	22
2.1. Analyse évolutive par méthode du maximum de vraisemblance	22
2.1.1. Analyse phylogénétique en fonction des séquences ITS	22
2.1.2. Analyse phylogénétique en fonction des séquences nuc-LSU	24
3. Extraction et purification de la lectine <i>Laetiporus sulphureus</i>	28
3.1.Extraction de protéines totales et évaluation de la présence des lectines	28
3.2. Purification	29
3.2.1. Précipitation des protéines par salting out	29
3.2.2. Dialyse	29
3.2.3. Chromatographie échangeuse d'anion sur colonne de DEAE-Sephacyl.....	30
4. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée	31
4.1. Dosage des protéines	31
4.2. Test limite d'HA et d'inhibition	31
4.3. Évaluation de la stabilité protéique.....	32
5. Analyse statistique	32

Résultats et discussion

1. Etude phylogénétique	34
2. Identification de la présence des lectines	37
2.1. Test d'hémagglutination	37

Sommaire

2.2. Test d'inhibition de l'activité agglutinante	38
3. Purification et caractérisation biochimique	39
3.1. Chromatographie échangeuse d'anions	39
3.2. Tests limites d'agglutination et d'inhibition	42
3.3. Évaluation de la stabilité protéique contre la variation de température et de pH	44

Conclusion

Références

Annexes

Résumé

Introduction

Introduction

Introduction

Les champignons sont en effet des organismes fascinants, avec une grande diversité de formes et de fonctions dans les écosystèmes. Leur classification en tant que règne distinct du monde vivant, aux côtés des plantes, des animaux et des autres groupes, a été une avancée majeure dans la compréhension de la biodiversité.

Leur capacité à former des symbioses avec d'autres organismes, tels que les plantes, est essentielle pour la santé des écosystèmes. Les mycorhizes, par exemple, sont des associations symbiotiques entre les champignons et les racines des plantes, favorisant l'absorption des nutriments du sol par les plantes et offrant en retour des sucres aux champignons.

C'est pourquoi il est important de comprendre leur biologie et leur écologie pour minimiser les risques associés à leur présence, tout en tirant parti de leurs nombreuses applications bénéfiques.

Le champignon de polypores soufré est largement utilisé depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales et leur apport nutritionnel. Ils ont une valeur médicinale et thérapeutique pour le traitement/prévention du cancer, des maladies virales, de l'hypercholestérolémie, de l'agrégation plaquettaire et de l'hypertension. (**Hassan M.A.A., et al., 2015**).

La classification systématique ou taxonomique de ce champignon repose sur les marqueurs phénotypiques, génotypiques et protéomiques, la précision d'identification nécessite la réalisation d'une étude phylogénétique de ces marqueurs (**Chaboud A., 2013**).

L'objectif de la phylogénie moléculaire est de reconstituer les liens de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'oxydes aminés. Il est donc possible d'analyser les liens de parenté entre les espèces qui les portent, ainsi que l'évolution du génome. On peut notamment évaluer l'importance relative des duplications et des transferts horizontaux de gènes pour chaque famille multigénique. La fiabilité des techniques de reconstruction phylogénétique est conditionnée par la connaissance des mécanismes d'évolution des séquences, un domaine qui a connu une évolution considérable au cours des dernières années. Cela a conduit à une perception de l'arbre universel du vivant de plus en plus précise (**Lopez P., et al., 2002**).

Introduction

Dans le domaine biomédical, les lectines sont étudiées pour leur potentiel dans diverses applications, y compris dans la lecture du langage saccharidique. Comprendre comment les sucres sont disposés à la surface des cellules et comment les lectines interagissent avec eux peut fournir des informations précieuses sur les processus biologiques, notamment dans le contexte des maladies.

D'un autre côté, certaines lectines peuvent être toxiques ou avoir des effets indésirables sur l'organisme, en particulier lorsqu'elles sont consommées en grande quantité dans l'alimentation. Par exemple, certaines plantes contiennent des lectines toxiques qui peuvent provoquer des symptômes gastro-intestinaux ou d'autres problèmes de santé chez les animaux et l'homme. (Lam S.K, et TB Ng., 2011).

Les lectines d'origine fongiques essentiellement chez les champignons macroscopiques précisément les polypores soufrés ont été isolés, purifiée partiellement et caractérisée dans le but de cette étude. Cette étude se concentrait sur les différentes techniques de purification des protéines, telles que la centrifugation et La chromatographie sur colonne : techniques. La pureté de la lectine a été évaluée à l'aide de la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

La présente étude a pour objectifs de :

- Réaliser une étude phylogénétique du champignon polypores soufré d'Algérie (*Laetiporus sulphureus* souche TMES43).
- Extraire et caractériser de la lectine de ce champignon.

Chapitre 1 : Biodiversité du champignon

Polyporus sulphur

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

1. Champignons Polypores

Les polypores font partie d'un vaste groupe de champignons terrestres appartenant au phylum « Basidiomycota » (Jordan, 2004). Ils sont généralement abondants en Amérique du Nord, en Europe et en Asie également. L'expression « polypore » signifie « plusieurs pores » qui se trouvent sous le capuchon, et ces pores sont très petits et minuscules. La majorité sont de forme allongée ou coriace (même si certains sont mous et charnus) et le rendent indéfectible. Certains champignons polypores sont annuels, tandis que d'autres sont permanents, ajoutant de nouvelles couches chaque année.

Les polypores sont considérés comme des champignons saprophytes (figure 1), en décomposant les matières mortes et libèrent les nutriments dans l'écosystème afin qu'ils puissent être réutilisés par d'autres organismes vivants ou parasites, ou bien des animaux vivants (Susan et Van, 1992, Darwana D., et al., 2019). Les polypores sont beaucoup plus variés dans les anciennes forêts naturelles avec une abondance de bois morts que dans les jeunes forêts ou plantations.

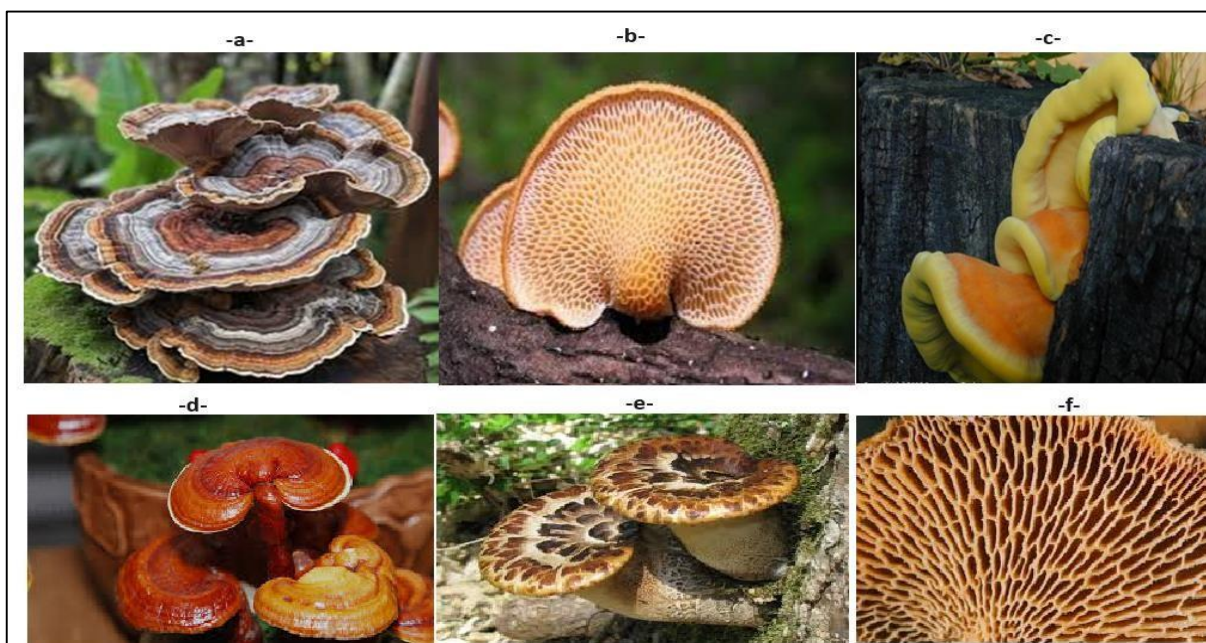


Figure 1 : Champignons de la famille de polypores : a - *Polyporus alveolaris* , b - *Trametes versicolor*, c- *Laetiporus sulphureus*, d- *Ganoderma lucidum*, e- *Plyporus squamosus*, f- les pores sous microscope de *Polyporus squamosus*. (Source site web : <https://www.alamy.com/stock-photo/polypores.html?sortBy=relevant>. Consulté le 04/06/2024.

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

Toutefois, ces structures représentent une petite partie du champignon. Le corps principal est composé de mycélium qui pousse au sein d'arbres ou de bois morts, provoquant la décomposition. Polypores jouent un rôle essentiel dans l'environnement car ils jouent un rôle essentiel dans le recyclage du carbone et d'autres nutriments pour leur réutilisation par la prochaine génération des arbres et d'autres organismes (Mary L., et al 2019-2018).

2. Polypores soufré (*Polyporus sulphur*/ *Laetiporus sulphureus*)

Il s'agit d'une espèce saprophyte de la famille des polypores qui pousse chaque année sur le bois vivant ou mort, souvent sur les arbres d'Eucalyptus. Sa dénomination vulgaire en anglais est « Poulet des bois », célèbre en Europe et en Amérique (Eyssartier G. et Roux P., 2017). Cette espèce est comestible et médicinale, selon les références bibliographiques de la base de données mycologiques MycoDB (www.mycodb.fr).

Selon Khataua S., et al. (2017), elle est considérée comme rare en Afrique et présente une excellente qualité nutritionnelle. Sa comestibilité est réputée, à condition de respecter les recommandations de cuisson régulières, car elle peut entraîner des intoxications ou des allergies parfois sévères (Ian R.H., et al., 2003).



Figure 2 : Champignon *Polyporus sulphur* (*Laetiporus sulphureus* (Bulliard) Murrill (1920))
Image source la base de données mycologiques (MycoDB sur le site web : <https://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=Laetiporus&espece=sulphureus&numphoto=11&source=search&filter=&numfiche=0>).

2.1. Taxonomie (Courtecuisse et Welti., 2013)

Classification hiérarchique :

- Domaine : *Biota Endl.*
- Règne : *Fungi (Moore R.T., 1980)*
- Sous-Règne : Dikarya Hibbett, T.Y. James & Vilgalys, 2007
- Phylum : *Basidiomycota*
- Ordre : *Polyporales*
- Famille : *Polyporaceae F*
- Genre : *Laetiporus Murrill*
- Espèce : *Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill*
- Forme : *Laetiporus sulphureus f. imbricatus (Fr.) Bondarzew.*

2.2. Description

Sa couleur jaune à rose éclatante lui permet de se répartir facilement dans les forêts. Ce champignon se compose souvent d'une imbrication massive d'une largeur de 50 cm de consoles en forme d'éventail posées directement sur un support. On observe une surface rugueuse voire noduleuse, souvent avec une zone concentrique, qui devient pâle en séchant. Elle a une chair épaisse de 1 à 5 cm, d'un blanc uniforme, tendre et charnu. L'hyménium présente de petits pores, d'un jaune intense, avec une forme irrégulièrement arrondie et des pores de 3 à 5 mm de diamètre (MycDB, Petrović J., *et al.*, 2013).

Le chapeau possède une teinte jaune-rose vif, et caractérisé par des bordures jaunes plus brillantes. Il est composé d'un ensemble de consoles qui ressemblent à des éventails empilés les unes entre les autres. Il s'accroche directement à sa base ou à un pied mince. Il a une surface un peu rugueuse et peut être orné de petites taches.

- Espèces similaires : On peut l'associer au polypore géant (*Meripilus giganteus*).
- Temps d'observation : Entre avril et novembre.

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

- Biologie et éthologie : Le polypore soufré se développe sur des arbres de feuillus (plus rarement résineux) qui sont vivants ou morts.
- Distribution géographique : il est signalé dans Nouvelle-Calédonie et la France l'Amérique du nord, Asie et le sud d'Afrique (**figure 3**) (**Darwana D., et al., 2019**).
- Mode de croissance : il est souvent solitaire ou en groupe de plusieurs chapeaux ± compacts, imbriqués serrés, fusionnés latéralement, parfois en rosette.
- Substrat et type de carie

Il se croit sur les feuillus, le chêne rouge et le frêne d'Amérique, mais parfois dans d'autres feuillus, bouleau, cerisier tardif, érable, frêne noir, noyer, orme, robinier faux-acacia et saule. Les troncs d'arbres vivants, les chicots, les souches, les arbres renversés et les pôles utilitaires. Les agents de carie brune cubique présentent une majorité de feutrages mycéliens blancs dans les craquelures de rétraction du bois pourri de : Castanea, Eucalyptus, Fraxinus, Gleditsia, Juglans, Malus, Prunus, Pyrus, Quercus, Robinia, Salix, Ulmus.

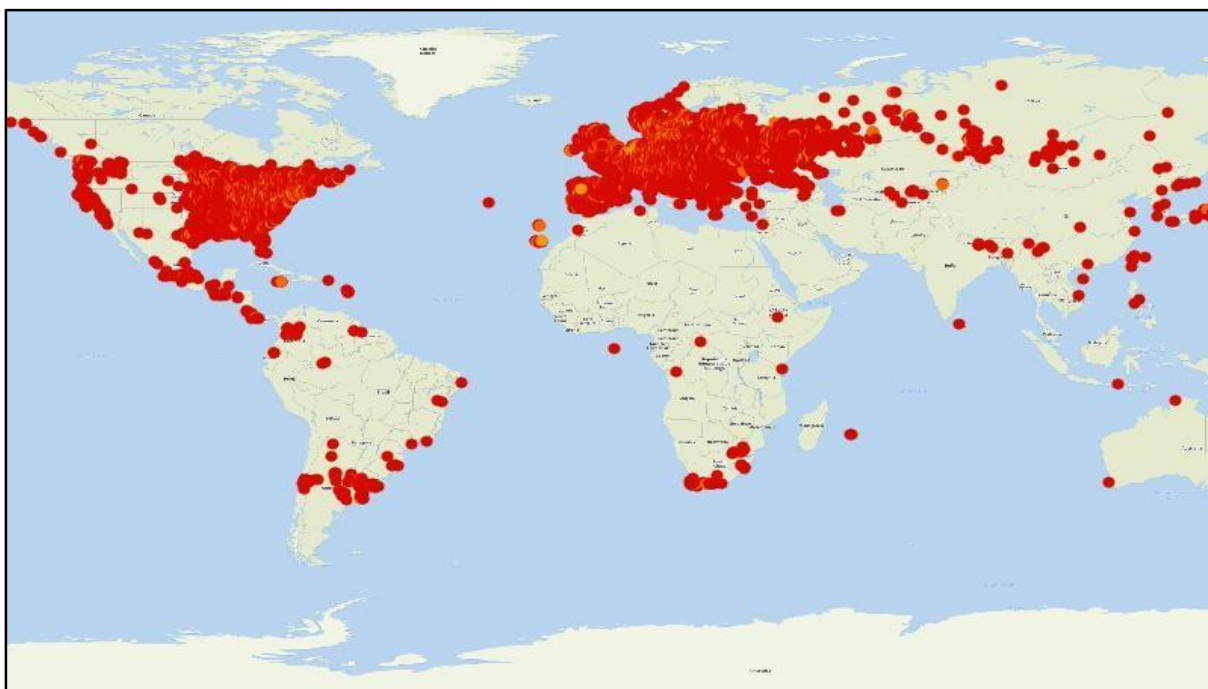


Figure 3 : Distribution géographique du champignon Polypores soufré. (Image source l'Inventaire national du patrimoine naturel (INPN) disponible sur le site web : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/43216/tab/carte).

3. Les critères d'identification morphologiques (macro et microscopiques)

Afin de classer un champignon, il est nécessaire de le reconnaître les clés mycologiques utilisées dans l'identification qui se reposent sur l'analyse des caractéristiques à l'échelle : macroscopique, organoleptique, à des fins environnementales et sur des dimensions microscopiques. L'identification de Polypores soufré dépend de plusieurs critères morphologiques (**GINNS J., 2017 ; GILBERTSON R.L., et RYVARDEN L., 1986 ; BOULET B., 2003**).

3.1. Caractères macroscopiques

- Le basidiome : est Annuel, piléé, avec ou sans base atténuée latérale, assez bien adné, jusqu'à 90 cm de diamètre.
- Le chapeau : est de 5 jusqu'à 20 cm en surplomb, 5-25 cm de largeur, 0,5-3 cm d'épaisseur vers la base, incliné, sessile, semi-circulaire, dimidié, attaché sur toute sa largeur, spatulé, pétaloïde, flabelliforme à irrégulier, plus au moins convexe-étalé, légèrement bosselé à inégal, lisse à finement plissé radialement et rugueux, sec, suédine, puis glabre avec l'âge, non à légèrement zoné, jaune à orange vif au frais,

Il est souvent jaune orangé et jaune luisant à terne vers la marge, jaunâtre terne et éventuellement presque blanc après la maturation, à marge arrondie à obtuse puis aiguë, ondulée, souvent lobée, stérile ou fertile au-dessous, d'aspect mucilagineux, mais fugace avec l'âge, Orange pâle, plus éclatante avec le temps et à sec

- Les pores : ont une forme ronde, régulière et partiellement échancrés au début, plus anguleux avec l'âge, 2-4 par mm, à dissépinements minces et entiers, vite lacérés
- La face poroïde : possède une couleur jaune vif à terne, pâissant avec l'âge, rarement blanche, immuable au froissement, exsudant des gouttelettes sucrées en croissance active qui attirent les insectes et facilitent la dispersion des spores.
- La couche de tubes : est distincte, décurrente, concolore à la face poroïde, puis jaunâtre terne, 1-5 mm de longueur.
- Le pied : Absent, mais avec ou sans base atténuée latérale concolore au chapeau.

3.2. Caractères microscopiques

- Les spores : Leur forme est principalement ovoïde à ellipsoïde, lisse, avec une paroi mince, hyaline, inactive dans le Melzer, mesurant 5,5-7 x (3,5) 4-5 μm .
- Piriformes, à paroi mince, hyalines, avec 4 stérigmates, non renforcées à la base, de dimensions 15 x 7,5 μm .
- Cystides et autres éléments hyménaux stériles sont absents.
- Boucles : sont absentes.

4. Propriétés nutritionnelles et médicinales

Sur la base du poids sec (PS), les fructifications des champignons renferment environ 56,8 % de glucides, 25 % de protéines, 12,5 % de cendres, 11 % de fibres et 5,7 % de matières grasses. D'après les recommandations quotidiennes (AJR), il est recommandé de consommer en moyenne 300 g de glucides, 50 g de protéines, 65 g de matières grasses totales et 25 g de fibres alimentaires pour satisfaire les besoins nutritionnels de près de toutes les personnes en bonne santé.

Selon **Khatua S., et al., 2017**, le champignon *L. sulphureus* contient une richesse nutritionnelle très importante qui se caractérise par :

- ✓ Énergie (kcal/100 g PS : Serbie du Nord (375,62), Région de la mer Noire (Turquie) (360)
- ✓ Taux d'humidité : 80 à 90 % d'eau et 10 à 20 % de matière sèche.
- ✓ Glucides : 64,9 à 74,47 g/100 g PS
- ✓ Protéines : 10,61 à 21 g/100 g PS
- ✓ Graisses : 0,23 à 2,96 g/100 g PS
- ✓ Fibres : 7,157% à 4,12% PS
- ✓ Cendres : 9,03 à 3,956 g /100 g PS

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

- ✓ Minéraux : Les macros (calcium, phosphore, sodium, chlore) et les micros (fer, cuivre, cobalt, potassium, magnésium, iode, zinc, manganèse, fluor, chrome, sélénium, soufre) sont des minéraux. Comme son appellation l'indique, les macrominéraux sont indispensables en plus grande quantité (> 100 mg/dl) et les microminéraux sont suffisants en moins grande quantité (<100 mg/dl).
- ✓ Vitamines : comme les vitamines B, E et D.
- ✓ Acides organiques : Ac malique, Ac ascorbique, Ac citrique, Ac tartrique, Ac oxalique et Ac fumarique

Ce champignon comestible est devenu indispensable dans les cuisines tribales, en particulier en raison de son goût. En outre, il revêt une importance équivalente dans la médecine traditionnelle, car il est couramment employé pour traiter les maladies pyrétiques, la toux, le cancer gastrique et les rhumatismes, c'est une bio-source naturelle de stockage des nutriments et des molécules thérapeutiques et, par conséquent, devient de plus en plus appréciée (**Khatua S., et al., 2017**).

Il possède des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, et induit un effet hypoglycémiant, des activités anti-inflammatoires et cytotoxiques (**Sułkowska-Ziaja K., et al., 2018**).

5. Etude phylogénétiques de polypore soufré

L'étude phylogénétique des espèces se base essentiellement sur l'étude de degrés d'évolution en utilisant les séquences nucléotidiques ou protéiques. Elle établit les relations de parenté entre diverses créatures vivantes. Au cours des 20 dernières années, des méthodes moléculaires telles que la PCR et le séquençage ont été développés, et ont abouti à la réalisation d'un grand nombre de séquences d'ADN. L'emploi de ces séquences permet d'apprécier la classification systématique. Les marqueurs moléculaires les plus couramment employés pour la phylogénie moléculaire des champignons et les classifications qui en découlent seront exposés dans cette section. (**Chaboud A., 2013**).

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

La comparaison se base sur les résultats d'alignement multiple, et des méthodes spécifiques dans la construction des arbres phylogénétique par des logiciels puissants comme le MEGA, l'Algorithme ClustalW, la méthode UPGM, la méthode de la vraisemblance selon le modèle de Tamura-Nei (**Lopez P., et al., 2002**).

Les marqueurs moléculaires utilisés sont les gènes, ou séquences intergéniques, présents sur le génome nucléaire ou mitochondrial. Le plus souvent utilise les séquences consensus des ARN ribosomiques.

Il existe trois gènes qui codent les ARN ribosomiques, et dans le cas des champignons, ces gènes comprennent :

Les séquences IGS (Inter Genic Spacer) sont utilisées pour organiser ces gènes en clusters d'unités répétées. Dans chaque unité, les séquences ITS1 (Internal Transcribed Spacer) séparent les gènes 18 S et 5,8 S, tandis que les séquences ITS2 séparent les gènes 5,8S et 25S. (**Adrien Chaboud., 2013**)

La région d'ADN la plus fréquemment employée pour la phylogénie des champignons est la séquence ITS. Plus de 150000 séquences d'ITS fongiques sont mentionnées dans le domaine. Les bases de données (**Damon et al., 2010**).

Les régions ITS1, ITS2 et le gène 5,8S font partie de la séquence ITS. Il est de 600 à 700 pb de taille (**Carriconde et al, 2008**). On a décrit plusieurs amorces particulières, telles que les amorces ITS1F et ITS4 (Gardes et Bruns, 1993) qui permettent d'augmenter sélectivement les séquences fongiques La région ITS est largement utilisée pour la caractérisation moléculaire des espèces fongiques en raison de sa grande variation par rapport aux gènes nuc-LSU et nuc-SSU.

Le gène qui encode l'ARN ribosomique 18 S qui forme la petite sous-unité du ribosome (40 S), également connue sous le nom de nuc-SSU (nuclear-Small Subunit).

En ce qui concerne le gène nuc-SSU, il n'y a généralement que les parties liées aux amorces PNS1 et NS41 qui produisent une séquence (Hibbett et Binder, 2003), de taille de 1150 pb sont employés dans le domaine de la phylogénie.

Les gènes qui encodent les ARNr 5S, 5,8S et 25S font partie de la grande sous-unité (60 S) du ribosome, également connue sous le nom de nuc-LSU (nuclear-large subunit).

Biodiversité de champignon *Polyporus sulphur*

La séquence partielle du gène utilisée pour la phylogénie correspond à la partie 5', Comprend les 600 à 900 premières bases des trois domaines variables V1, V2 et V3 (Michot *et al.*, 1984, 1990). C'est la partie la plus informative du gène nuc-LSU Phylogénie (Hillis et Bull., 1993 ; Kuzoff *et al.*, 1998 ; Hopple et Vilgalys., 1999).

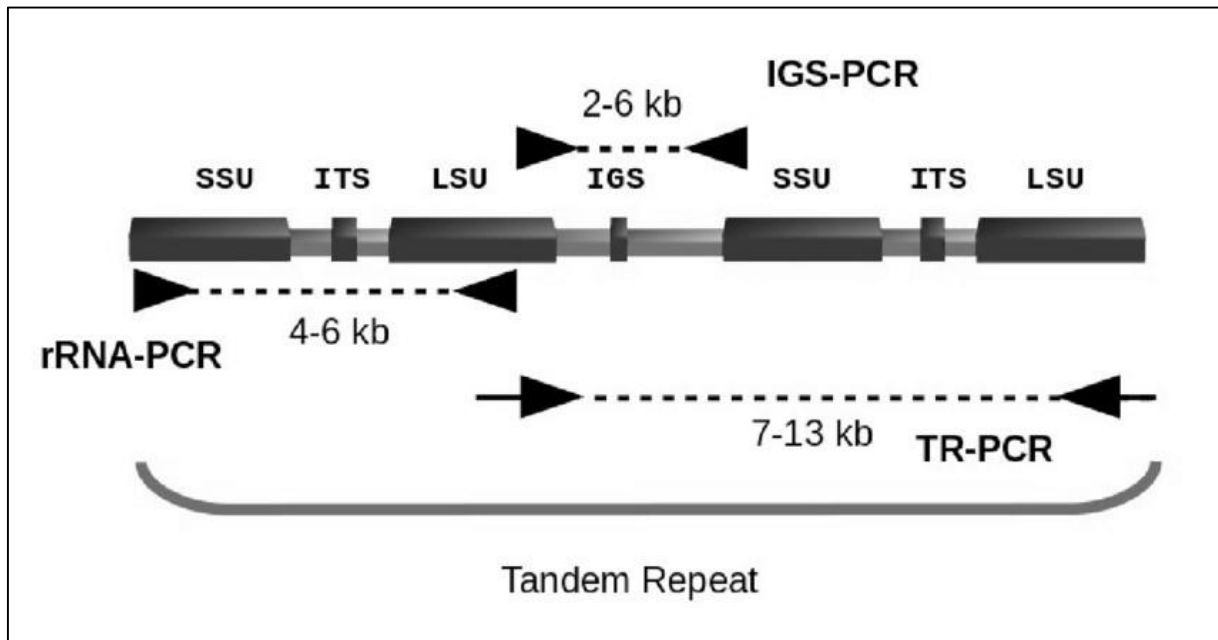


Figure 4 : Structure de l'opéron ribosomal des eucaryotes constitue de différents fragments nucléiques utilisés dans l'identification moléculaire et l'étude phylogénétique (Wurzbacher C., *et al.*, 2019).

Chapitre 2 : Les lectines de *Polypores* *sulphur*

1. Lectines

Le terme « lectine » a été introduit par Boyd et Shapleigh en 1954, vient du verbe latin « légère », signifiant « choisir » ou « sélectionner » (**Boyd W.C. et Shapleigh E., 1954**) à toutes protéines qui interagissent spécifiquement et réversiblement avec les sucres (mono/oligosaccharides).

Selon la définition du généticien Goldstein, les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine non immune et ubiquitaires dans le monde vivant, elles sont connues par leurs interactions spécifiques et réversibles aux sucres portés dans la membrane cellulaire et avec les glycoconjugués, sans induire une modification catalytique sur leurs ligands, ce qui conduisant ensuite vers l'activation ou la désactivation ainsi une de plusieurs processus biologiques (**Lis H. et Sharon N., 1998**).

Les lectines ont le pouvoir de créer plusieurs liaisons avec leurs ligands exposés dans la membrane cellulaire, ce qui aboutit au phénomène d'agglutination cellulaires et à la précipitation des glycoconjugués. Elles sont aussi nommées agglutinines à cause de ce phénomène, qui est la clé de leur détection dans les extraits protéiques, en utilisant un test d'agglutination des globules rouges en fonction de la spécificité du sucre (**Lam S.K, et TB Ng., 2011**).

Les protéines lectines comportent au moins un domaine de liaison aux glucides, ce qui permet de les distinguer en trois principaux types : les merolectines, les hololectines et les chimerolectines (**Peumans et Van Damme, 1995**). Elles jouent un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques, notamment la reconnaissance cellule-cellule, la défense immunitaire, la fécondation, les métastases, l'embryogenèse, la stimulation mitogène et le trafic de protéines (**Surya et Haridas, 2018**).

2. Biochimie des lectines

La biochimie des lectines a révélé qu'elles comportent un ou deux domaines peptidiques abritant le site de reconnaissance et d'interaction spécifique avec les mono ou oligosaccharides (CDR). Ces domaines sont capables de décoder l'information encodée par les sucres, qu'ils soient libres ou liés aux lipides ou aux protéines cytoplasmiques et membranaires (**Hans J.G., et al., 2011** ;

André S., et al., 2015). Dépend de l'affinité saccharidique et du type de liaison. Les études structurales des lectines ont révèlé qu'elles présentent une diversité structurale primaire en raison de l'évolution de leurs gènes (**Gorelik E., et al., 2001**).

2.1. Site de reconnaissance

Les lectines reconnaissent et interagissent avec les sucres à travers les acides aminés présents dans les CDR, formant une cavité ou une dépression sur la surface de la protéine distincte de celles spécifiques aux oligosaccharides. Cette région est accessible favorisant ainsi une grande complémentarité avec le ligand (**Sharon N et Lis H, 1993**).

En général, une ou deux extrémités du sucre peuvent se lier avec les acides aminés des CDR. La conformation de cette zone ne change que légèrement après l'interaction et les sites dans même famille de lectines sont similaires, mais varient considérablement d'une famille à l'autre même si la spécificité reste la même. L'interaction est maintenue par des liaisons chimiques similaires à d'autres interactions protéine –ligand.

2.2. Multivalence

Les lectines sont des protéines multivalentes en raison de leur structure chimique, notamment grâce à la présence de multiples région de reconnaissances spécifique (CDR) même si un monomère (ou un dimère ou trimère) peut se lier à un monosaccharide avec faible affinité, la présence de plusieurs CDR pour le même ligand renforce considérablement l'interaction.

La multivalence peut résulter de la répétition en tandem des CDR dans un polypeptide ; de l'association de plusieurs monomères ou l'exposition de plusieurs lectines à la surface de la membrane cellulaire (**Van Kooyk et Rabinovich, 2008**).

Généralement les systèmes biologiques privilégient des interactions faibles mais multivalentes plutôt qu'une seule interaction forte. Ces interactions peuvent également garantir une spécificité et une affinité élevées entre les récepteurs et les surfaces cellulaires (**Lee r.t. et Lee y.c., 1995**).

3. Classification des lectines fongiques

Différents bases de données spécifiques sont disponibles : la base de données interactive UniLectin (<https://www.unilectin.eu>) et la base de données 3D Lectin qui fournissent les séquences peptidiques de milliers de lectines et leurs structures en 3D (<http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/search.php?type=lectin>). D'après des données biologiques, les lectines ont été réparties en 48 familles (Fujimoto *et al.*, 2014). Les lectines fongiques a été dérivées en galectines, en lectines de type Ricin B Domain like (R type), en lectine de type Jacalin et monocote- like comme celles des animaux et végétaux. Cependant d'autres lectines fongiques ne sont pas incluses dans cette classification en raison de leur absence de similarité structurale et de leur séquence peptidique avec les autres familles.

3.1. Lectines fongiques réparties des familles des Galectine, R-Type, Jacalin et Monocot Related

La classification des lectines fongiques est moins claire que celle des lectines végétales et animales. Généralement les séquences en acides aminées sont utilisées pour établir les liens évolutifs et attribuer la réactivité de ces composés. Cependant les lectines fongiques ne sont pas classées avec les lectines des animaux ou des végétaux de la même famille.

Par exemple, les lectines d'*A. aegeria* (AAA et ACG) sont classées comme des lectines et considérées comme galectines en raison de leur présence d'un ou plusieurs domaines structuraux et de leur spécificité pour les B galactosides et les Lac/LacNAc. Les molécules purifiées de *Pleurocybella porrigens* (PPL), *Polyporus squamosus* (PSL) et *Marasmius oreades* (MOA) sont classées dans la famille des lectines de type Ricin.

D'autres lectines ayant une affinité pour le Gal et ces dérivés n'ont pas incluses dans cette famille car elles n'ont pas de structure bien définie et l'absence de l'homologie de séquence. Les lectines de la famille Jacalin-Related comme HRL et GFL possèdent un CDR spécifique pour le Man et Mucine de stroma porcine PSM respectivement, la lectine MOL de *Marasmius oreades* spécifique pour le Man appartient à la famille monocot related lectin.

3.2. Famille des lectines type ABL- Like (Fungal Fruiting Bodies)

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

3.3. Famille des Fuc-lectines AAL-like

Cette famille regroupe les agglutinines ayant une spécificité et une affinité pour les glycanes fucosylées avec une similarité structurale a la lectine d'*Aleuria aurantia* qu'elle se compose d'un dimère dans chaque monomère étant organisé en une hélice à six pales (hélices) β et une petite feuille antiparallèle à deux brins β . Où le pli de l'hélice β est important pour la reconnaissance de fucose, et les cinq sites de fixation situés dans les pales d'hélice, la petite feuille β comprend la séquence responsable de la désertisation de la lectine, Elle regroupe les lectines des micromycètes AFL (fungous, *Aspergillus fumigatus*) et AOL (fungous, *Aspergillus oryzae*) ; l'AAL.

3.4. Famille des *Pholiota squarrosa* like lectines PhoSL

Cette famille comprend des molécules d'origine fongique telles que des Strophariaceae, elle est caractérisée par une structure multimérique ou les unités sont assemblées par des liens non covalents, comme chez *Pholiota squarrosa* qui produit une lectine trimérique de 40 aa spécifique pour la séquence saccharidique Fuc-1-6GlcNAc.

Cette structure permet une forte agglutination cellulaire et une précipitation des glycoconjugués similaire à l'interaction Ag-Ac. Cette lectine peut être un outil précieux pour l'étude des glycoconjugués et le diagnostic médical des changements anormaux des glycanes membranaires (**Kobayashi et Kawagishi, 2014**).

4. Propriétés Biochimiques et activités biologiques de certaines lectines des champignons

Le tableau 1 présente quelques lectines purifiées des basidiomycètes et leurs propriétés.

Tableau 1 : Aspects structurels et biologiques de diverses lectines rapportées de champignons comestibles

Lectine	Structure	Spécificité /affinité	Propriétés biologiques	Références
<i>Cordyceps militaris</i> Lectin (CML)	Monomérique	Acide sialique et sialoglycoprotéines membranaires	Activité mitogénique des cellules spléniques	Jung et al., 2007
<i>Agrocybe aegerita</i> lectin (AAL)	Homodémérique 15,8 KDa	la glycophorine A, κ -caséine, la PSM, les β -galactosides, GlcNAc et Lac-BSM	Anti tumorale Induit l'apoptose	Yang et al., 2005 Zhao et al., 2011 Sun et al., 2003 Ren et al., 2013
<i>Leatiporus sulphureus</i> Lectin (LSP)	Hexamérique 35KDa/ sous unité	Lactose/ Nacétyllactosamine	Hémolytiques et Homologue aux toxines bactériennes	Konska et al., 1994 Mancheno et al., 2005 Tateno et al., 2003

5. Lectine de polypores soufrés

Ce champignon produit des lectines hémolytiques toxiques :

La lectine LSL (*L. sulphureus* lectin) est un tétramère d'environ 190 KDa (figure 5) avec des sous-unités de 36 et 60 KDa présentant des similitudes structurelles marquées avec des toxines bactériennes telles que la toxine MTX2 produite par *Bacillus sphaericus* pour lutter contre les moustiques, ainsi que la toxine alpha de *Clostridium septicum* (Tateno et Goldstein, 2003).

La lectine PSLeC constitue de structure homotétraédrique de PM supérieur à 140 purifiée par Toumi et al., 2021, elle a une activité cytotoxique contre les cellules tumorales et les cellules seins.



Figure 5 : Structure tridimensionnelle d'une nouvelle lectine issue du *champignon Laetiporus sulphureus* (PDB : 1W3A) (Mancheno et al., 2005).

6. Techniques de purification des lectines

La purification des lectines de polypore soufré implique l'utilisation de méthodes physiques, mécaniques et chimiques, suivies de diverses techniques chromatographiques utilisant différentes résines conventionnelles, comme : la chromatographie échangeuse d'ions utilisant les résines telles que DEAE-CM, QAE-Sephadex et Tyoperal qui sont fréquemment employées dans ce processus (Zhao et al., 2009). De plus, la séparation par l'hydrophobie sur la

chromatographie d'interactions hydrophobes avec le phenyl-sepharose comme support (Guillot *et al.*, 1997).

Des nouvelles méthodes de purification de haute performance ont également été adoptées : HPLC, le clonage des gènes codant pour ces protéines, ainsi que la purification par chromatographie d'affinité utilisant des étiquettes histidine (His-tag) et du nickel (Zurga *et al.*, 2014).

7. Applications biologiques

De nombreuses applications ont été marquées de ces biomolécules dans les domaines thérapeutiques et biotechnologiques, parmi les applications on cite :

7.1. Applications immunologiques

Plusieurs lectines ont été testées *in vitro* sur les cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophage, neutrophiles) et ont démontré leur capacité à stimuler et à recruter ces cellules en interagissant avec les glycanes présent sur leurs membranes. Elles peuvent activer une réponse immunitaire indirecte via la signalisation intracellulaire grâce à des messagers secondaires qui déclenchent après leur interaction avec les récepteurs spécifiques glycosylés des cellules immunitaires.

Dans le cas d'un déficit immunitaire comme la mitogènes et la prolifération lymphocytaire (Van Kooyk et Rabinovich, 2008), les lectines peuvent agir comme des stimulateurs de la division cellulaire. Par exemple : la lectine extraite des graines *d'artocarpus lingnanensis* favorise la prolifération des lymphocytes T en activant la voie de la tyrosine kinase/phosphorylase liée au récepteur CD45 (Cui *et al.* , 2017).

7.2. Traitement et diagnostic du cancer

La croissance des tumeurs cancéreuses nécessite un apport élevé en nutriments et en énergie pour se répandre dans tout le corps, ce qui est obtenu par la dégradation des sucres, lipides et protéines. Les agglutinines limitent la croissance et induisent la mort des cellules cancéreuses par divers mécanismes notamment l'autophagie et l'apoptose.

Chapitre 2 : les lectines de *Polypores sulphur*

En interagissant avec les glycanes présents sur les cellules cancéreuses ; les lectines déclenchent une série de signaux qui activent les voies des caspases 8 et 3 et se lient au récepteur membranaire de la mort cellulaire « FasR » (**Lichtenstein *et* Rabinovich, 2013**).

Étant donné la forte expression de glycoprotéines sur les membranes des cellules cancéreuses et l'affinité plus élevée de leur interaction avec les lectines par rapport aux cellules normales ces dernières peuvent être utilisées dans des kits médicaux de détection du cancer (**Dan *et al.*, 2015**).

Matériels et méthodes

1. Récolte et préparation de la matière fongique

Notre travail a été effectué sur le champignon saprophyte macroscopique *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 dans laboratoire de " Génie Microbiologique et Applications (LGMA)" du Biopôle Université des frères Mentouri de Constantine-Algérie.

Laetiporus sulphureus (figure 6) est un champignon comestible de couleur jaune vif ou orange avec une texture tendre que l'on trouve dans les forêts riches en conifères et feuillus, la cueillette est effectuée en décembre 2023, au niveau de la route nationale N° 5 liée les deux villes OUED ATHMANIA et AIN SMARA avec les coordonnées géographiques suivantes : 36°14'56.3"N 6°26'38.7"E.

L'identification du champignon est réalisée par Dr. TOUMI Mohammed Es-seddik et le Dr. KEBAILI Fethi Farouk en la collaboration avec Dr PABLO Alvarado (ALVALAB-Espagne). L'échantillon collecté est lavé par l'eau distillée ensuite coupé en des petits morceaux et séché à l'abri de la lumière à une température ambiante 25°C. À la fin un broyage avec l'azote liquide est appliqué jusqu'à l'obtention d'une poudre fine utilisée dans l'extraction.



Figure 6 : Champignon *Laetiporus sulphureus* attachée au tronc d'Eucalyptus.

2. Classification phylogénétique du champignon *Laetiporus sulphureus* souche TMES43

D'après des études précédentes (Khatua S., *et al.*, 2017), L'espèce *Laetiporus sulphureus* reste non signalé au niveau du Nord d'Afrique et au niveau de l'Algérie, Elle est connue pour sa comestibilité à conditions de bien suivre les conseils réguliers de cuisson elle peut provoquer des intoxications ou des allergies parfois graves (Ian R.H., *et al.*, 2003).

Dans la présente étude, nous avons utilisé deux marqueurs moléculaires qui sont respectivement les séquences consensus des gènes : ITS (séquence interne du transcrit), et nuLSU (grande sous unité ribosomique 28s ou 25s) obtenues précédemment par **TOUMI M.E.S., *et al.*, 2020** (Id Genbank : MT550648, MT552980 ; tableau 2), pour étudier la classification phylogénétique, après l'alignement multiple utilisant l'algorithme ClustalW attribuée dans le logiciel MEGA 11.

Le choix des séquences est effectué après la recherche des séquences identique ou similaires avec nos séquences par l'application BLAST nucléotide sur GenBank. Les séquences sont représentées avec le code d'accession dans les arbres phylogénétiques et le nom d'espèce qui correspond.

2.1. Analyse évolutive par méthode du maximum de vraisemblance

2.1.1. Analyse phylogénétique en fonction des séquences ITS

L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle Tamura-Nei (**Tamura K et Nei M, 1993**). L'arbre avec la probabilité logarithmique la plus élevée (log likelihood= -2195.49) est affiché. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ à une matrice de distances par paires estimées à l'aide du modèle Tamura-Nei, puis en sélectionnant la topologie avec une valeur de vraisemblance log supérieure. La proportion de sites où au moins 1 base non ambiguë est présente dans au moins 1 séquence pour chaque clade descendant est indiquée à côté de chaque nœud interne de l'arborescence.

Cette analyse impliquait 32 séquences nucléotidiques du gène ITS (Tableau 3). Il y avait un total de 703 positions dans l'ensemble des données finales. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA11 (**Tamura K., *et al.*, 2021**).

Matériels et Méthodes

Tableau 2 : Les séquences des gènes ITS et nuc-LSU de l'opéron ribosomique du champignon *L. sulphureus* souche TMES43.

Gène	Séquence	Id GenBank	Taille (pb)
ITS	ACCTACCTGATTTCTGAAGTCAGAGGTCAGAGATGT TTCGTCCGAAGACAAAGCTTGAACCGTTCAACGAC GGACCCTTCAGTCGACGGTGACTTTCTATCACGTCC ACTCGGTCGGTCAGGTCCAAGCTTTACTATGCATTC AAGAGGAGCCGAACGCGCGTCCGGCAACCTCCAAA ATCCAACCGACGCTCATCCGCAAAGATGGCAAGGG TTGAGAGTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCT CGGAATGCCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGAT TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATACTT ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGC CAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTATATTACGATGC GTTACAACGCGTAAGACATTCCGATATACATTCTG AAGTTTGTGTAAGAAAGCGAGGCTACGAATCCTGG GCGGTCGCCCACCCACTCAACGAGCCGGGCTTCG ATGTGCACGGGGTGTGTTTGTGGACAAGGGGCGA GGCCCCGTTGTTTCGTTAATGATCCTTCCGCATGTT ACCTACGGAAACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCA ATTGACCAAGCATTCTTACTTCTCTAATTGACCAA GAAA	MT550648	642
Nuc-LSU	AAGAAGGGTGAGATCCCGTCCATGACACGGACCGC CGGCGGTTTGTGATGCGCTCTCAAAGAGTCGAGTT GTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTC CATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGC GAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACT TTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTG AAAGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTCGGCCGG GGCTCAGCCTTGCATTGTTTGTCTCGTTTACTTCC CGGTGACGGGCCAGCGTCGATTTTGACCGTCGGA AAAGGGTCAGGGGAAAGTGGCACCTTCGGGTGTGT TATAGCCTTTGGTTCGCATACGGCGGTTGGGATCGA GGAACGCAGCACGCCTTTATGGCCGGGGCCTTTGT GCCCAAGTACCGTGCTTAGGATGCTGGCGTAATGG CTTTAAACGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGA GTCTAACGTGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACC CGAGCGCGCAATGAAAGTGAAAGTCGAGATCTCTG TCATGGAGAGCACCGACGCCCGGACCTGAGCTGCT TGCGAAGGATCTGCGGTAGAGCACGCACGTTGGGA CCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGA AGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGAT TCTGACGTGCAAATCGATCGTCGAATTTGGGTATA GGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGG TTCCTGCCGAATTTCCCTCAGGAAAAAC	MT552980	799

Matériels et Méthodes

Le model de Tamura-Nei repose sur la construction d'arbre phylogénétique avec des distances corrigées, où les fréquences des nucléotides ne sont pas égales comme dans le modèle Jukes – Cantor ($p(A) \neq p(C) \neq p(G) \neq p(T)$) ; mais les transitions et les transversions des bases azotées sont équivalentes ($\alpha = \beta$). (HAMIDECHI M.A., *et al*, 2016, cours de phylogénie moléculaire disponible sur le site web : <https://www.umc.edu.dz/images/docs/Cours%20de%20phylognie%20molculaire.pdf>).

La distance d_{ij} est corrigée selon la formule : $d_{ij} = -B \ln (1 - D/B)$. Le paramètre B dépend de la nature des bases qui composent les séquences $B = 1 - \sum q_i^2$; q_i étant la somme des fréquences des nucléotides ($pA^2 + pC^2 + pG^2 + pT^2$).

La fréquence d'un nucléotide signifie sa probabilité de mutation dans l'ensemble des individus.

2.1.2. Analyse phylogénétique en fonction des séquences nuc-LSU

La même méthode a été appliquée sur analyse, l'arbre avec une probabilité logarithmique la plus élevée (-5281,27) est affiché. Cette analyse impliquait 35 séquences nucléotidiques (tableau 4). Il y avait un total de 2066 positions dans l'ensemble de données final.

Le test de bootstrap des deux arbres est réalisé sur un nombre de répétition de 500 fois avec le même logiciel MEGA 11, les fréquences sont présentées dans chaque arbre phylogénétique sur l'annexe 1.

Id Genbank	Espèce	Origine	Souche/ voucher/ isolat	Taille
OQ701105	<i>Fomitopsidaceae sp.</i>	USA	iNat56709133	610
OP541774	<i>Laetiporus cincinnatus</i>	USA	S.D. Russell iNaturalist 15065667	660
HQ676152		USA	MTB022210 8D 61	595
EU840595	<i>Laetiporus sp</i>	Lituanie	RVS7	592
EU840613		Suède	OLRIM1032	521
EU840567		Danemark	OLRIM1026	520

Matériels et Méthodes

EU840634		Coré du sud	mkacc53788	639
EU840607		Suède	KATRIN-3	599
MZ374529		USA	AODJ.161.44	573
EU840584		Lituanie	OLRIM597	551
EU840554		Tchèque	UOS-CZ	584
MK098496			JV1610 7	572
KX449507	<i>Laetiporus sulphureus</i>	France	Champ-103	610
MK934586		Chili	RGM 2720	613
KU255085		Afrique du sud	STE U 7917	615
MZ723095		Iraque	isolate 1	639
OM574647		Argentine	aislar 17.1 B(a) M	635
MF161254		USA	BHI-F417a	611
OQ048264		Angleterre	DJH22-09	601
KX354480		Canada	Z.R.L. CA08	534
MZ413281		Chine	DCY3122 (HGASMF01-131 23)	614
KF937344		Colombie	MGM 1	680
AB472624		Japon	DA-41-1	525
PP455305		Suède	U3752	524
MT581897		Italie	SAAFBM5	638
OR250352	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Chine	334 YG20211005-1D	573
MG734830		Russie	LE-BIN 3867	717
HM245764		Pologne	A1	611
KX685448		Chypre	ALV4347	573
MK564565		USA	S.D. Russell MycoMap 6701	586

Matériels et Méthodes

OM009308	USA	iNAT:96327261	566
MT550648	Algérie	TMES43	642

Tableau 3 : Taxons inclus dans l'analyse phylogénétique des ITS.

Tableau 4 : Taxons inclus dans l'analyse phylogénétique des nuc-LSU.

Id Genbank	Espèce	Origine	Souche/ voucher/ isolat	Taille
OL621235	<i>Fomitopsis sp.</i>	USA	Dai 18324	974
NG_149020	<i>Fomitopsis srilankensis</i>	Chine	BJFC 031218	1375
MZ424294	<i>Ganoderma sp</i>	Colombie	603	857
KF951316	<i>Laetiporus ailaoshanensis</i>	Chine	Yuan 3302	1377
KF951318			HKAS 53092	1400
KF951319			HKAS 52508	1405
KX354485	<i>Laetiporus cremeiporus</i>		Li 140927	974
KY886734			Cui 10894	1336
OP526819	<i>Laetiporus gilbertsonii</i>	Paraguay	G Robledo 3296	872
KX065985	<i>Laetiporus huroniensis</i>	USA	HMC	942
KY886738	<i>Laetiporus montanus</i>	Chine	Dai 11059	1336
KC595925	<i>Laetiporus sp</i>	Finlande	X1314	1581
KX354488		Chine	Dai 15953	871
PP814866			zaoyuan231010-14	1212
AF287870	<i>Laetiporus sulphureus</i>	USA	DSH93-194	974
AY684162			AFTOL-ID 769	1395
KF951302		Chine	Dai 12154	1389

Matériels et Méthodes

KF951303			JV 1106/15	1356
KR605762			Dai 12826	1301
KX354486			Cui 12388	974
KY886755			Dai 12826	1336
KY886757			Cui 12372	1336
MT552980		Algérie	TMES43	799
OR602229		Tchèqu	F024	945
KF951322	<i>Laetiporus versisporus</i>	Chine	Cui 9154	1380
KF951326			Dai 7268	1347
KX357139			Li 15071314	1318
KY886746			Dai 13583A	1335
KY886749			Cui 9001	1335
KF951307	<i>Laetiporus zonatus</i>		Cui 10403	1362
KX354509			SAAS 547	724
NG_060304			BJFC 011299	1397
OK036735	<i>Macrohyporia dictyopora</i>		Fruit body 1	1392
KC585236	<i>Wolfiporia dilatohypha</i>	USA	FP-94089-R	974

3. Extraction et purification de la lectine de *L. sulphureus*

3.1. Extraction de protéines totales et évaluation de la présence des lectines

Afin d'extraire les protéines totales du champignon *L. sulphureus*, une macération a été réalisée de 50 g de la poudre fongique dans un volume de 400 mL du tampon phosphate salin PBS 10 Mm de pH 7,4 (10 Mm Na₂HPO₄ ; 2 Mm KH₂PO₄ ; 2,7 Mm KCl ; 137 Mm NaCl ; 2Mm EDTA). Le mélange été soumis a une agitation durant 24H sur un agitateur magnétique, après centrifugé pendant 20 min à 10000 rpm à 4°C. Le surnageant obtenu a été utilisé pour évaluer la présence des lectines par le test d'hémagglutination et quantifier les protéines totales.

Le test d'hémagglutination est un moyen rapide et le plus couramment utilisé pour détecter et caractériser la présence des lectines (*Goldstein et al., 1980, Sano K. et Ogawa H., 2014*). Ce test repose sur la capacité des lectines à provoquer l'agglutination des érythrocytes, qui sont visible à l'œil nu sous forme de phase gélatineuse.

L'activité hémagglutinante de *L. sulphureus* a été testée sur une microplaque de 96 puits forme U, où un volume de 50 µL du tampon PBS 10 Mm pH 7,4, puis 50µL de l'extrait protéique sont ajoutés dans le premier puits, ensuite une série double dilution est réalisée. À la fin, 50µL de suspension de globules rouges fixés avec le glutaraldéhyde du lapin (4% dans le PBS 10 mM pH 7,4) sont ajouté dans tous les puits.

La lecture de l'activité hémagglutinante sera effectuée après 30 min à 1h d'incubation à 37 °C. Un résultat positif se manifeste par un tapis d'hématies couvrant le fond du puits, tandis qu'un résultat négatif montre que les érythrocytes ont été précipités au fond du puits, formant un point rouge distinct (figure 7).

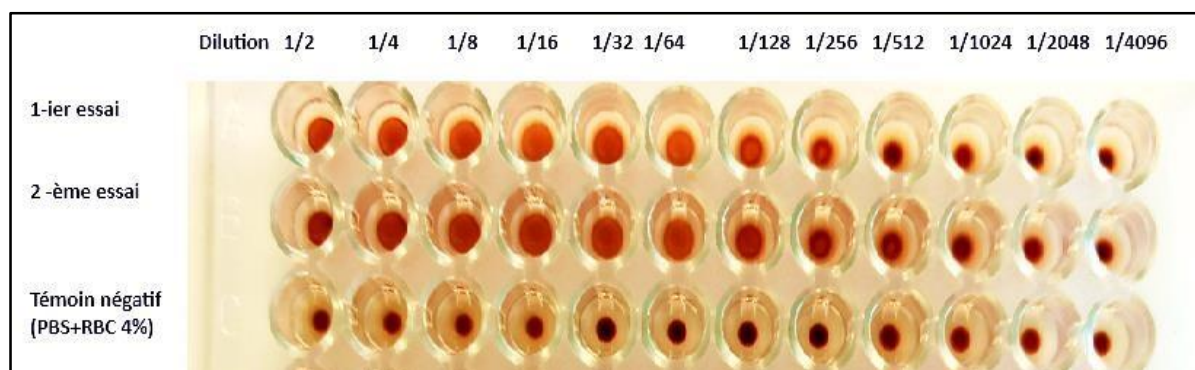


Figure 7 : Test d'hémagglutination (HA) en présence d'un témoin négatif.

3.2. Purification

3.2.1. Précipitation des protéines totales par salting out

La précipitation des protéines de l'extrait brut a été effectuée en appliquant la méthode de Salting out de Dawson R.M.C. et al. (1969), en dissoudre le sel sulfate d'ammonium (AMS) dans l'extrait protéique à une température de 0°C pour atteindre une saturation de 80%. Le mélange est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min à 4°C, les protéines précipitées sont récupérées puis solubilisées dans un volume de 20 mL de PBS (nommé F 80%), et le surnageant sera jeté.

3.2.2. Dialyse

La dialyse est une technique de séparation qui repose sur le mouvement des molécules à travers une membrane semi-perméable (sec de dialyse) allant d'un milieu plus concentré à un milieu moins concentré. Seules les molécules dont la taille est inférieure au diamètre des pores de la membrane peuvent diffuser des deux côtés pour atteindre un équilibre avec l'ensemble de la solution du système, notamment les molécules de solvant, les sels et les petits métabolites. En revanche, les macromolécules telles que les protéines restent confinées dans le même compartiment de la membrane, comme au début de l'expérience (**Voet et al., 2005 ; Hames et al., 2006**).

Les protéines solubilisées (F 80%) dans le PBS 10 mM à pH 7,4 ont été placées dans une membrane de dialyse cellulosique de 12 KDa de seuil de rétention (Spectra/Por® Membrane Dialysis Products), le contenu ensuite subit une dialyse pendant 24H sous agitation douce à 4°C contre de l'eau distillée et une autre contre le PBS 10mM pH 7,4). Le dialysat récupéré est soumis ensuite à un test d'HA pour mesurer l'activité agglutinante.

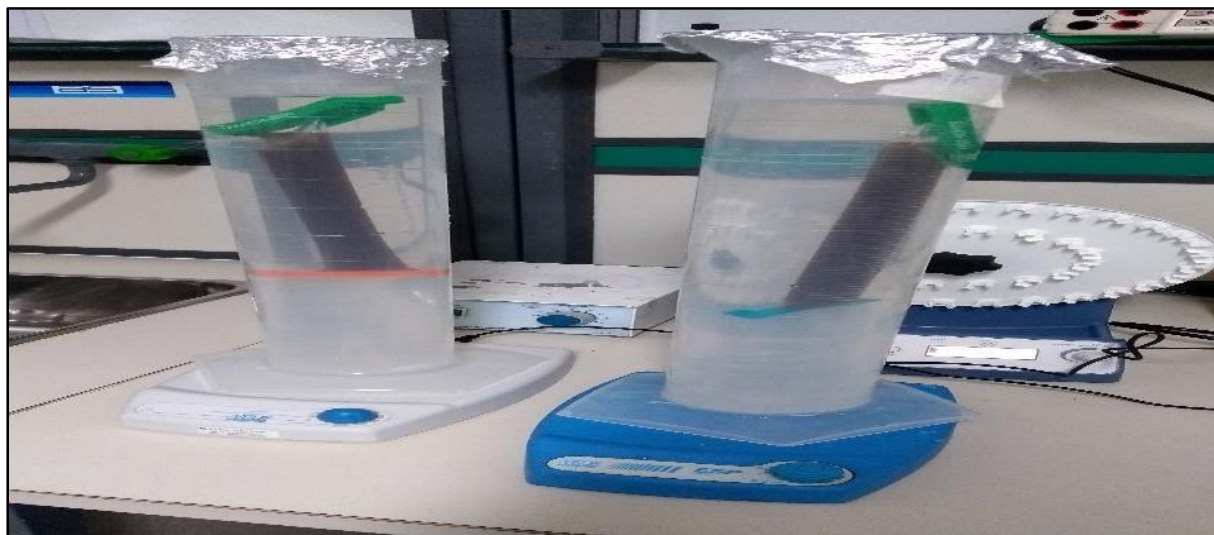


Figure 8 : Le procédé de la dialyse.

3.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sephacel

La chromatographie échangeuse d'ion consiste à séparer les molécules protéiques en fonction de leurs charges à un pH spécifique. Dans laquelle, les molécules sont adsorbées à une résine échangeuse d'anions chargée positivement DEAE-Sephacel. Ensuite, les molécules sont éluées en utilisant un gradient d'ions en NaCl ou un changement de pH.

Dans une colonne de 15 cm×2cm remplie avec la résine DEAE-Sephacel (Cytiva Milieu DEAE-Sephacel™) lavée et équilibrée préalablement avec 4 fois le volume de la colonne par le tampon PBS 10 mM pH 8,4, 137 mM NaCl. Un volume de 3 ml de la fraction 80% est déposé dans la colonne. Les molécules non adsorbées par la résine sont éliminées par le PBS d'équilibrage.

L'éluion des molécules adsorbées a été effectué successivement par des tampons PBS 10 Mm pH 8,4 ayant des molarités croissantes en NaCl 0,5 et 1 M. Les fractions ont été collectées avec un volume du 3 ml à l'aide d'un collecteur des fractions GILSON FC80 (figure 9). Le spectre chromatographique a été tracé après la lecture des absorbance (Abs) à 280 nm sur un spectrophotomètre JENWAY 7305 UV/VIS. Seules les fractions éluées dont l'Abs <0,100 ont été collectées puis concentrées après une étape de dialyse, ensuite conservées à 4°C. Un test d'HA a été appliqué pour détecter la fraction active (la lectine).

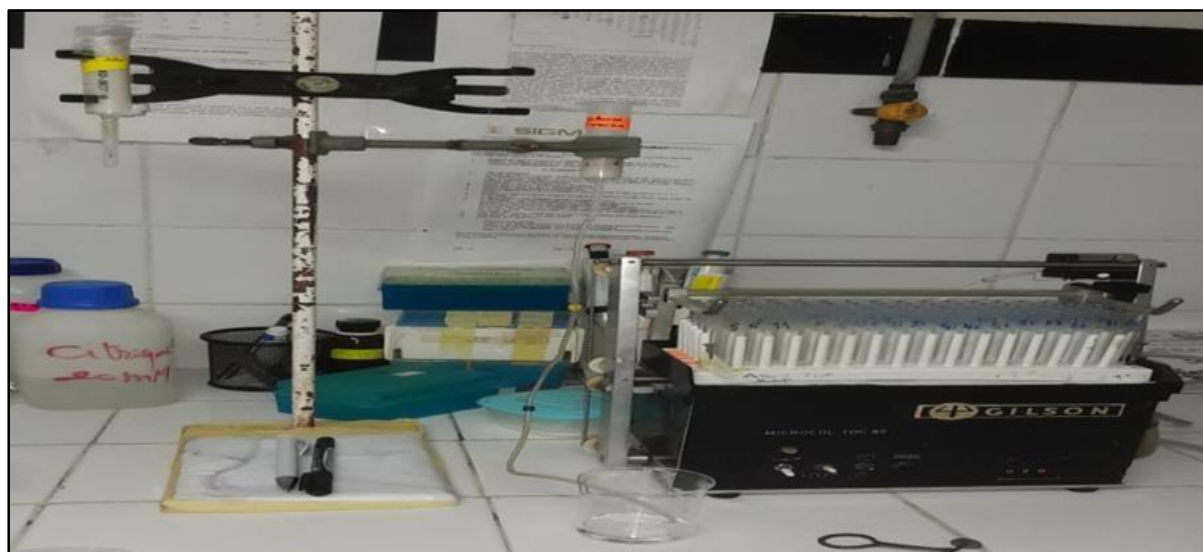


Figure 9 : Montage utilisé dans la purification de la lectine de champignon polypores soufrés (*L. sulphureus*).

4. Caractérisation biochimique de la lectine purifiée

4.1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de **Bradford. (1997)** en utilisant le BSA (le bovin sérum albumine) comme un standard à une concentration de 1 mg/ml pour constituer une courbe d'étalonnage.

Le processus repose sur l'absorption d'un colorant le bleu de Coomassie par les protéines. Cette méthode est extrêmement sensible (2-20 μg de protéines) et très rapide, les Abs ont été mesurées à $\lambda = 595 \text{ nm}$ avec le même spectrophotomètre. On déduit la concentration protéique de l'échantillon à partir de la courbe obtenue (annexe 3).

4.2. Test limite d'HA et d'inhibition

La même méthode utilisée par **Sano K. et Ogawa H., 2014**, pour déterminer la dilution maximale qui induit l'hémagglutination, aura appliqué pour mesurer : Le titre d'agrégation représente l'activité spécifique (AS), qui est l'inverse de la dilution maximale en activité. Cela correspond au rapport du nombre d'unités hémagglutinantes (UHA) à la concentration de protéines totales dans chaque fraction (mg).

Matériels et Méthodes

Le test d'inhibition d'HA avec les glucides (400mM) et les glycoprotéines (1mg/mL) suit la même procédure que le test d'hemagglutination (Sano K., et Ogawa H., 2014). Sur une microplaque de 96 puits (8 lignes et 12 colonnes), 25 µl de PBS 10 Mm a pH 7,4 sera déposé dans tous les puits et un même volume de sucre est mets seulement dans le premier puits, Après prélève un volume de 25 µl à partir de ce premier puits on a ensuite dilué ce volume avec 25 µl de PBS afin d'obtenir une dilution au demi (1/2). Les dilutions géométriques ont été effectuées pour tous les puits de la microplaque, l'étape qui suivre est le dépôt d'un autre volume égal de la lectine a été ajouté à chaque puits.

Les plaques sont incubées pendant une heure à une température de 37°C. Ensuite, 50 µl des érythrocytes sont fixés du lapin (4% dans le PBS 10 mM pH 7,4) sont ajoutés à chaque puits. Les résultats ont lu après une incubation de 1 h à 37°C.

4.3. Évaluation de la stabilité protéique

- La lectine partiellement purifiée est incubée dans un bain-marie pendant 1h à différentes températures (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C).
- L'effet du pH sur l'activité HA est évaluée après avoir dialysé la lectine pendant 24 h dans différents tampons avec des pH allant de 2 (20 mM glycine-HCL), et 6 (20 mM citrate phosphate), 8 (20 mM Tris-HCL), et 9 (20 mM glycine-hydroxyde de sodium).
- L'effet du sel sur l'activité protéique est déterminé par incubation de la lectine purifiée avec le sel d'EDTA préparé à une concentration de 10 mM dans le PBS pendant 24 heures, suivie d'une dialyse pour éliminer le sel et à la fin du test HA.

Étant donné que l'EDTA joue un rôle dans la chélation des métaux cationiques tels que Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ et Mn²⁺ (Agit plus spécifiquement des structures métalloprotéiques), cette méthode peut être utilisée pour déterminer si les métaux sont nécessaires au fonctionnement de la lectine

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

5. Analyse statistique

La corrélation linéaire et le calcul des concentrations de chaque fraction protéique étudiée ont été réalisés par le logiciel GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) installé sous système Windows 8.1 Professional, avec un seuil fixé de signification statistique à $p < 0,05$, les valeurs ont exprimé en moyenne \pm écart-type (**Annexe 6**).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Etude phylogénétique

Les basidiomycètes représentent un monde très vaste et divers en genre et espèces de champignons. Cependant, on y trouve également des champignons vénéneux et parfois même mortels, nous obligeant à avoir une connaissance toujours plus précise des espèces, nous permettant d'apprécier leur comestibilité éventuelle. Cette reconnaissance repose sur de différents critères d'identification morphologiques ou moléculaires qui sont la base de la classification des champignons. L'actualité dans la taxonomie des espèces intègre les outils de biologie moléculaire (PCR, séquençage) et de la bioinformatique (l'alignement) pour apprécier les données phénotypiques (Bâ A., et al, 2011).

La classification de l'espèce *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 d'Algérie par rapport aux autres espèces du monde, est un objectif cible dans la présente étude. Le résultat d'alignement et l'analyse phylogénétique par le MEGA 11 des gènes ITS (Figure 10), ont montré que l'espèce étudiée présente une relation parenté avec le champignon *Laetiporus sulphureus* de la Chine (OR250352), la suède (PP455305), de tchèque (EU840554), et les autres taxons du clade 51, qui sont caractérisés par des distances évolutives proches (annexe 1), ce qui nous a montré qu'ils ont le même ancêtre (le même origine ancestrale). Ce clade est représenté un sous-groupe du clade principale 62, qui ressemble un nombre 29 souches de polypores.

L'arbre phylogénétique de gènes nuc-LSU (figure 11), est présenté dans la figure, nous avons observé que l'espèce algérienne est proche avec les espèces du clade 53, ce dernier porte des polypores tel que le *Ganoderma sp* souche 603, et *Laetiporus gilbertsonii* voucher G. Robledo 3296, plus que de certains champignons de la même famille polypores, les matrices de distances évolutives sont représentées dans l'annexe 1.

Des études phylogénétiques ont montrés que la combinaison entre les marqueurs suivants : ITS, nuc- LSU la séquence nucléaire codante pour la petite sous unité ribosomique nuc-SSU, le gène EF1 α et la séquence codante pour de la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB2), peut donner un résultat plus significatif dans la classification et l'étude des propriétés évolutives des champignons (Song J., et Cui B.K. 2017 ; Estrada A.E.R. et al, 2010). Cette étude représente une initiation vers la détermination de l'évolution de notre souche étudiée par rapport aux autres espèces distribuées dans le monde, l'ensemble des résultats obtenus reste incomplet pour donner une meilleure classification de l'espèce.

Résultats et discussion

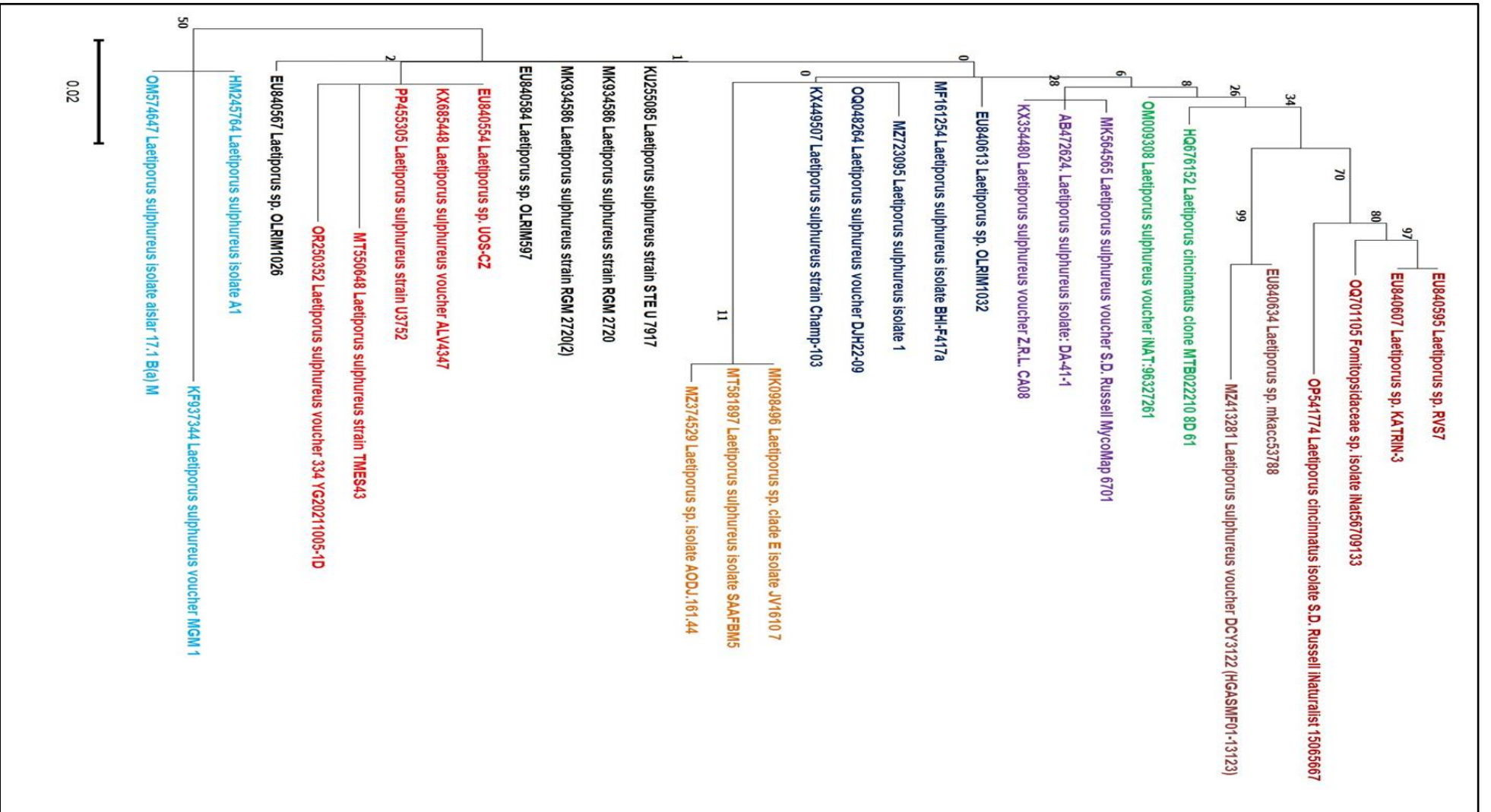


Figure 10 : Arbre phylogénétique des gènes ITS de différentes espèces de la famille Polypores à une échelle de 0,02 (degré d'évolution).

Résultats et discussion

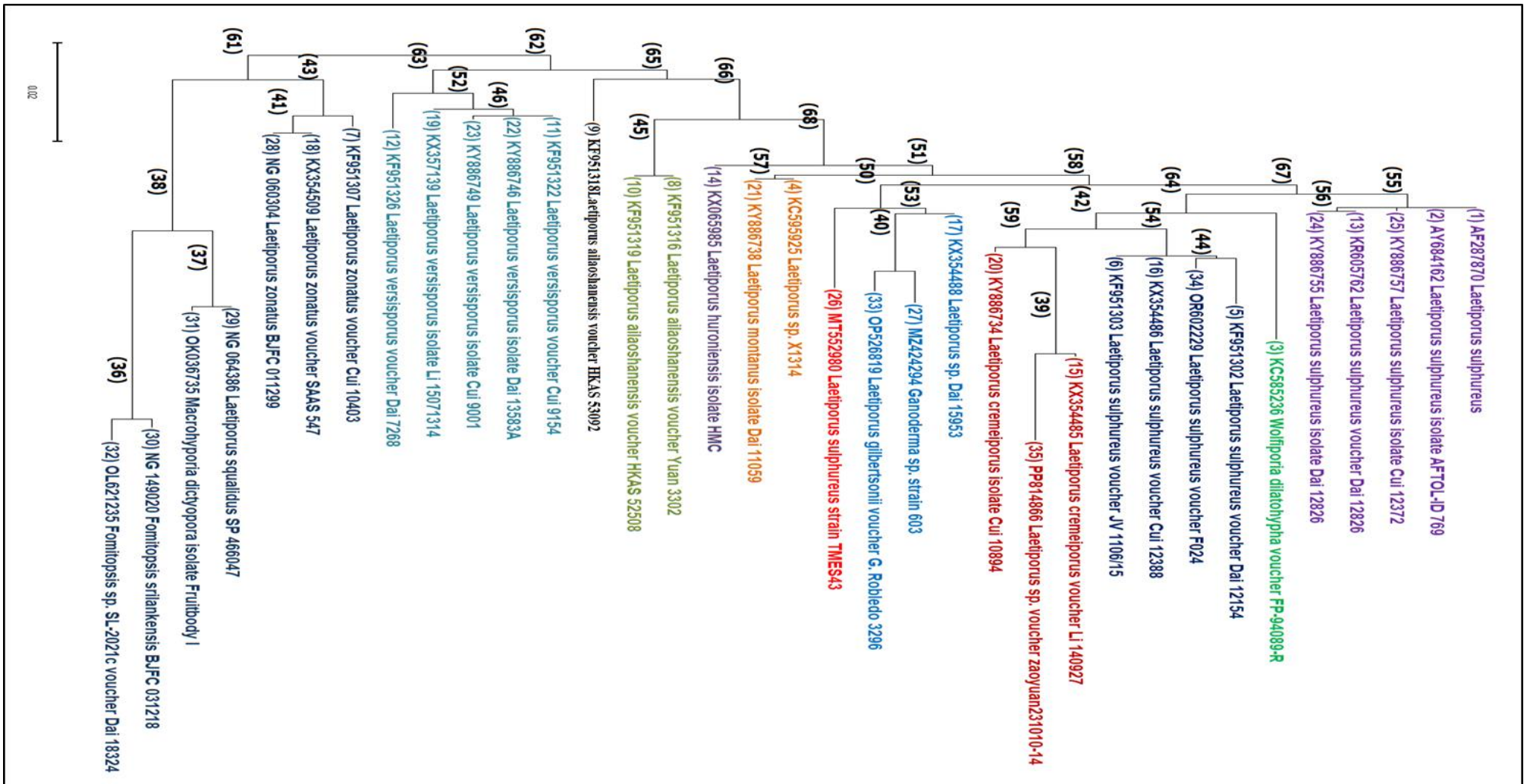


Figure 11 : Arbre phylogénétique des gènes nuc-LSU de différentes espèces de la famille Polypores à une échelle de 0,02 (degré d'évolution)

Résultats et discussion

2. Identification de la présence des lectines

2.1. Test d'hémagglutination

L'agglutination cellulaire est le premier test utilisé dans la détection des lectines dans les extraits protéiques de n'importe quelle source biologique (Sharon *et al.*, 1998), bien que cette méthode ne soit pas toujours fiable pour identifier les lectines (Wang *et al.*, 2013), il est nécessaire d'utiliser d'autres test biochimique des lectines.

Nos résultats montrent que l'extrait protéique de *Laetiporus sulphureus* (linge A) induit une activité agglutination des érythrocytes du lapin avec un titre de 512 unités hémagglutinantes (UHA) (figure 12), ce qui indique la présence de substances agglutinantes de très forte activité. Le témoin négatif (linge B) n'induit aucune agglutination, ce qui signifie que le tampon phosphate PBS utilisé dans l'extraction n'est pas contaminé et que l'origine de cette agglutination est due à la présence d'une ou des lectines du champignon polypores soufrés, ce test reste qu'un essai préliminaire pour identifier les lectines, la raison auquel, un test d'inhibition d'HA avec les sucres est mis en place pour confirmer la nature de cette agglutination (Wang *et al.*, 2013).

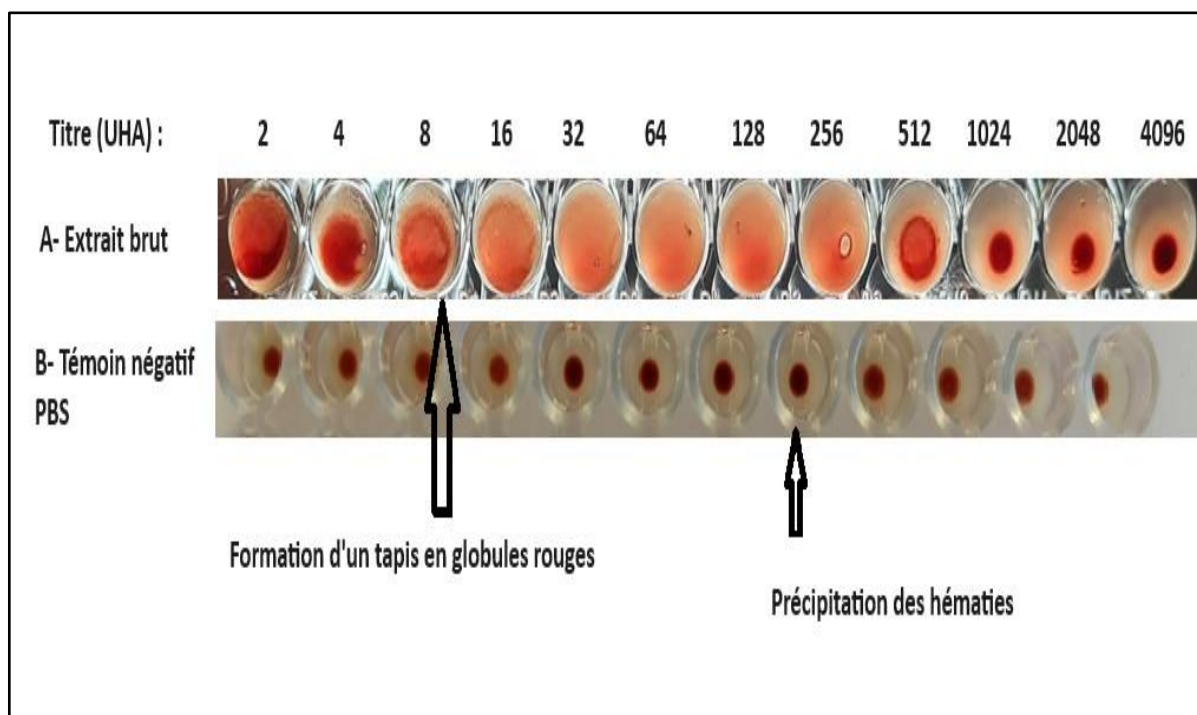


Figure 12 : Résultats du test d'agglutination de l'extrait protéique du champignon *L. sulphureus*.

Résultats et discussion

2.2. Test d'inhibition de l'activité agglutinante

Le test d'inhibition a été effectuée avec de différents sucres et glycoprotéines afin d'évaluer ou déterminer la spécificité et l'affinité saccharidique de l'extrait.

L'inhibition d'HA a été observée avec deux sucres respectivement : le galactose et le lactose, par contre les autres sucres n'ont aucune inhibition sur l'activité de l'extrait de polypores soufrés. La mucine est une glycoprotéine d'origine porcine, elle a aussi bloqué l'interaction entre l'extrait brut et les glycoprotéines membranaires des globules rouges du lapin. Le résultat obtenu est décrit dans le tableau et la figure ci-dessous (tableau 5, figure 13).

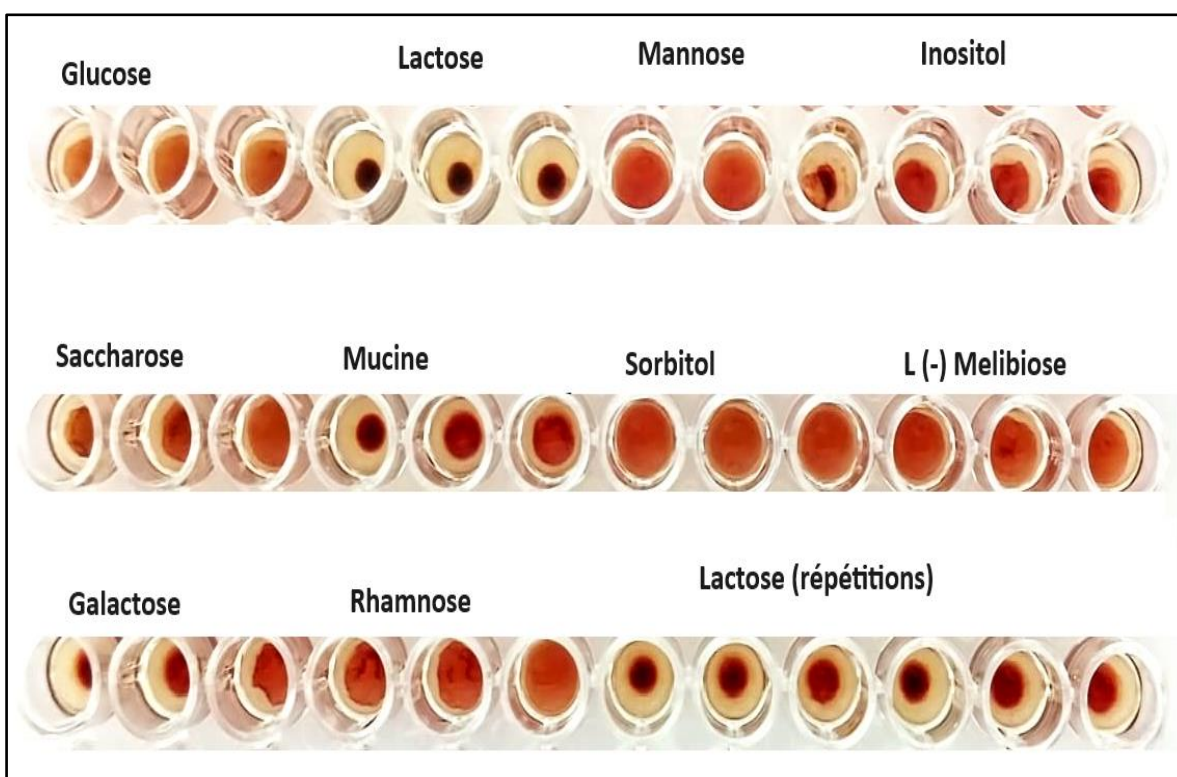


Figure 13 : Résultat du test d'inhibition de l'hémagglutination.

Résultats et discussion

Tableau 5 : Inhibition de l'activité hémagglutinante de *Laetiporus sulphureus* souche TMES43 par de différents sucres et glycoprotéines.

Sucre			
Méthyl - α -D-Mannopyranoside	Mannitol	L(-) Melibiose	Inositol
-	-	-	-
L(+) Arabinose	Cellobiose	D (+) Sorbitol	Sorbitol
-	-	-	-
Saccharose	D(+) Galactose	Glucose	N-Acétyleglucosamine (GlcNAc)
-	+	-	-
L (-) Rhamnose	Mucine	Chitosane	D (+) Lactose
-	+	-	+
Méthyl α -D Glucopyranoside	Méthyl α -D Fucopyranoside	Mannose	Xylose
-	-	-	-
Lactose	Cellulose	2 -Nitrophenyl α -D Galactopyranoside	4 - Nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside
+	-	-	-
4 -Nitrophenyl- β -D-glucofuranoside	4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	2-Nitrophenyl- β -D-glucofuranoside	
-	-	-	

(-): Absence d'inhibition ;(+): Présence d'inhibition.

Résultats et discussion

2. Purification et caractérisation biochimique

2.1. Chromatographie échangeuse d'anions

Après lavage et élution de la colonne par avec des concentrations successives de NaCl (0,5 M, 1 M) dans un tampon PBS à pH 8,4, le profil de chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE-Sephacel pour la fraction de 80% en sulfate d'ammonium (AMS F-80%) présente plusieurs pics (figure 13). Selon le test d'HA des fractions collectées, il est démontré que les fractions du pic de 0,5 M présentent une activité HA (figure 15). Le tableau 6 présente les différentes étapes de la purification. Avec l'indice de purification, on indique l'activité hémagglutinante de chaque fraction.

Après avoir précipité l'extrait brut avec une activité spécifique (SAC) de 75,595 UHA/mg, nous avons constaté une augmentation significative de leur activité spécifique. Elle a atteint 97,876 UHA/mg et se distingue par un indice de purification de 1,294 fois supérieur à celui de l'extrait initial. L'élution par un tampon PBS 10 mM pH 8,4 contenant une concentration de 0,5 M en NaCl nous a donné une lectine partiellement purifiée avec une activité spécifique très élevée, contrairement aux fractions protéiques précédentes.

La diminution significative du rendement après cette étape de purification est visible, ce qui peut être attribué à la perte lors de l'étape d'élimination des sels par dialyse successive.

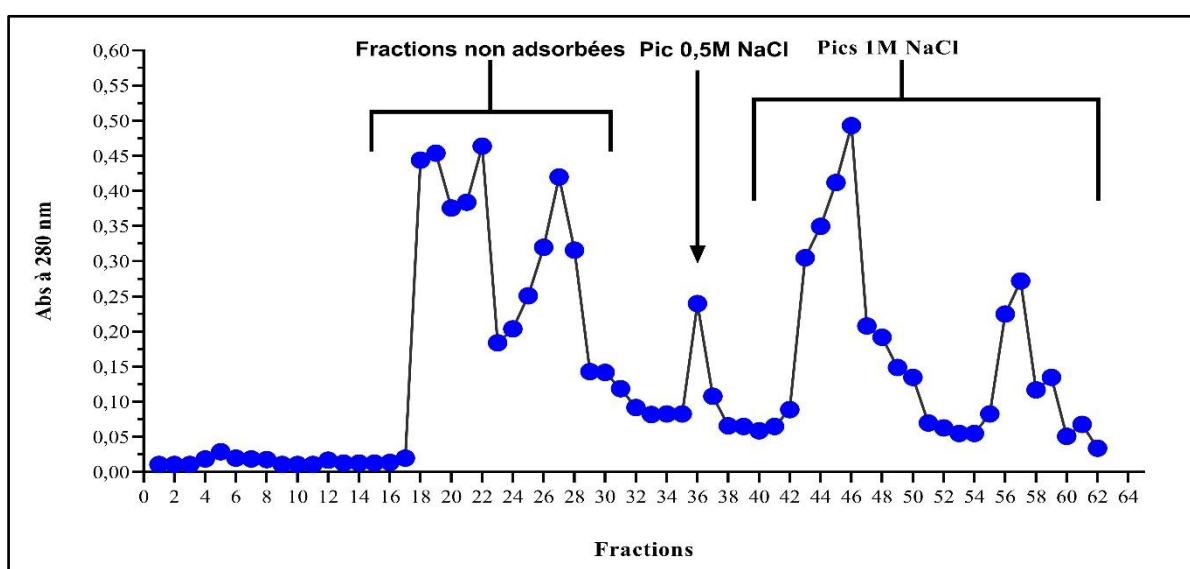


Figure 14 : Profil chromatographie échangeuse d'anions de la fraction protéique F 80%.

Résultats et discussion

Tableau 6 : Purification de la lectine à partir *Laetiporus sulphureus*

Fraction	Volume (ml)	Protéines (mg)	UHA ^(a)	SAC ^(b) (UHA/mg)	Indice de purification ^(c)	Rendement (%)
Extrait brut	400	2696	102400	75,595	1	100
AMS (F-80%)	33	345,25	33792	97,876	1,294	28,066
Pic 0,5 M	20	3,665	2560	698,49	9,239	2,5

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

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

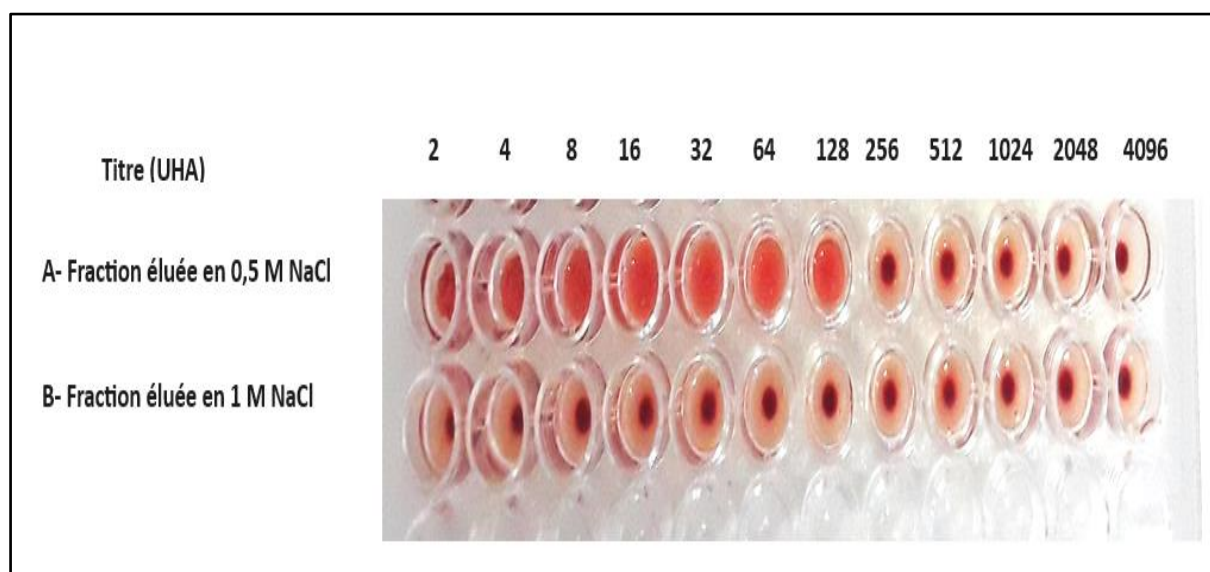


Figure 15 : Test d'agglutination des pics obtenus après élution par la chromatographie sur colonne échangeuse d'anions.

Résultats et discussion

Selon **Nascimento K.S. et al. (2012)**, la précipitation per AMS n'a pas d'impact sur l'activité de la lectine ou sa stabilité structurale, contrairement à d'autres sels ou solvants organiques qui entraînent la dénaturation ou la diminution de l'activité protéique.

La chromatographie échangeuse de cations et l'exclusion moléculaire sont utilisées pour séparer plusieurs lectines des basidiomycètes. À titre d'exemple, la lectine de *Paxillus involutus* (**Wang S.X., et al., 2013**), la lectine de *Laetiporus sulphureus* de la chine est séparée par l'échangeuse d'ions et la filtration en gel (**Wang Y., et al., 2018**), tandis que la PSLec purifiée par **Toumi M.E.S, et al., 2021** de *Laetiporus sulphureus* d'Algérie par une chromatographie d'affinité à base de Sepharose 4B et le lactose comme éluant.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Toumi M.E.S., et al., 2021** ; et **Jean G., et al. 1991**, qui ont purifié des lectines de polypores soufré de différents pays (Algérie, France respectivement).

2.1. Tests limites d'agglutination et d'inhibition

L'évaluation de la variation de l'activité HA dans chaque fraction a montré une augmentation de l'activité HA après chaque étape de purification, notant que l'activité protéique était maintenue dans ce protocole, et les tests de limite d'HA ont donné les résultats suivants :

Une activité d'extrait brut avec une dilution maximale de 1/512, en comparaison avec la fraction F 80%, une activité importante a été observée avec la dilution suivante 1/1024. Au contraire, nous avons remarqué une diminution de l'activité après l'éluion par un tampon PBS de 0,5 M en NaCl, donnant une lectine purifiée partiellement, induisant une HA à une dilution maximale de 1/128 (Figure16).

Le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine a montré que le lactose est le sucre inhibiteur sélectif, il a une minimale inhibitrice concentration (MIC) égale à 0,3125 mM, par rapport au galactose, le blocage de l'interaction entre le site de reconnaissance saccharidique CDR de la lectine avec les glycoprotéines membranaires des hématies est assuré par une MIC de 0,625 mM. Une inhibition a été observée par la seule glycoprotéine testée la mucine du porc avec une MIC 2,5 mM. Les autres sucres et glycoprotéines testés n'ont pas inhibé l'agglutination (Figures 13, 17).

Résultats et discussion

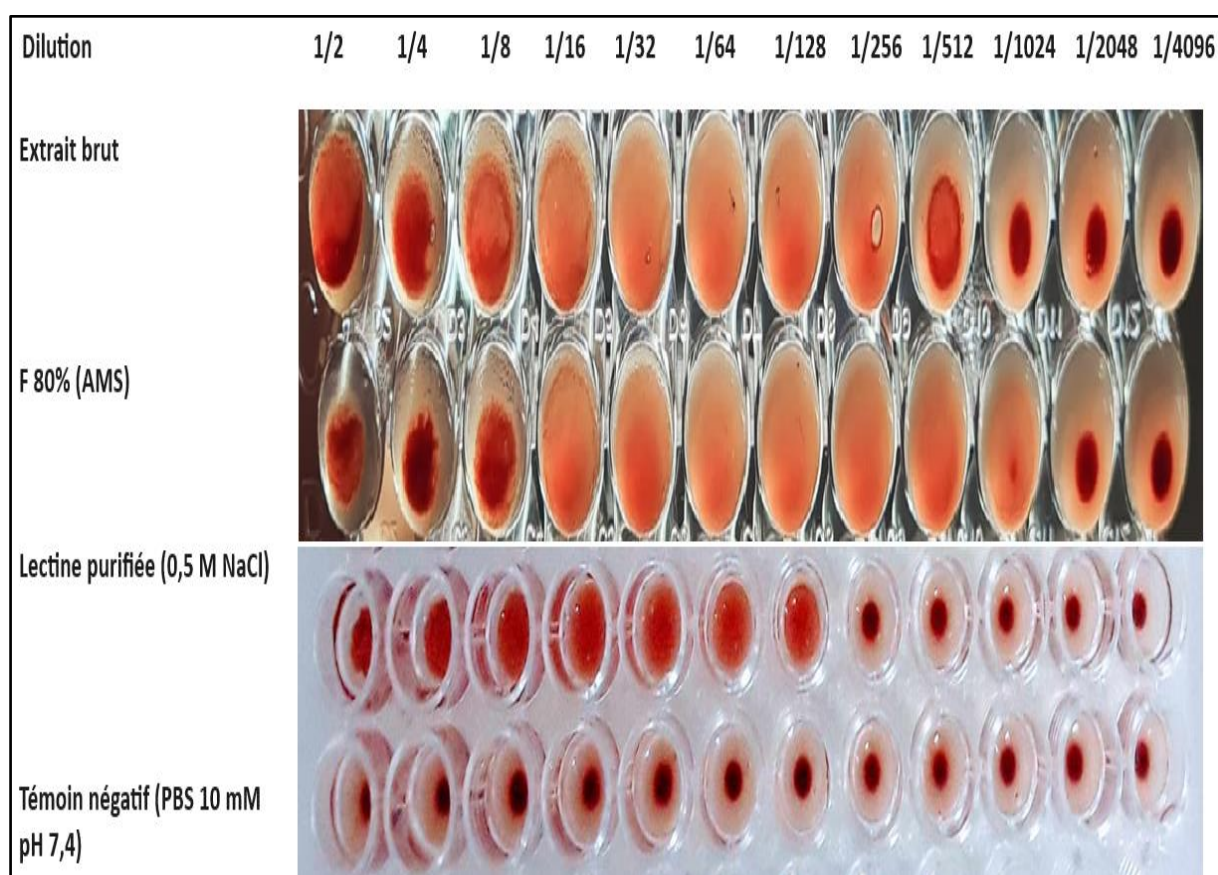


Figure 16 : Test limite d'agglutination de différente fraction protéique obtenu durant la procédure d'extraction et purification de la lectine de polypores soufrés.

Tableau 7 : Test de la limite de l'inhibition de *L. sulphureus* avec lactose et D-galactose.

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
D-Galactose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Agglutination; (-) : absence d'agglutination.

Résultats et discussion

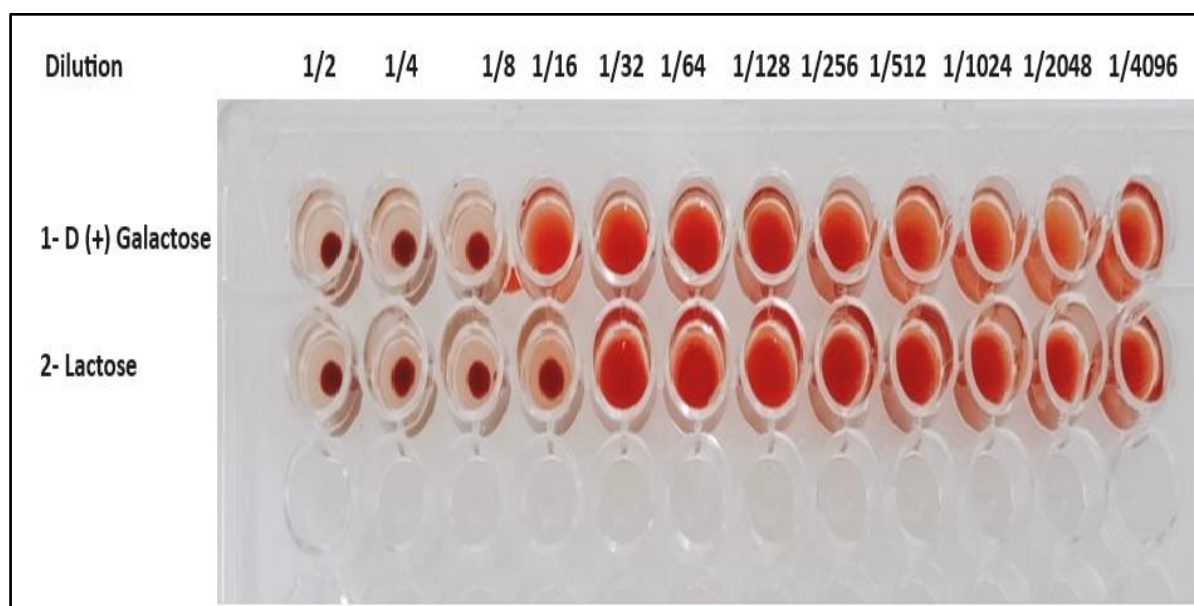


Figure 17 : Résultat de la limite d'inhibition d'agglutination avec le lactose et le D (+) galactose.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec les lectines purifiées à partir de *Laetiporus sulphureus* par **Toumi M.E.S., et al., 2021** et **Wang Y., et al., 2018**.

En général, Les différentes lectines purifiées à partir de ce champignon, ont une affinité pour le lactose et le galactose, elles sont classées dans la famille des galectines qui représente une famille des agglutinines spécifiques pour ces des sucres. Elles sont fréquemment distribuées dans les basidiomycètes et précisément les agarics et les polypores (**Petrović J., et al., 2020 ; Mancheño J.M., et al., 2010 ; Toumi M.E.S., et al., 2021 et Wang Y., et al., 2018**).

2.3. Évaluation de la stabilité protéique contre la variation de température et de pH

La lectine purifiée a été incubée dans de différentes conditions de température, de pH, et d'EDTA (10 mM). La lectine exerce une activité agglutinante maximale et stable dans le milieu à un pH neutre 7 caractérisée par un titre de 128 UHA, mais au-delà de cette valeur de pH, elle diminue pour s'annuler dans les milieux fortement basiques ou acides (Figure 18).

À l'addition, l'activité HA reste stable dans les températures modérées de 40 à 60 °C ; elle atteint un titre maximal de 512 UHA, après l'incubation à une température de 60°C. En dehors de cet intervalle, l'activité s'est diminuée jusqu'à la disparition à 100°C (Figure 19).

Résultats et discussion

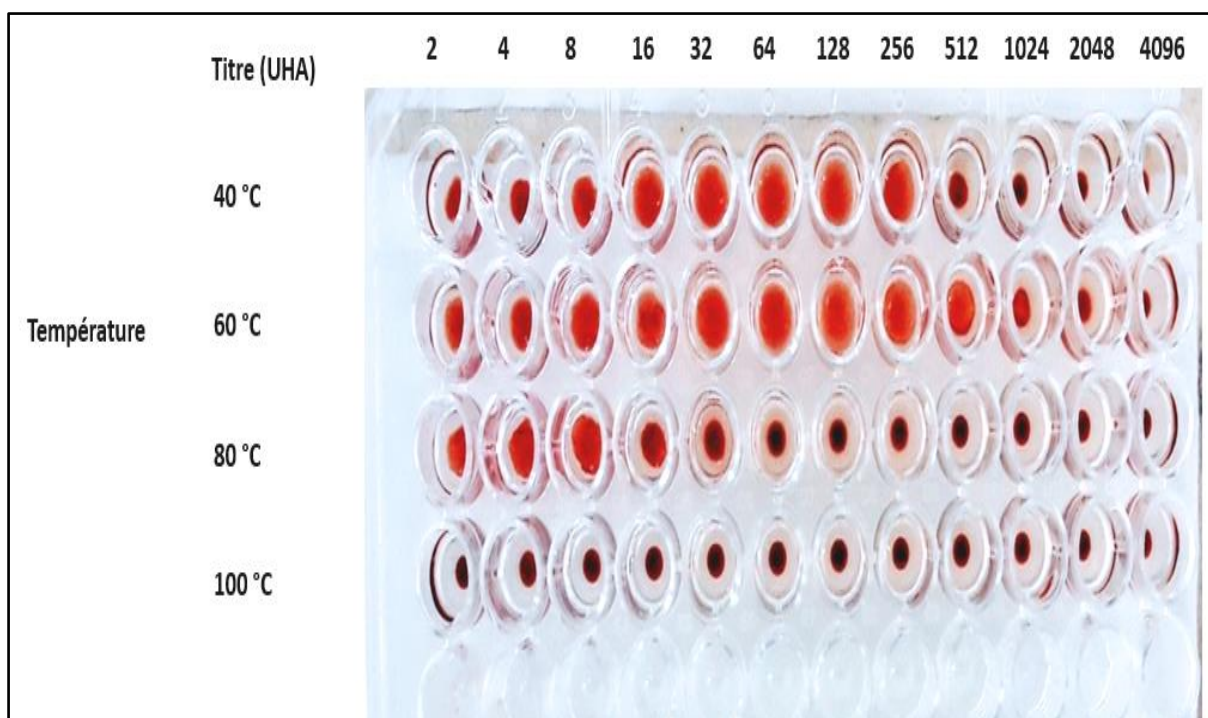


Figure 18 : Effet de la variation de température sur la stabilité de la lectine purifiée.

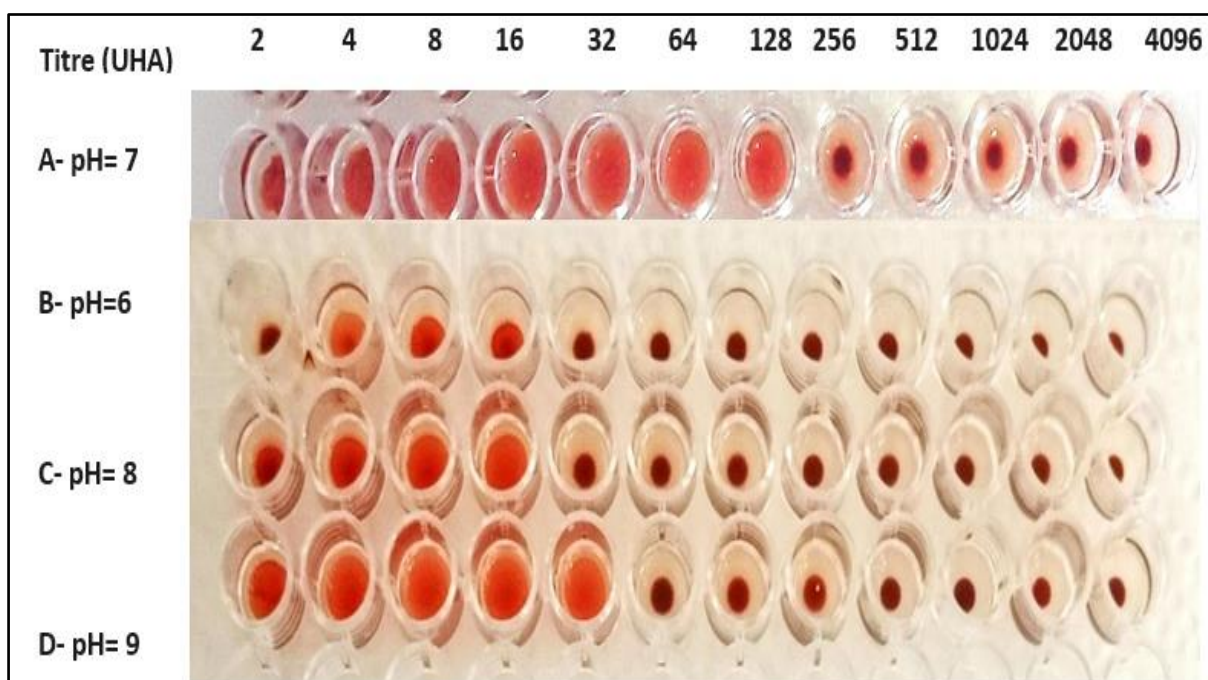


Figure 19 : Effet de différents milieux pH sur l'activité hémagglutinante de la lectine de *L. sulphureus*.

Résultats et discussion

Les lectines de champignons sont connues pour leur thermorésistance, pouvant supporter des températures allant de 40 à 100°C, Ex : Elles maintiennent leur activité même après une incubation à des températures de 60 à 80°C pendant 5 heures et à 100°C de 5 à 10 minutes (Ngai P.H., *et al*, 2004).

De plus, ces molécules restent actives sur une large plage de pH, allant de 2,5 à 9 et elles présentent une résistance significative à la protéolyse et à d'autres traitements dénaturants (Podgorskii., *et al.*, 2014).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec les lectines purifiée à partir de *Laetiporus sulphureus* par Toumi M.E.S., *et al.*, 2021 et Wang Y., *et al.*, 2018, qui ont purifiées des lectines ayant des propriétés biochimiques similaires tel que la dépendance des métaux cationiques, la sensibilité par rapport la variation du pH et de température du milieu.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

La flore algérienne des champignons reste inexploitable, une richesse en des espèces médicinales et comestibles a été négligée dans la culture alimentaire et populaire en Algérie, dans la présente étude, nous avons traité un champignon connu dans le monde par ces propriétés nutritionnelles et thérapeutiques importantes appelée Polypores soufré et son nom scientifique c'est *Laetiporus sulphureus*, nous avons utilisé des marqueurs moléculaires pour donner une approche phylogénétique sur sa classification par rapport aux autres champignons de la même famille polypores.

Il possède une biodiversité dans diverses parties du monde et présente une affinité avec d'autres espèces similaires. Sa phylogénie a été étudiée à l'aide des marqueurs moléculaires et nucléaires (ITS, LSU, SSU), elle nous a aidé de comprendre le domaine des champignons et essentiellement pour connaître mieux la flore algérienne.

Le résultat d'alignement et l'analyse phylogénétique par le MEGA 11 des gènes ITS, ont montré que l'espèce étudiée présente une relation parenté avec le champignon *Laetiporus sulphureus* de la Chine (OR250352), la suède (PP455305), de tchèque (EU840554), et les autres taxons du clade 51, qui sont caractérisés par des distances évolutives proches, ce qui nous a montré qu'ils ont le même ancêtre (le même origine ancestrale). Ce clade représente un sous-groupe du clade principale 62, qui ressemble un nombre 29 souches de polypores.

La purification et la détermination des propriétés de la lectine, ont montré que le champignon *L. sulphureus* d'Algérie produit une lectine dont l'affinité est pour le lactose et le galactose respectivement, une forte interaction inhibitrice a été remarqué avec le lactose, cette galectine fonctionne dans des températures basses et de pH neutre, leur activité hemagglutinante dépend de la présence des cations métalliques, ce qui indique qu'elle une nature métalloprotéique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

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

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

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

Canada. Ressources naturelles Canada & Québec (Province). Ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs. (2003). Les champignons des arbres de l'est de l'Amérique du Nord. Sainte-Foy : Publications du Québec.

Chaboud A. (2013). Impact de l'approche moléculaire sur la classification systématique des Agaricomycetidae (Doctoral dissertation, Thesis, University of Joseph Fourier, Faculty of Pharmaceutical Sciences).

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

Courtecuisse R. (2009). Référentiel taxonomique des Basidiomycètes de France métropolitaine. Office national des Forêts (Réseau naturaliste mycologie). Société Mycologique de France.

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

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

Darwana D., Rakib M. R. M., & Jalloh M. B. (2019). Characterization and identification of polypore fungi collected from forests in Sandakan, Sabah based on the macro-and micromorphology. *Trans. Sci. Technol*, 6, 283-291.

Références bibliographiques

Gilbertson R. L., & Ryvarden L. (1986). North American polypores. Vol. I. *Abortiporus Lindtneria*. North American polypores. Vol. I. *Abortiporus-Lindtneria*.

Ginns J. (2017). Polypores of British Columbia (Fungi: Basidiomycota). Technical Report Ministry of Forests, Lands and Natural Resource Operations, British Columbia, (104).

Gisbert J. (2011). Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense* (Doctoral dissertation, UM2).

Hall I. R., Stephenson S. L., Buchanan P. K., Wang Y., & Cole A. L. (2003). Edible and poisonous mushrooms of the world. Timber Press.

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

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

Hillis D. M., & Bull J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic biology, 42(2), 182-192.

Hopple Jr J. S., & Vilgalys R. (1999). Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. Molecular phylogenetics and evolution, 13(1), 1-19.

Jung, E.C.; Kim, K.D.; Bae, C.H.; Kim, J.C.; Kim, D.K.; Kim, H.H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. Biochim. Biophys. Acta 2007, 1770, 833–838.

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

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

Références bibliographiques

- Kuzoff R. K., Sweere J. A., Soltis D. E., Soltis P. S., & Zimmer E. A. (1998). The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15(3), 251-263.
- Lam, S.K., Ng, & T.B. .2011. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 45–55.
- Lee, R.T., & Lee, Y.C. (2000). Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate Journal*, 17: 543-551.
- Lee, Y. C. & Lee, R. T., 1995. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 28, 321–327.
- Li Y., Zhao H., Wilkins K., Hughes C., & Damon I. K. (2010). Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *Journal of virological methods*, 169(1), 223-227.
- Lichtenstein, R. G., & Rabinovich, G. A. (2013). Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death & Differentiation*, 20(8): 976-986.
- Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews*, 98(2): 637-674.
- Mancheño, J. M., Tateno, H., Goldstein, I. J., Martínez-Ripoll, M., & Hermoso, J. A. (2005). Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological chemistry*, 280(17): 17251-17259.
- McIlwraith T. F. Robert A. Blanchette.
- Moore R. T. (1980). Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. *Botanica marina*, 23(6), 361-374.
- Mouhamadou B., Carriconde F., Gryta H., Jargeat P., Manzi S., & Gardes M. (2008). Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus *Tricholoma*: barcoding implications. *Fungal Genetics and Biology*, 45(9), 1219-1226.

Références bibliographiques

- Nilsson R. H., Anslan S., Bahram M., Wurzbacher C., Baldrian P., & Tedersoo L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109.
- Ota, Y. Hattori, T. Banik, M.T. Hagerdorn, G. Sotome, K. Tokuda, S. & ABE, Y., 2009. The genus *Laetiporus sulphureus* (Basidiomycota, Polyporale) in east Asia.
- Petrovic, J. Glamoclija, J. Stojkovic, D. S. Ciric, A. Nikolic, M. Bukvicki, D. Guerzoni, M.E.&Sokovic, M.D., 2013. *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from: investigation volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspegillus flavus* in tomato paste.
- Petrovic, J. Papandreou, M. Galamoclija, J. Ciric, A. Baskakis, C. Proestos, C. Lamari, F. Zoumpoulakis, P.& Sokovic, M. 2014. Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill.
- Peumans, W.J. and Van Dame, E.J. (1995) 'Lectins as plant defense proteins.', *Plant Physiology*, 109(2), pp. 347–352.
- Philippe Lopez Didier Casane et Hervé Philippe Volume 18 numéro 11, novembre 2002.
- Radica N., & Injac R. (2009). Sulphur tuft culinary-medicinal mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Aphylophoromycetideae): bioactive compounds and pharmaceutical effects. *International journal of medicinal mushrooms*, 11(2).
- Ren, X.; Jiang, S.; Li, D.; Sun, H.; Wang, D. Crystallization and preliminary crystallographic studies of AAL-2, a novel lectin from *Agrocybe aegerita* that binds nonreducing terminal Nacetylglucosamine. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2013, 69, 650–652.
- Sharon, N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view.
- Sułkowska-Ziaja K., Muszyńska B., Gawalska A., & Sałaciak K. (2018). *Laetiporus sulphureus*: Chemical composition and medicinal value. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 17(1).

Références bibliographiques

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

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

Torres R. A., Ganal M., & Hemleben V. (1990). GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *Journal of molecular evolution*, 30, 170-181.

Trends in biochemical sciences, 18(6): 221-226.

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

Ynalvez R. A., Cruz C. G., & Ynalvez M. A. (2015). Isolation, partial purification and characterization of Texas live oak (*Quercus fusiformis*) lectin. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(7), 470-484.

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

Zhang L., Yu W., He T., Yu J., Caffrey R. E., Dalmaso E. A., ... & Ho D. D. (2002). Contribution of human α -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*, 298(5595), 995-1000.

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

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

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

Annexes

Annexes

Annexe 1

- Partie d'Alignement multiple par le logiciel MEGA des séquences ITS de différentes espèces polypores

M11: Alignment Explorer (ITS alignement 1.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences

Species/Abbrv	Sequence
1. AB472624. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate: DA-41-1	CGAAACATCTCTGACCTCT
2. EU840554. <i>Laetiporus</i> sp. UOS-CZ	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
3. EU840567. <i>Laetiporus</i> sp. OLRIM1026	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
4. EU840584. <i>Laetiporus</i> sp. OLRIM597	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
5. EU840595. <i>Laetiporus</i> sp. RV57	CGAA-CATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
6. EU840607. <i>Laetiporus</i> sp. KATRIN-3	CGAA-CATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
7. EU840613. <i>Laetiporus</i> sp. OLRIM1032	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
8. EU840634. <i>Laetiporus</i> sp. mikacc53788	CGAA-CATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
9. HM245764. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate A1	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
10. HQ676152. <i>Laetiporus cincinnatus</i> clone MTB022210_8D_61	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
11. KF937344. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher MGM 1	CGAAAGATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
12. KU255085. <i>Laetiporus sulphureus</i> strain STE_U_7917	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
13. KX354480. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher Z.R.L. CA08	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
14. KX449507. <i>Laetiporus sulphureus</i> strain Champ-103	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
15. KX685448. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher ALV4347	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
16. MF161254. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate BHI-F417a	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
17. MK098496. <i>Laetiporus</i> sp. clade E isolate JV1810_7	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
18. MK564565. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher S.D. Russel MycolMap 6701	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
19. MK934586. <i>Laetiporus sulphureus</i> strain RGM_2720	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
20. MK934586. <i>Laetiporus sulphureus</i> strain RGM_2720(2)	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
21. MT550648. <i>Laetiporus sulphureus</i> strain TMES43	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
22. MT581897. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate SAAFBN5	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
23. MZ374529. <i>Laetiporus</i> sp. isolate AODJ.161.44	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
24. MZ413281. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher DCY3122 (HQA5MF01-13123)	CGAA-CATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
25. MZ723095. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate 1	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
26. OM009308. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher INAT.96327261	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
27. OM574647. <i>Laetiporus sulphureus</i> isolate aisar 17.1_B(a) M	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
28. OP541774. <i>Laetiporus cincinnatus</i> isolate S.D. Russel Naturalist 1508566	CGAA-CGTCCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
29. OQ048264. <i>Laetiporus sulphureus</i> voucher DJH22-09	CGAAACATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA
30. OQ701105. Fomitopsidaceae sp. isolate INat56709133	CGAA-CATCTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAACAATAAGCGGAGGA

Site # 1 with w/o gaps Selected genetic code: Standard

Annexes

- Partie d'alignement multiple des séquences nuc-LSU de 35 espèces polypores

M11: Alignment Explorer (LSU Alignment.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	Sequence
7. NG_080304 Laetiporus zonatus BJFC 011299	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
8. MZ424294 Ganoderma sp. strain 603	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG AAWAGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
9. MT552800 Laetiporus sulphureus strain TMES43	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
10. KY886757 Laetiporus sulphureus isolate Cui 12372	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
11. KY886755 Laetiporus sulphureus isolate Dai 12826	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
12. KY886749 Laetiporus versisporus isolate Cui 9001	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
13. KY886746 Laetiporus versisporus isolate Dai 13583A	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
14. KY886738 Laetiporus montanus isolate Dai 11059	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
15. KY886734 Laetiporus cremeiporus isolate Cui 10894	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
16. KX357139 Laetiporus versisporus isolate Li 15071314	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
17. KX354509 Laetiporus zonatus voucher SAAS 547	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
18. KX354488 Laetiporus sp. Dai 15953	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
19. KX354485 Laetiporus cremeiporus voucher Li 140927	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
20. KX065985 Laetiporus huroniensis isolate HMC	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
21. KR605762 Laetiporus sulphureus voucher Dai 12826	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
22. KF951326 Laetiporus versisporus voucher Dai 7268	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
23. KF951322 Laetiporus versisporus voucher Cui 9154	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
24. KF951319 Laetiporus aliooshanensis voucher HKAS 52509	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
25. KF951318 Laetiporus aliooshanensis voucher HKAS 53089	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
26. KF951316 Laetiporus aliooshanensis voucher Yuan 3302	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
27. KF951307 Laetiporus zonatus voucher Cui 10403	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
28. KF951303 Laetiporus sulphureus voucher JV 1106/15	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
29. KF951302 Laetiporus sulphureus voucher Dai 12154	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
30. OR602229 Laetiporus sulphureus voucher F024	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
31. AY684162 Laetiporus sulphureus isolate AFTOL-ID 769	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
32. AF287870 Laetiporus sulphureus	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
33. KC595925 Laetiporus sp. X1314	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
34. KX354486 Laetiporus sulphureus voucher Cui 12388	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT
35. OR602229 Laetiporus sulphureus voucher F024(2)	GGGAAA GCTCAA TTTAAAA TCTGGCGG TCTTTGG - CCGTCCG AGTTGTA GTC TGGAGAA GCCTCTTCTACGCCG GACCCTGT

Site # 1 with w/o gaps Selected genetic code: Standard

Annexes

Annexe 2

- Préparation des tampons

Composition	PM (g/mol)	Molarité mM	PBS-EDTA Disodique pH 7,4 10X	PBS 1X (10 mM) pH 8,4		
				NaCl 0,5 M	NaCl 1 M	NaCl 2 M
Na ₂ HPO ₄	141.96	10	14,196 g.	1,4196 g		
KH ₂ PO ₄	136.086	2	2,7 g	0,27 g		
KCl		2,7	2 g	29,22 g		
NaCl	58.44	137	80 g	29,22 g	58,44 g	116,88 g
EDTA-Na ₂	372.24	2	7.44	/	/	/
MilliQ	/	/	1000 mL			

- Préparation des solutions tampons à différents pH (2-10) avec 20 mM de concentration par la titration

Tampon	PH	Molarité	Composition	Quantité	Volume
Glycine- HCl	2	20 mM	Glycine	1.5014 g	1000 mL
			HCL	Quelques gouttes	
Citrate- phosphate	4-6		Acide citrique	3.842 g	
			Phosphate disodique	2.8388 g	
Tris- HCl	9		Tris	2,422 g	
			HCL	Quelques gouttes	
Glycine- NaOH	10		Glycine	1.5014 g	
			NaOH	0.8 g	

Annexes

Tableau de précipitation avec sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ des protéines à 0 °C (Dawson., *et al.*, 1969).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

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

Annexes

Annexe 3 dosage des protéines totales

A- Préparation du réactif de Bradford :

1- Dissoudre 100 mg de Bleu de Coomassie R-250 dans 50 mL d'éthanol 96 ° ou Absolu ensuite rajoute 100 mL d'acide ortho-phosphorique ou phosphorique 85%.

2- Mets sous agitation après complète avec de l'eau distillée jusqu'à ou le volume final à atteindre 1 L.

3- Après l'agitation, filtre le mélange 3 fois par papier Whatman N° 3 ou 1 pour éliminer les l'excès et les partis non solubiliser de bleu de Coomassie.

4- Conserve le réactif dans le frigo sous obscurité à 4 °C.

B- Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA

Utiliser une solution mère de BSA (sigma) à une concentration de 1 mg/mL dans Tampon PBS 10 mM pH 7.4.

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

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

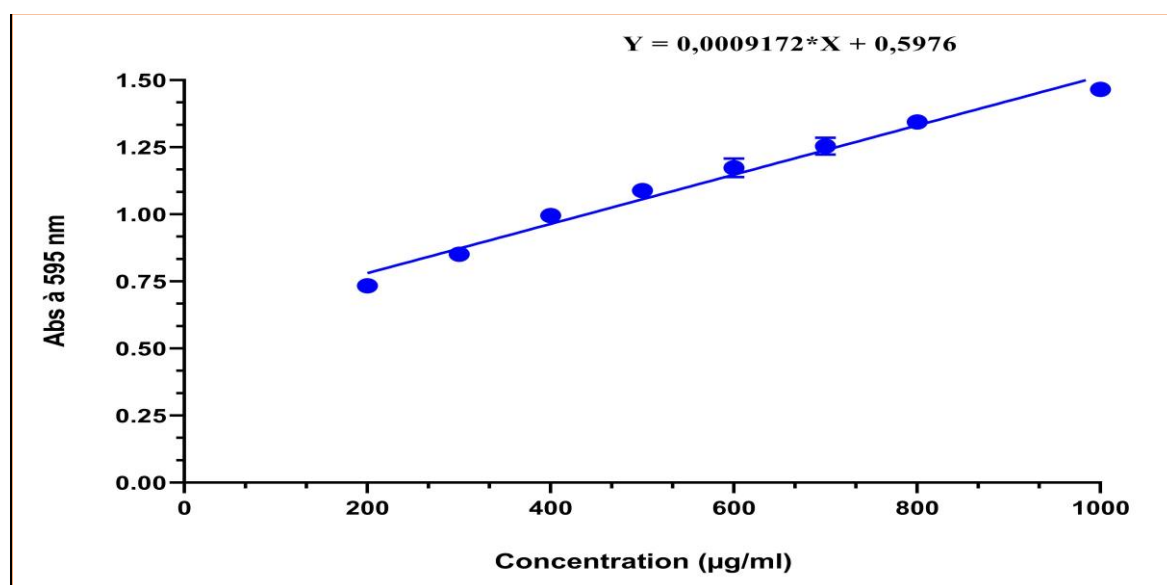
Prélevez 100 µL de chaque échantillon et ajoutez un volume de 4 mL du réactif de Bradford conformément aux instructions du protocole. Après une incubation de 5 à 10 minutes dans l'obscurité, les tubes contenant les mélanges réactionnels ont été analysés avec le spectrophotomètre JENWAY 7035 UV-visible à une longueur d'onde de λ 595 nm.

Annexes

Tableau : Les absorbances de la gamme détalonnage

Concentrations	DO 1	DO 2	DO 3
20	0,718	0,749	0,735
30	0,838	0,837	0,88
40	0,987	1	1
50	1,079	1,111	1,078
60	1,189	1,198	1,134
70	1,241	1,232	1,29
80	1,329	1,352	1,352
100	1,471	1,471	1,455

Blanc : 0,422



La gamme d'étalonnage du BSA

Annexes

Annexe 4

Résultats d'absorbances des 80 fractions après chromatographie échangeuse d'anions

Fraction	Abs	Fraction	Abs	Fraction	Abs	Fraction	Abs
1	0,023	21	0,005	41	0,464	61	0,305
2	0,019	22	0	42	0,184	62	0,35
3	0,042	23	0,017	43	0,204	63	0,412
4	0,03	24	0,008	44	0,251	64	0,493
5	0,007	25	0,005	45	0,32	65	0,208
6	0,008	26	0,013	46	0,42	66	0,192
7	0,022	27	0	47	0,316	67	0,149
8	0,015	28	0,005	48	0,143	68	0,135
9	0,02	29	0,002	49	0,142	69	0,193
10	0,011	30	0	50	0,119	70	0,214
11	0	31	0,003	51	0,092	71	0,055
12	0,002	32	0,05	52	0,082	72	0,178
13	0	33	0,004	53	0,083	73	0,083
14	0,019	34	0,009	54	0	74	0,225
15	0,029	35	0,014	55	0,24	75	0,272
16	0,02	36	0,02	56	0,108	76	0,117
17	0,019	37	0,444	57	0,066	77	0,135
18	0,018	38	0,454	58	0,065	78	0,051
19	0	39	0,376	59	0,059	79	0,068
20	0,005	40	0,464	60	0,089	80	0,034

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BENZAOUI Achouak DJABALLAH Nihel
<p align="center">Étude phylogénétique et purification d'une lectine fongique à partir de <i>Laetiporus sulphureus</i> et leurs caractérisations biologiques</p>	
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée</p>	
<p>La flore algérienne des champignons reste inexploitable, une richesse en des espèces médicinales et comestibles a été négligée dans la culture alimentaire et populaire en Algérie, dans la présente étude, nous avons traité deux objectifs : afin de donner une connaissance sur un champignon connu dans le monde par ces propriétés nutritionnelles et thérapeutiques importantes appelée Polypores soufré et son nom scientifique c'est <i>Laetiporus sulphureus</i> souche TMES43, ainsi que la purification d'une lectine à partir de la poudre de champignon.</p> <p>Nous avons utilisé des marqueurs moléculaires pour donner une approche phylogénétique sur sa classification par rapport aux autres champignons de la même famille polypores par les méthodes de bioinformatique.</p> <p>Le résultat d'alignement et l'analyse phylogénétique par le MEGA 11 des gènes ITS, ont montré que l'espèce étudiée présente une relation parenté avec le champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> de la Chine (OR250352), la suède (PP455305), de tchèque (EU840554), et les autres taxons du clade 51, qui sont caractérisés par des distances évolutives proches, ce qui nous a montré qu'ils ont le même ancêtre (le même origine ancestrale). Ce clade représente un sous-groupe du clade principale 62, qui ressemble un nombre 29 souches de polypores.</p> <p>Le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine a montré que le lactose est le sucre inhibiteur sélectif, il a une minimale inhibitrice concentration (MIC) égale à 0,3125 mM, par rapport au galactose, le blocage de l'interaction entre le site de reconnaissance saccharidique CDR de la lectine avec les glycoprotéines membranaires des hématies est assuré par une MIC de 0,625 mM. Une inhibition a été observée par la seule glycoprotéine testé la mucine du porc avec une MIC 2.5 mM. Les autres sucres et glycoprotéines testés n'ont pas inhibé l'agglutination.</p> <p>La lectine purifiée a été incubée dans de différentes conditions de température, de pH, et d'EDTA (10 mM). La lectine exerce une activité agglutinante maximale et stable dans le milieu à un pH neutre 7 caractérisée par un titre de 128 UHA, mais au-delà de cette valeur de pH, elle diminue pour s'annuler dans les milieux fortement basiques ou acides.</p>	
<p>Mots-clefs : <i>Laetiporus sulphureus</i>, ITS, nuc-LSU, phylogénie, lectine, agglutination et affinité.</p>	
<p>Laboratoires de recherche : laboratoire de Génie Microbiologie et Applications (U Constantine 1 Frères Mentouri)</p>	
<p>Président du jury : Dr. MEDOUKALI Imene. MCB UFM Constantine 1</p>	
<p>Encadrant : Dr. TOUMI Mohammed Es-seddik. MCB UFM Constantine 1</p>	
<p>Examinatrice : Dr. OUELBANI Rayenne. MCB UFM Constantine 1</p>	

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BENZAOUI Achouak DJABALLAH Nihel
Étude phylogénétique et purification d'une lectine fongique à partir de <i>Laetiporus sulphureus</i> et leurs caractérisations biologiques	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée	
<p>La flore algérienne des champignons reste inexploitable, une richesse en des espèces médicinales et comestibles a été négligée dans la culture alimentaire et populaire en Algérie, dans la présente étude, nous avons traité deux objectifs : afin de donner une connaissance sur un champignon connu dans le monde par ces propriétés nutritionnelles et thérapeutiques importantes appelée Polypores soufré et son nom scientifique c'est <i>Laetiporus sulphureus</i> souche TMES43, ainsi que la purification d'une lectine à partir de la poudre de champignon.</p> <p>Nous avons utilisé des marqueurs moléculaires pour donner une approche phylogénétique sur sa classification par rapport aux autres champignons de la même famille polypores par les méthodes de bioinformatique.</p> <p>Le résultat d'alignement et l'analyse phylogénétique par le MEGA 11 des gènes ITS, ont montré que l'espèce étudiée présente une relation parenté avec le champignon <i>Laetiporus sulphureus</i> de la Chine (OR250352), la suède (PP455305), de tchèque (EU840554), et les autres taxons du clade 51, qui sont caractérisés par des distances évolutives proches, ce qui nous a montré qu'ils ont le même ancêtre (le même origine ancestrale). Ce clade représente un sous-groupe du clade principale 62, qui ressemble un nombre 29 souches de polypores.</p> <p>Le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante de la lectine a montré que le lactose est le sucre inhibiteur sélectif, il a une minimale inhibitrice concentration (MIC) égale à 0,3125 mM, par rapport au galactose, le blocage de l'interaction entre le site de reconnaissance saccharidique CDR de la lectine avec les glycoprotéines membranaires des hématies est assuré par une MIC de 0,625 mM. Une inhibition a été observée par la seule glycoprotéine testé la mucine du porc avec une MIC 2.5 mM. Les autres sucres et glycoprotéines testés n'ont pas inhibé l'agglutination.</p> <p>La lectine purifiée a été incubée dans de différentes conditions de température, de pH, et d'EDTA (10 mM). La lectine exerce une activité agglutinante maximale et stable dans le milieu à un pH neutre 7 caractérisée par un titre de 128 UHA, mais au-delà de cette valeur de pH, elle diminue pour s'annuler dans les milieux fortement basiques ou acides.</p>	
Mots-clefs : <i>Laetiporus sulphureus</i> , ITS, nuc-LSU, phylogénie, lectine, agglutination et affinité.	
Laboratoires de recherche : laboratoire de Génie Microbiologie et Applications (U Constantine 1 Frères Mentouri)	
Président du jury : Dr. MEDOUKALI Imene. MCB UFM Constantine 1	
Encadrant : Dr. TOUMI Mohammed Es-seddik. MCB UFM Constantine 1	
Examinatrice : Dr. OUELBANI Rayenne. MCB UFM Constantine 1	