HAL
open science

Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des Ganodermataceae de Martinique, Guadeloupe et dépendances

Stephane Welti

To cite this version:

Stephane Welti. Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des Ganodermataceae de Martinique, Guadeloupe et dépendances. Médicaments. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00441072

HAL Id: tel-00441072

https://theses.hal.science/tel-00441072

Submitted on 14 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LILLE NORD DE FRANCE
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE

THÈSE

Soutenue à Lille le 3 Décembre 2009

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille Nord de France
Spécialités : Sciences Pharmaceutiques

Stéphane Welti

Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des *Ganodermataceae* de Martinique, Guadeloupe et dépendances

Directeur de thèse
Professeur Régis Courtecuisse

Membres du jury de soutenance de thèse

Rapporteurs

Monsieur Cony Decock : Chercheur Qualifié – Université Catholique de Louvain.
Madame Anne Favel : Maître de Conférences, HDR– Université de Marseille, INRA.

Examinateurs

Monsieur Régis Millet : Maître de Conférences-Université de Lille Nord de France
Monsieur Patrick Depreux : Professeur-Université de Lille Nord de France
Monsieur Yves-François Pouchus : Professeur-Université de Nantes
Monsieur Régis Courtecuisse : Professeur-Université de Lille Nord de France

Sommaire

Remerciements…….9

Liste des abbréviations……..11

I) Introduction…….…….....12

A) Contexte historique……..13

B) Contexte taxinomique……..15

C) Usages médicinaux actuels des polypores, en particulier du genre *Ganoderma*.….....16

II) Composés antitumoraux retrouvés chez les polypores et en particulier chez le genre *Ganoderma*…….…… ...18

A) Les polysaccharides…….....18

1) Structure des polysaccharides…….……..18

2) Relation structure activité des polysaccharides……20

3) Activité antitumorale au stade préclinique et clinique des polysaccharides…….……21

4) Mécanisme d'action…….…….....21

B) Les terpènes et stérols fongiques……23

1) Origine et synthèse……...23

2) Différences structurales entre les triterpènes tétracycliques de type lanostane et les stérols……27

3) Les triterpènes de type lanostane du genre *Ganoderma* et en particulier du *G. lucidum* asiatique en tant que métabolites secondaires……...28

a) Extraction et purification……..….……29

b) Classification des triterpènes de type lanostane extraits de *G. lucidum* (d'après Kim & Kim, 1999)……..……29

c) Classification des acides triterpéniques en particulier des acides ganodériques extraits du *Ganoderma lucidum* asiatique par LC-ESI-MS^2 d'après Yang *et al.* (2007)……..……..32

d) Activités antiprolifératives des triterpènes de type lanostane du genre *Ganoderma* (*G. lucidum*)……34

d-1) Cytotoxicité directe (*G. lucidum*)…….…..……..34

d-2) Cytotoxicité directe pour les autres espèces du genre *Ganoderma*……..……37

d-3) Mécanisme d'action ou action ciblée des lanostanoïdes principalement extrait du *G. lucidum* asiatique : Discussion sur leur relation structure activité…….…..38

e) Utilité des triterpènes de type lanostane et en particulier des acides ganodériques en taxinomie des *Ganodermataceae* ; Profil Chromatographique……..…….45

4) Activité antiproliférative des stérols retrouvés chez le *G. lucidum* et *G. sinense*……...48

5) Problème d'ordre taxinomique…….……...……50

III) Recherche de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores des Antilles françaises…….……..51

A) Première étape : choix et identification des spécimens récoltés, exemple des *Ganodermataceae*…….…….……..53

1) Différents genres de la famille des *Ganodermataceae* Donk (d'après Steyaert, 1967a, 1980 ; Gottlieb & Wright, 1999a, 1999b ; Moncalvo & Ryvarden, 1997)……..54

a) Le genre *Ganoderma* Karsten……..54

a-1) Sous-genre *Ganoderma*……55

a-2) Sous-genre Elfvingia (P. Karsten) Imazeki…….……57

a-3) Sous-genre Plecoderma Steyaert (1980)……..….…….……59

b) Genre *Amauroderma* Murrill…….…….. 59

c) Genre *Haddowia* Steyaert……60

d) Genre *Humphreya* Steyaert…….……..60

2) Difficultés d'identification sur le terrain : ressemblances et pièges……61

a) Ressemblances entre les genres.....62

b) Hétérogénéité morphologique…….……..62

3) Description macro et microscopique……64

4) Taxinomie et phylogénie moléculaire……..64

a) But Taxinomique……...……..……64

b) But Phylogénique……64

c) Position phylogénique de certaines *Ganodermataceae* récoltées aux Antilles françaises (cladogramme de l'UCL et Moncalvo, 2000)……65

c-1) Complexes identifiées dans le groupe des *Ganodermataceae* dont le revêtement est différencié……..……66

c-2) Complexes retrouvés dans les *Ganodermataceae* dont le revêtement est indifférencié....77

B) Inventaire et description des *Ganodermataceae* présentes dans les îles des Antilles françaises.....80

1) Genre *Amauroderma* Murrill, 1905, *Bull. Torrey Bot. Cl.* 32(7), p. 366.....81

a) *Amauroderma exile* (Berk.) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.* 18, p. 142.....81

b) *Amauroderma intermedium* (Bresadola & Patouillard) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.*…....82

2) Genre *Ganoderma* P. Karsten, 1881, *Rev. Mycol*. [Toulouse] 3, p. 17……83

a) *Ganoderma amazonense* Weir, 1926, *Bull. U.S. Dept. Agric.* 1380, p. 84 [LECTOTYPE : Brazil, Amazonas, Para, Cocal Grande, sur *Spondias lutea* dans une plantation de *Hevea brasiliensis*, « Weir », s.n. (BPI 62043)]….83

b) *Ganoderma colossum* (Fr.) Baker, 1918, *Cent. Fung. Malay*. 5, p. 42.....88

c) *Ganoderma dussii* Patouillard, 1899, *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 15, p. 198 [LECTOTYPE :.....88

d) *Ganoderma mangiferae* (Léveillé) Patouillard, 1890, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 74.....91

e) *G. martinicense* **Welti & Courtecuisse, *nom. prov.***…….....…..92

f) *Ganoderma neogibbosum* Welti & courtecuisse……..…….95

g) *Ganoderma parvigibbosum* Welti & Courtecuisse…….……..……...99

h) *Ganoderma pulverulentum* Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 121 [LECTOTYPE: La grenade, Les Antilles, "W.E. Broadway, 4 sept., 1905 (NY), sur manchineel séché].....101

i) *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 122……...104

j) *Ganoderma subamboinense* (Henn.) Bazzalo & Wright, *in* Moncalvo & Ryvarden….....106

k) *G. tuberculosum* Murrill, 1908, *N. Amer. Fl.* 9, p. 123).....109

3) Genre *Humphreya* Steyaert, 1972, *Persoonia* 7(1), p.98…….…….....112

a) *Humphreya coffeata* (Berk.) Steyaert, 1972, *Persoonia* 7(1), p. 102 ('*coffeatum*')…..…113

b) *Ganoderma flaviporum* (Murrill) …….…..……117

4) Remarques générales et conclusion……..…….119

C) Criblage des extraits fongiques issus des spécimens récoltés possédant une bioactivité de type antitumoral…….....120

1) Espèces sélectionnées……...…….120

2) Choix des lignées cellulaires pour le criblage des extraits bioactifs…….122

a) Méthode……..……123

b) Résultats……...124

D) Comparaison et analyse des profils chromatographiques des spécimens actifs SW45 *vs* SW6 et *G. lucidum* asiatique vs *G. lucidum* européen……...129

1) SW6 *vs* SW45 par CCM……...129

2) *G. lucidum* asiatique vs *G. lucidum* européen par CCM……..131

3) SW6 et SW45 par LC-MS……132

4) Analyse du pic majoritaire de *G. tuberculosum* par spectrométrie de Masse Tandem (ou MS/MS) en mode négatif ……134

5) Comparaison des profils chromatographiques de masse des *G. lucidum* asiatique et *G. lucidum* européen……..139

a) Résultats obtenus par comparaison des 2 spécimens nommés *G. lucidum* asiatique…… .140

b) Résultats obtenus par comparaison des 2 spécimens nommés *G. lucidum* européen…....146

c) Comparaison des profils chromatographiques des *G.lucidum* asiatique, européen et du *G. tuberculosum*…….147

c-1) Choix du mode opératoire……...…….147

c-2) Discussion…….……...……..148

6) Confrontation des résultats obtenus par LC-MS avec la bibliographie et les résultats de séquençage de l'UCL et de Moncalvo (1995)……149

7) Tentative d'identification des acides ganodériques de nos deux *G. lucidum* asiatiques.155

E) Résultats obtenus par fractionnement de l'extrait *G. tuberculosum*.....158

1) fractionnement de SW6…….…….158

2) Fractionnement de l'extrait méthanolique SW45 (*G. tuberculosum*)…….…160

a) Fractionnement de SW45.EP.....160

b) Fractionnement de FI' issus de SW45.EP (figure 103)…….…….162

c) Analyse de SW45GAp en LC-MS et Fractionnement (figure 104)…….……163

d) Analyse de SW45GA en LC-MS……..166

3) Analyse de SW45.GA en LC-MS-MS mode négatif……..167

4) Analyse de la fraction SW45GA en RMN ^{1}H et ^{13}C (partie concernant le composé majoritaire GA FWI……....168

5) Analyse de l'ion à *m/z* 529 de la fraction SW45GA en ESI-MS-MS et comparaison de son spectre avec celui de GA FWI……..172

a) Hypothèse de structure des deux composés……..……174

b) Origine et temps de rétention des deux acides ganodériques……..……174

6) Séparation et purification des composés de SW45GA……..176

a) Choix du mode opératoire (voir partie expériementale pour l'ensemble du paragraphe)...176

b) Résultats……176

F) Evaluation de l'activité antiproliférative de la fraction SW45GA enrichi en GA FWI sur cellules cancéreuses de type PC-3, HT-29 et MCF-7. Comparaison des résultats avec les témoins GA A, GA DM et GA F……..……182

IV) Conclusions et perspectives……..184

V) Partie expérimentale……189

A) Récolte et identification……189

1) Récolte……189

2) Identification……..……..189

a) Caractérisation morphologique ……189

b) Caractérisation microscopique……..……191

c) Caractérisation moléculaire……..……..191

c-1) Préparation du matériel biologique ……191

c-2) Extraction d'ADN……192

c-3) PCR (Poly Chain Reaction) …….……194

c-4) Électrophorèse……..199

c-5) Purification……198

c-6) Séquençage…….……198

c-7) Analyse des séquences d'ADN…….……200

B) Préparation des extraits de ganodermes et des autres polypores pour les tests pharmacologiques (MTT), les analyses en CCM et en LC-MS……..202

1) Nettoyage des carpophores, sélection des spécimens et extraction……202

2) Préparation des solutions « Poids/volume » à partir des extraits méthanoliques …..…202

3) Lyophilisation…….203

4) Tests cellulaires : mesure du pouvoir antiprolifératif des lyophilisats……...203

a) Cuture de cellules……..203

b) Mesure de la prolifération cellulaire…….…..……204

C) Partie analytique……205

1) CCM (Chomatographie sur Couche Mince)…….……..205

2) Analyse LC-MS……..205

a) Premier essai……206

b) Deuxième essai…….……206

3) Analyses en LC-ESI-MS^2…….……..207

4) RMN……...207

D) Fractionnement des extraits, méthodes préparatives……208

1) Extraction des composés apolaires et acides des extraits méthanoliques SW6 et SW45 (*G. tuberculosum*)……..……208

2) Fractionnement et purification des composés à partir de SW45……211

a) Fractionnement de SW45.EP par flash chromatographie……...211

b) Fractionnement de FrI' par chromatographie sur colonne de silice……...211

c) Fractionnement de FrI'$_A$ par CCE (Chromatographie sur Couche Epaisse)…….212

d) Fractionnement de SW45Gap…….212

d-1) Sur colonne de Silice…… ……..212

d-2) Par CCE…… ……213

e) Chromatographie semi-préparative de SW45GA…… …….213

e-1) Appareillage…… ……..213

e-2) Analyse de SW45GA en CLHP…… ……..213

e-3) Chromatographie semi-préparative de SW45GA…… ……..214

Annexe 1 : réaction de séquençage, protocole de ma mycothèque de l'UCL.....215

Annexe 2 : Monographie de ***Microporellus*** du groupe ***dealbatus*** (Berk. & M.A. Curtis) Murrill récolté en Martinique……..…226

VI) Bibliographie…… ……229

Remerciements

J’exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à Régis Courtecuisse, Professeur de Mycologie et de Botanique à la faculté des sciences pharmaceutiques et Biologiques de Lille et directeur de cette thèse. Je lui adresse ma plus sincère reconnaissance, pour son aide, sa confiance, ses qualités humaines et scientifiques qui m’ont permis de mener à bien ce travail. Je le remercie également de m’avoir intégré dans l’équipe de recherche travaillant sur la taxinomie et la biodiversité des champignons des Antilles Françaises.

J’adresse également mes remerciements à M. le Professeur émérite, Jean-Pierre Hennichart pour avoir accuelli initialement ce projet de recherche et de thèse au laboratoire de l’ICPAL.

J’adresse mes remerciements à Régis Millet, Maître de conférences et directeur de l’EA 2692, pour m’avoir accueilli dans son équipe, pour ses conseils et l’intérêt scientifique qu’il a porté à mes recherches. Je le remercie également d’avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J’adresse ma reconnaissance au Professeur Patrick Depreux, directeur de l’ICPAL, pour m’avoir accueilli dans son institut, et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également le docteur Cony Decock de me faire l’honneur d’accepter d’être rapporteur et membre du jury de cette thèse. Je lui exprime mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de séquencer mes souches de Ganodermes, pour ses conseils et les connaissances qu’il m’a apportés sur les *Ganodermataceae*. La collaboration qui s’est

engagée et qu'il m'a offerte, me donne la chance de participer, à plus long terme, à un travail d'envergure sur ce groupe passionnant.

Je tiens à remercier Anne Favel, Maître de conférences à la faculté de pharmacie de Marseille, pour ses encouragements, ses conseils, et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur et membre du jury de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Yves-François Pouchus, Professeur à la faculté de pharmacie de Nantes, président de STOLON, pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse.

Je remercie également le Professeur Jean-Paul Bonte et toute l'équipe du CUMA (Nathalie, Mostafa et Brigitte) pour m'avoir plusieurs fois cordialement et chaleureusement accueilli dans leur laboratoire.

J'exprime toute ma gratitude à Françis Trotin, Professeur émérite, au professeur Nathalie Azaroual, au Professeur Jean Paul Bonte, au Professeur Claude Vaccher , à Cécile Danel (Maître de conférences), Pierre-Arthur Moreau (Maître de conférences), Elisabeth Singer (Maître de conférences), Vincent Roumy (Maître de conférences), Nathalie Duhal (ingénieur au CUMA), Mostafa Kouach (ingénieur au CUMA), Ines Devred (technicienne), Amélie Lemoine (ingénieur à l'ICPAL), Christophe Lécuru (technicien), et Antonio Garofalo (Doctorant), sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Je remercie le Professeur François Bailleul, le Professeur Damien Cuny, Chantal Van Haluwyn (Professeur émérite), Thierry Hennebelle (Maître de Conférences), Laurence Goossens (Maître de Conférences) et Benoît Arnalsteen (Docteur en Pharmacie) pour leurs conseils.

Merci à mes compagnons de thèse, Nicolas Manier, Juliette Faburé et Audrey Hayet, pour leur soutien, leur conseil, et leur amitié. J'aimerais, à travers ces remerciements, leur exprimer mon indéfectible amitié.

Je tiens particulièrement à remercier Christophe Lécuru, Christian Lechat, Jean-Pierre Fiard, Sandrine Bessard, Jacques Fournier, Jean Chabrol et une nouvelle fois Régis Courtecuisse avec qui j'ai partagé des moments uniques, magiques et inoubliables aux Antilles. Les expressions : 'Même pas peur' ou 'Et dire que pendant ce temps il y en a qui croient qu'on s'amuse' ou encore 'On n'a pas des métiers faciles' qui nous ont aidé à surmonter les aléas

des tropiques : cyclones (rien ne sert de balayer devant sa porte la veille d'un cyclone), moustiques, fourmis rouges, mygales, guêpes (drôle d'impression que d'être pourchassé par ces insectes), chiens enragés (heureusement Saint Christophe a veillé sur nous ce jour là…même pas peur !), pluies diluviennes et marches prolongées, resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Dorénavant, Je ne pourrais jamais plus boire un ti punch ou manger des sardines sans penser à vous bougan'mwen!!

Je remercie la DIREN, l'ONF pour leur soutien financier au cours de ces missions antillaises. Merci également à l'INRA pour les souches de Ganodermes qu'ils m'ont apporté.

Enfin, je remercie mes parents, ainsi que M. et Mme Sorlin pour s'être occupé des enfants à la sortie de l'école en attendant mon retour de Lille.

Merci à ma famille pour son soutien, et toute mon affection et ma tendresse à mes filles Rowan et Tanis.

A la mémoire de Louis Mao, Robert et Yvonne Welti.

Liste des abbréviations

Aff. : affine
CI_{50} : concentration qui inhibe 50% de la croissance des cellules cancéreuses
DMEM : Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMSO : dimethylsulfoxide
DU-145 : métastase cérébrale d'un carcinome de la prostate
ECA : carcinome d'Ehrlich
EGF-R : récepteur de facteur de croissance épidermique
FPTase : Ras farnésyl transférase
GA A : ganoderic acid A (acide ganodérique A)
GA DM : ganoderic acid DM (acide ganoférique DM)
GA F : ganoderic acid F (acide ganodérique F)
HL-60 : leucémie promyélocytaire chez l'Homme
HepG2, HepG2,2,15 : hépatocarcinome chez l'Homme
HT3, SiHa, CasKi : carcinome du col de l'utérus chez la femme
HT-29 : adénocarcinome du colon chez l'Homme
HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie liquid à haute pression)
ITS : Internal transcribed spacer (espace de transcription interne)
Kato II : carcinome gastrique chez l'Homme
KB : cancer nasopharyngé chez l'Homme
LC-MS : Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-ESI-MS : Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry
LC-ESI-MS-MS : Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry
LLC: cancer pulmonaire de Lewis

LNCaP : androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells
MMP : métalloprotéase matricielle
MCF-7 : adénocarcinome du sein chez l'Homme
MEM : Minimum Essential Medium
Meth-A : sarcome murin
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-kB : facteur nucléaire kB
PC-3 : cancer de la prostate chez l'homme
PDA : photo diode array detector
PLC/PRF/5 : hépatome chez l'Homme
rDNA : ribosomal DNA
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
T_R : temps de rétention
TIC : total ion current

I) Introduction

A) Contexte historique

La première mention historique, faisant état de l'utilisation de basidiomycètes en médecine, date du Vème siècle avant J.C : dans les écrits du médecin grec Hippocrate, l'amadou, préparé à partir de la chair de *Fomes fomentarius* (Figure 1), est mentionné pour la cautérisation des plaies (Thoen, 1982).

Figure 1 : *Fomes fomentarius* amadouvier

www.biopix.dk/Temp/Fomes%20fomentarius%200000

Des propriétés anticancéreuses sont également rapportées par Soljenitsyne dans le Pavillon des cancéreux (1968) à propos d'un polypore, *Inonotus obliquus* (figure 2 et 3), connu en Russie sous le nom de 'Chaga'. Ses propriétés antitumorales seraient connues depuis le XVIème siècle. En 1955, les préparations médicinales de ce champignon ont été reconnues par le comité des recherches médicales Russes. Elles sont vendues sous le nom de Béfungine (figure 3) pour calmer les douleurs, améliorer l'état général et stopper la croissance tumorale.

Figure 2 : *Inonotus obliquus*

www.forestpests.org/images/1536x1024/4213076.jpg

Figure 3: Béfungine

eshop.apibiz.com/goldland/images/Chaga.gif

Aujourd'hui, dans les pays occidentaux, les champignons ne sont plus mentionnés en médecine courante, dite allopathique (médecine des contraires). Toutefois, nous les retrouvons dans les compléments alimentaires (*Lentinula edodes* ou Shiitaké) ou dans certaines spécialités homéopathiques (Sarembaud & Poitevin, 1996). Seul le *Laricifomes officinalis* également appelé Polypore officinal ou agaric officinal, utilisé autrefois pour ses propriétés purgatives et antisudorales, est encore cité dans le formulaire pratique de Pharmacologie (Feldman, 1978). L'usage de celui-ci était encore fort répandu en Europe en particulier contre les fièvres phtisiques, à tel point que ses lieux de récolte étaient maintenus secrets (Thoen, 1982).

Toutefois, même si les propriétés médicinales des champignons supérieurs ou macromycètes sont connues depuis longtemps en Europe, leur usage n'était pas aussi répandu qu'en Asie**.** De plus, il existe encore actuellement une certaine mycophobie ou peur du champignon dans les pays anglo-saxons.

En Chine, les champignons lignicoles, notamment les Polypores mais également le Shiitake ou *Lentinula edodes,* sont très recherchés pour être consommés en soupe ou en infusion dans un but culinaire mais aussi curatif. Parmi les ascomycètes, le *Cordyceps sinensis* est utilisé traditionnellement pour lutter contre les effets de l'âge, comme tonifiant, mais aussi contre les hépatites et certains cancers (Matsuda *et al.*, 2009).

Chez les polypores, le *Ganoderma lucidum* (*Gano* qui veut dire brillant, *Derma* - peau, et *lucidum* - luisant) mieux connu sous le nom Lingzhi en Chine, est certainement le champignon le plus populaire et le plus utilisé en Orient. Il est intégré dans les médecines traditionnelles asiatiques, sous forme de tisanes, de macérât alcoolique, en décoction ou sous forme de gélules, pour stimuler l'appétit, combattre l'insomnie, traiter les bronchites, l'hypertension, l'arthrite et calmer les nerfs. (Wasser, 2005). Il est également utilisé dans le traitement de l'asthme, les hépatites et certains cancers (Zjawiony, 2004).

Les textes, chants, récits mythiques et poèmes recueillis et compilés par Lapassat (2000), mettent en évidence une utilisation plusieurs fois millénaire. Selon les anciens textes Taoïstes, le Lingzhi qui signifie en chinois 'Plante magique' ou 'Plante des chamanes', était associé aux divinités et utilisés par les alchimistes pour la fabrication de l'élixir de longue vie. Les spécimens étaient recherchés en zone montagneuse, dans les forêts, parfois au bord des précipices. Sa récolte, proche du rite initiatique, était rare et les jours de cueillette étaient alors

fêtés. Il était considéré comme un ‘porte-bonheur’, et sa présence dans les foyers était très prisée. Il symbolisait, en effet, la longévité et sa consommation, qui selon la mythologie conférait l’immortalité, était presque exclusivement réservée aux empereurs et aux courtisanes.

Le premier manuscrit de matière médicale chinoise, appelé ‘Bencaojing’**,** traditionnellement attribué à l’empereur Shennong et composé sous la dynastie des Han au premier siècle de notre ère, distinguait six espèces de Lingzhi de couleur différente (le Lingzhi jaune, le Lingzhi noir, le Lingzhi bleu, le Lingzhi pourpre, le Lingzhi blanc et le Lingzhi rouge).

Cette classification est également retrouvée dans ‘Le Bencaogangmu’ appelé également ‘Compendium of Materia Medica’ écrit au XVIème siècle par le médecin Li Shi-zhen. Ce deuxième traité est intéressant puisqu’il compile la majeure partie des connaissances médicales accumulées à cette époque. Certaines sources provenaient soit de textes mythologiques ou de poèmes anciens soit de la littérature médicale de l’époque (Lapassat, 2000).

Dans ces deux traités, les différents lingzhi, excepté le lingzhi pourpre, étaient apparentés aux 5 saveurs, aux 5 éléments (terre, eau, feu, bois, métal), aux 5 vertus (bienséance, bienveillance, droiture, sagesse et fidélité), aux 5 organes (cœur, foie, rein, poumons et rate) et aux 5 montagnes sacrés. Chacun d’entre eux possédait une activité thérapeutique différente et se consommait sous forme de décocté ou de macérât alcoolique (Lapassat, 2000 ; Wasser, 2005).

Jusqu’au siècle dernier, les Lingzhi se récoltaient dans les endroits inaccessibles et en petites quantités mais depuis que leur culture a été rendue possible dans les années 70, leur popularité s’est accrue, ainsi que leur commercialisation. De nos jours, les spécimens apparentés au Lingzhi sont retrouvés fréquemment sur les marchés ainsi que dans les herboristeries de certains pays asiatiques, en particulier de Chine, mais aussi sur certains sites internet où ils sont vendus comme ‘compléments alimentaires’, sous forme de gélules ou en tisanes.

Après consultation des nombreux travaux relatifs à la recherche de substances bioactives à partir de ganodermes, le Lingzhi, auquel sont attribués les usages traditionnels en médecine, est assimilé le plus souvent à *Ganoderma lucidum* (Huie *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 1983).

B) Contexte taxinomique

Toutefois, 'Lingzhi' est aussi le nom chinois donné aux spécimens du genre *Ganoderma* (Paterson, 2006). La classification chinoise distingue, en effet, plusieurs groupes de Lingzhi. Par exemple, les Lingzhishu (vrai Lingzhi), correspondent au genre *Ganoderma* (64 espèces) et les Wangbaozhishu (Zhi avec spores en réseaux) correspondent au genre *Humphreya.*

De plus, le nombre d'espèces utilisé en Asie pour leurs propriétés médicinales ne se limite pas à un seul taxon. Par exemple, la pharmacopée chinoise assimile le *G. sinense* (Lingzhi pourpre) et le *G. lucidum* (Lingzhi rouge ou Chizhi) au nom traditionnel Lingzhi (Pharmacopée chinoise, 2000). De même, selon Wasser (2005) et Huie *et al.* (2004), parmi les espèces asiatiques réputées médicinales sont retrouvés : *G. tsugae* (Songshanlingzhi ou Lingzhi des pins et des sapins), *G. applanatum* (ancien Lingzhi), *G. capense* (Lingzhi rouge ou Chizhi), *G. tropicum, G. tenue* (Zhi mince aux stries serrées), *G. atrum* (Lingzhi noir) et *G. luteum* (Lapassat, 2000). D'ailleurs, *G. tsugae* serait l'espèce médicinale la plus commercialisée à Taiwan (Chen & Chen, 2002). Il n'est donc pas exclu que l'une de ces espèces soit également associée au mot Lingzhi. Si, enfin, nous prenons en considération l'hétérogénéité morphologique des *Ganodermataceae,* qui entraîne un nombre important de synonymes taxinomiques, il n'est pas impossible qu'une espèce mentionnée ci-dessus puisse correspondre à différents taxons de la classification traditionnelle.

A ce premier problème d'ordre taxinomique, relatif à l'identité de la ou des espèces de la classification traditionnelle correspondant au Lingzhi, vient se greffer un second problème également d'ordre taxinomique :

Pegler & Yao (1996), constatent des différences morphologiques entre les carpophores du *Ganoderma lucidum* d'Orient et celui d'Europe. De la même manière, des résultats de séquençage d'espace interne de transcription, situé entre les séquences codant pour l'ARN ribosomal (ITS) ont montré 1) que le *Ganoderma lucidum* d'Asie ne correspondait pas au taxon européen (*G. lucidum* (Curtis) P. Karst *sensu stricto* dont le type a été décrit à partir d'un spécimen anglais), 2) que les spécimens asiatiques apparentés au *G. lucidum* pouvaient être scindés en deux espèces différentes (Moncalvo, 1995) et 3) qu'une espèce apparentée au *G. lucidum* de Taïwan correspondrait à *G. multipileus* (Wang *et al.*, 2009). Le nom *Ganoderma lucidum,* utilisé dans la majorité des publications scientifiques, serait donc non

seulement un nom mal appliqué mais il constituerait, de plus, un complexe derrière lequel se cacheraient plusieurs taxons ou espèces distinctes.

Ainsi, l'assimilation du Lingzhi au *Ganoderma lucidum* ne constituerait-il pas une démarche trop hâtive risquant de générer une certaine confusion sur l'origine exacte des molécules bioactives issus de l'extraction des carpophores ?

C) Usages médicinaux actuels des polypores, en particulier du genre *Ganoderma*. Principes actifs connus.

Sans l'apparition de certains traitements majeurs du XXème siècle, comme la pénicilline ou la ciclosporine, issues des champignons inférieurs, les recherches pharmacologiques et chimiques actuelles menées sur les champignons supérieurs seraient dans le monde occidental certainement obsolète. De plus, les récents travaux asiatiques axés sur la recherche de substances d'intérêt pharmacologique à partir de champignons utilisés traditionnellement, ont contribué aujourd'hui à la popularité mondiale de certains champignons asiatiques et en particulier du Lingzhi. Sa renommée dans le traitement du cancer, en médecine traditionnelle, est telle qu'on le retrouve en tant qu'adjuvant des chimiothérapies anticancéreuses en Chine, au Japon, en Corée et à Taiwan. De plus, elle a contribué sans aucun doute à l'essor de son commerce en tant que complément alimentaire dans le monde entier. Ainsi, le chiffre d'affaire mondiale issu du commerce du *G. lucidum asiatique* en 2004 a été estimé entre 5 et 6 milliards de dollars (Zjawiony, 2004).

Cette nouvelle renommée incite, depuis peu, les chercheurs des pays occidentaux à s'intéresser au domaine de la pharmaco-mycologie. Aujourd'hui, en ce qui concerne les *Ganodermataceae*, la plupart des publications, quelques soit leur origine géographique, ont pour sujet les substances bioactives issues des spécimens asiatiques du genre *Ganoderma* et en particulier de l'espèce désignée sous le nom de *Ganoderma lucidum.* Les principaux axes de recherche de ces travaux ont porté sur le traitement de l'hypertension artérielle, des hépatites chroniques, de l'hypercholestérolémie, des pathologies inflammatoires, des pathologies infectieuses, du SIDA et du cancer (Paterson, 2006). Dès lors que la cancérologie est concernée, les propriétés antitumorales du *G. lucidum* asiatique ont été reliées à la

présence de certains composés, et plus particulièrement des triterpènes de type lanostane et des polysaccharides (Wasser, 2005).

Pour autant, à cause des problèmes taxinomiques évoqués ci-dessus, nous ignorons tout de la réelle identité de cette espèce.

Le premier objectif de ce travail a donc consisté à rassembler l'ensemble des travaux concernant l'activité antitumorale des spécimens du genre *Ganoderma*.

Puis, afin d'apporter des informations supplémentaires sur l'activité des espèces non asiatiques et pour la première fois sur des espèces néotropicales, le deuxième objectif de ce travail a été de répondre aux questions suivantes : 1) l'activité antiproliférative du *G. lucidum* européen est elle similaire à celle du *G. lucidum* asiatique, 2) est ce que certaines espèces Néotropicales possèdent également une telle activité, 3) si c'est le cas, est ce que ces propriétés sont liées à la présence de triterpènes de type lanostane au même titre que le *G. lucidum* ?

Pour cela, de nombreux spécimens du genre *Ganoderma* (sporophores), mais aussi d'autres polypores (voir liste des récoltes) ont été récoltés dans les Antilles françaises, puis identifiés sur des critères morphologiques mais aussi moléculaires. Ce travail sur le terrain fût également une opportunité pour établir un premier inventaire des *Ganodermataceae* des Antilles françaises que nous exposerons par la suite.

L'activité antiproliférative des extraits obtenus à partir des espèces néotropicales a été comparée avec celle d'un *G. lucidum* asiatique acheté sur le marché en Chine et d'un *G. lucidum sensu stricto* récolté en Vendée (F).

Les extraits méthanoliques des espèces néotropicales les plus actifs ont été étudiés par LC-ESI-MS et LC-ESI-MS^2. Leur profil chromatographique a été comparé à ceux des 2 spécimens désignés sous le nom de *G. lucidum* . Enfin, leur composé majoritaire a été isolé par technique chromatographique et chimique, identifié par LC-ESI-MS^2, IR et RMN, puis testé sur cellules cancéreuses humaines.

II) Composés antitumoraux retrouvés chez les polypores et en particulier chez le genre *Ganoderma*

Parmi les nombreux composés issus de l'extraction des polypores, les polysaccharides, les triterpènes de type lanostane, ainsi que certains stérols, seraient à l'origine de l'activité antitumorale du *Ganoderma lucidum*.

A) Les polysaccharides

Les basidiomycètes produisant un basidiome, appartenant aux champignons supérieurs, constituent une source importante de polysaccharides à activité antitumorale.

Pas moins de 651 espèces provenant de 182 genres hétéro- ou homobasidiomycètes ont été étudiées pour leurs polysaccharides antitumoraux (Wasser, 2002).

Les polysaccharides sont retrouvés dans le sporophore, les spores, le mycélium en culture, et le milieu de culture filtré de ces champignons. En règle générale, il y a plus de polysaccharides en quantité et en qualité dans le « fruit » du champignon que dans toutes autres sources de culture.

1) Structure des polysaccharides

(D'après Wasser, 2002 ; Lindequist *et al.*, 2005)

Ce sont des macromolécules, issues de la polymérisation de molécules de D-Glucose.

Chacune de ces molécules offre plusieurs possibilités de liaisons glycosidiques. Les polysaccharides possèdent donc une grande variabilité structurale, contrairement aux polypeptides et aux acides nucléiques constitués respectivement d'acides aminés et de nucléotides sur lesquels 2 possibilités de liaison seulement sont possibles (Wasser, 2002).

Ils représentent, avec la chitine, les principales macromolécules retrouvées dans la paroi cellulaire et forment la couche interne chitino-glucanique (Matthieu, 2006).

Les polysaccharides peuvent être de différentes natures :

Les β-D-glucanes (homopolysaccharides)

Ces polysaccharides sont retrouvés majoritairement après extraction et possèdent en général une chaîne linéaire principale de β-D-glucane unis entre eux par des liaisons β (1→3) et /ou β (1→4) avec des ramifications dont la liaison est de type β (1→6) (Figure 4).

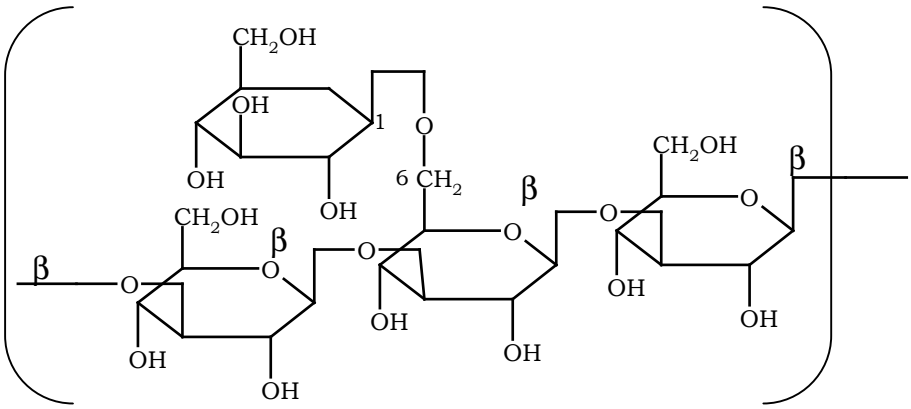


Figure 4 : formule semi-développée d'un β-D-glucane.

Entre 1970 et 1980, trois polysaccharides antitumoraux (Lentinan®, Schizophyllan® et Krestin®), extraits respectivement de *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune* et *Trametes versicolor*, sont devenus, au Japon, des spécialités pharmaceutiques utilisées comme traitement adjuvant de certains cancers, notamment le cancer des voies digestives, des poumons et du sein (Mizuno, 1999). Le Lentinan® et le Schizophyllan® sont de purs β-glucanes, tandis que le Krestin® est un polysaccharide-peptide ou glycoprotéine (PSK) ayant une structure polysaccharidique de type β-glucane (Ooi & Liu, 1999).

Les hétéroglucanes (hétéropolysaccharides) La structure principale est ici composée de β- ou α-D-glucane avec des ramifications secondaires composés de xylose, galactose, mannose, arabinose, ribose et acide glucuronique.

Les glycanes (homopolysaccharides)

Il s'agit de polysaccharides contenant des unités de sucres autres que le D-glucose dans leur chaîne principale. Ce sont les galactanes, fucanes, xylanes et mannanes.

Les chaînes d'hétéroglycanes (hétéropolysaccharides)

Elles présentent différentes combinaisons d'arabinose, mannose, fucose, galactose, xylose, acide glucuronique et glucose**.**

Par ex **:** les mannogalactanes, les xyloglucanes (*Pleurotus sajor-caju*).

Les glycoprotéines ou polysaccharides-peptidiques

Ce sont des chaînes de polysaccharides sur lesquelles viennent se greffer des chaînes de polypeptides ou petites protéines (Figure 5).

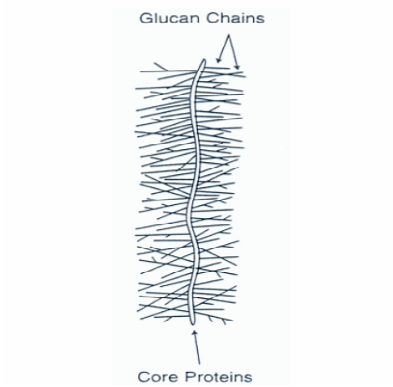


Figure 5 : structure moléculaire d'une glycoprotéïne fongique.

2) Relation structure activité des polysaccharides

Une forte activité antitumorale dépend (Wasser, 2002) :

- de la présence d'une chaîne majoritaire de type β (1→3)-glucane avec des ramifications dont la liaison est de type β (1→6) ;

• d’un poids moléculaire élevé ;

• d’une grande solubilité dans l’eau et d’un nombre restreint de chaînes ramifiées de type β-(1→6) (ou avec une fréquence de branchement faible) ;

• d’une conformation tertiaire en triple hélice des β-(1→3) glucanes (Figure 6).

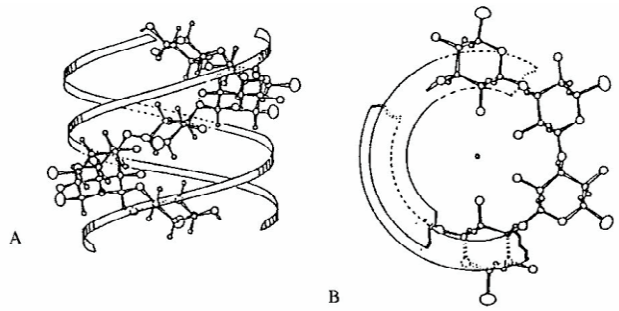


Figure 6 : Structure en triple hélice du (1→3)-β-D-glucopyranane (Marchessaault *et al.*, 1980).

3) Activité antitumorale au stade préclinique et clinique des polysaccharides

Les polysaccharides (β-D-glucanes, hétéropolysaccharides et glycoprotéines) isolés du *Ganoderma lucidum* et d’autres polypores ont démontré une activité antitumorale sur sarcome 180 implanté au niveau du péritoine sur souris (Miyazaki & Nishijima, 1981 ; Mizuno *et al.*, 1985). Une étude multicentrique randomisée en double aveugle a été réalisée en Chine afin d’évaluer l’efficacité clinique d’un traitement à base d’extrait de *Ganoderma lucidum* riche en polysaccharides sur des patients atteints d’un cancer avancé de la gorge. Les résultats ont montré sur 12 semaines de traitement *versus* placebo une diminution significative de la progression des lésions, une amélioration de la qualité de vie ainsi qu’une stimulation de l’immunité (Yihuai *et al.*, 2003).

4) Mécanisme d’action

Une étude synthétique réalisée par Zhang & Lin (1999) résume assez bien le mode d'action des polysaccharides et notamment d'un polysaccharide dénommé 'GL-B' extrait du *Ganoderma lucidum.*

Tout d'abord, celui-ci n'inhibe pas directement la prolifération de cellules leucémiques promyélocytaires chez l'homme, mais possède une activité antitumorale *in vivo* sur sarcome 180.

En revanche, un milieu de culture dans lequel ont été mis en contact des lymphocytes T et des macrophages avec le GL-B, inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules HL-60.

Les milieux de culture concernés, lorsqu'ils sont analysés, montrent par rapport au témoin (milieu sans GL-B) une concentration plus élevée en TNF-α et Interféron-γ, deux cytokines secrétées respectivement par les macrophages et les lymphocytes T et qui engendrent toutes les deux l'apoptose des cellules cancéreuses.

Il a été démontré que les β-D-glucanes induisent une réponse immunitaire en se fixant sur certains récepteurs membranaires de cellules de l'immunité (macrophages, Natural Killer).

Ces récepteurs de type CR3 sont naturellement dédiés à la fixation du facteur du complément C3b activé (iC3b) grâce à un site spécifique (CD11b) localisé sur le carbone terminal du domaine I (Gao *et al.*, 2004). Suite à cette fixation, il s'ensuit une activation de la phagocytose par les macrophages et du pouvoir cytotoxique des Natural Killers (NK). Ce mécanisme de défense naturelle de première ligne est actif sur les bactéries et autres agents pathogènes, mais insuffisant contre les cellules tumorales sur lesquelles se fixent les iC3b opsonisés. La cytotoxicité des NK, des granulocytes neutrophiles et des macrophages sur cellules cancéreuses peut être renforcée par la présence de β-D-glucan (Zaidman *et al*., 2005).

De même, il a été démontré que la structure β-D-glucan activait par le biais du récepteur TLR2 (Tool-Like Receptor) le NF-κB, facteur nucléaire impliqué dans la transcription de certains gènes codant pour la synthèse de cytokines immunostimulantes (Moradali *et al.*, 2007).

En complément de ces informations, il a été démontré que le polysaccharide GL-B induisait, au niveau de certaines cellules de l'immunité, l'expression des ARNm codant pour le TNF-α et l'IFN-γ (Zhang & Lin, 1999). Il a été démontré également une production de cytokines

telles IFN-γ et TNF-α par les NK stimulés par la fixation sur CR3 de l'association iC3b opsonisé-β-D-Glucan. (Ross *et al.*, 1999)

Le tableau ci dessous résume assez bien les mécanismes cellulaires et humoraux de l'immunité sollicités par les β-D-Glucanes et impliqués dans la destruction des cellules cancéreuses (Figure 7) (Moradali *et al.*, 2007).

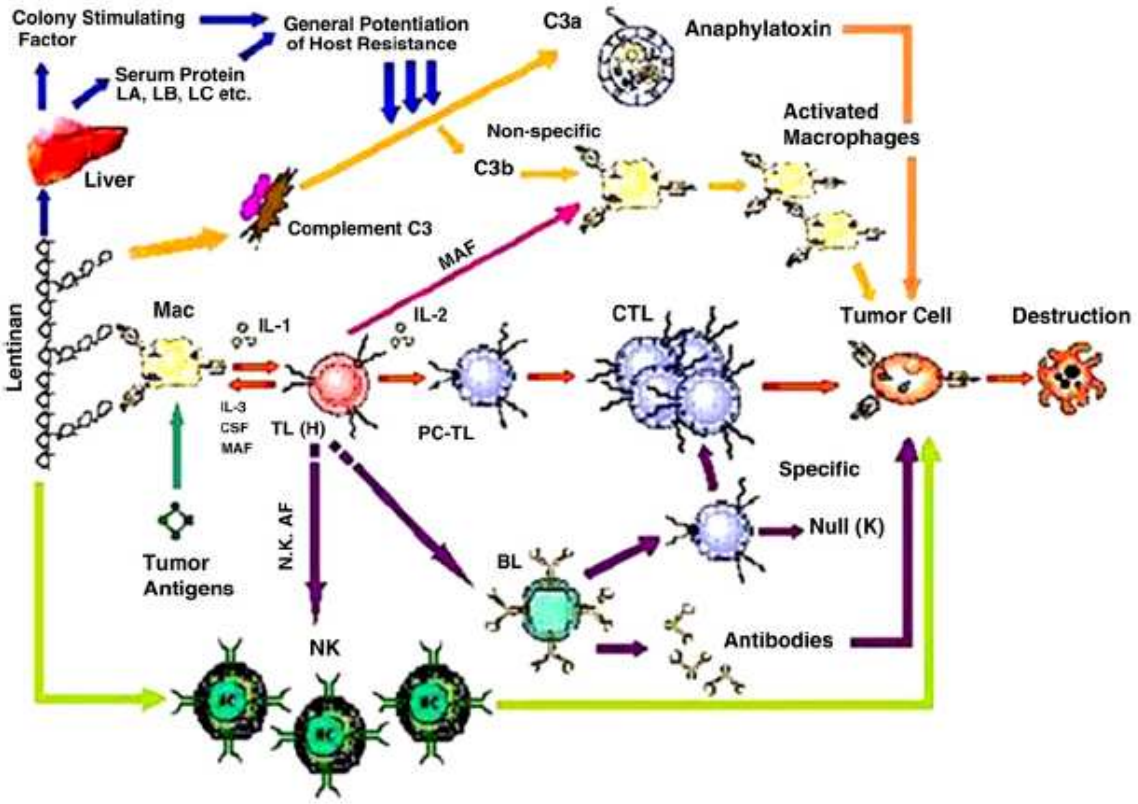


Figure 7: mécanismes cellulaires et humoraux de l'immunité sollicités par les β-D-Glucanes et impliqués dans la destruction des cellules cancéreuses (Moradali *et al.*, 2007)

B) Les terpènes et stérols fongiques

1) Origine et synthèse.

Les premiers terpènes isolés ont été obtenus à partir de la térébenthine d'où leur appellation, tandis que la racine 'ène' rappelle qu'il s'agit de composés insaturés.

La première étape de leur biosynthèse se situe au niveau de la formation de l'isopentenyl pyrophosphate (IPP : 7) et du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP : 8) par condensation de deux molécules d'acétyl CoA (Figure 8)

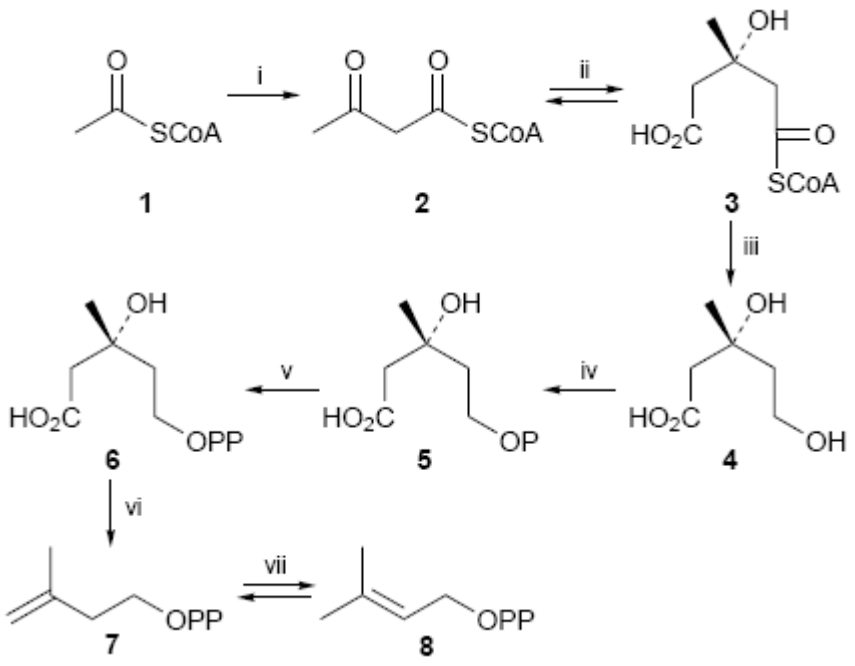


Figure 8: 1 : acetoacetyl –CoA thiolase ; **2** : (S)-3-hydroxy-3-méthyl glutanyl-CoA synthétase (HMG CoA synthétase) ; **3** : HMG CoA réductase ; **4 et 5** : Mévalonate kinase ; **6**: mévalonate 5 pyrophosphate décarboxylase (MPD) ; **7**: IPP isomérase (Brown, 1998).

Les terpénoïdes constituent un ensemble d'hydrocarbures cycliques ou à chaînes ouvertes, de formule brute $(C_{10}H_{16})_n$ ou n peut prendre différentes valeurs selon le nombre d'unité IPP assemblée :

-1 : monoterpènes => 2 unités isopréniques (C10 ; huiles essentielles, iridoïdes…)

-1,5 : sesquiterpènes => 3 unités isopréniques (C15 ; huiles essentielles, lactones sequiterpéniques…)

-2 : diterpènes => 4 unités isopréniques (C20)

-3 : triterpènes et stéroïdes => 6 unités isopréniques (C30 ; phytostérols, hétérosides cardiotoniques, acides ganodériques…)

-4 : tétraterpènes ou caroténoïdes => 8 unités isopréniques (C40)

En ce qui concerne la synthèse des stérols ainsi que des triterpènes de type lanostane, la deuxième étape est celle de la synthèse du squalène époxydé à partir des unités IPP et DMAPP (Figure 9)

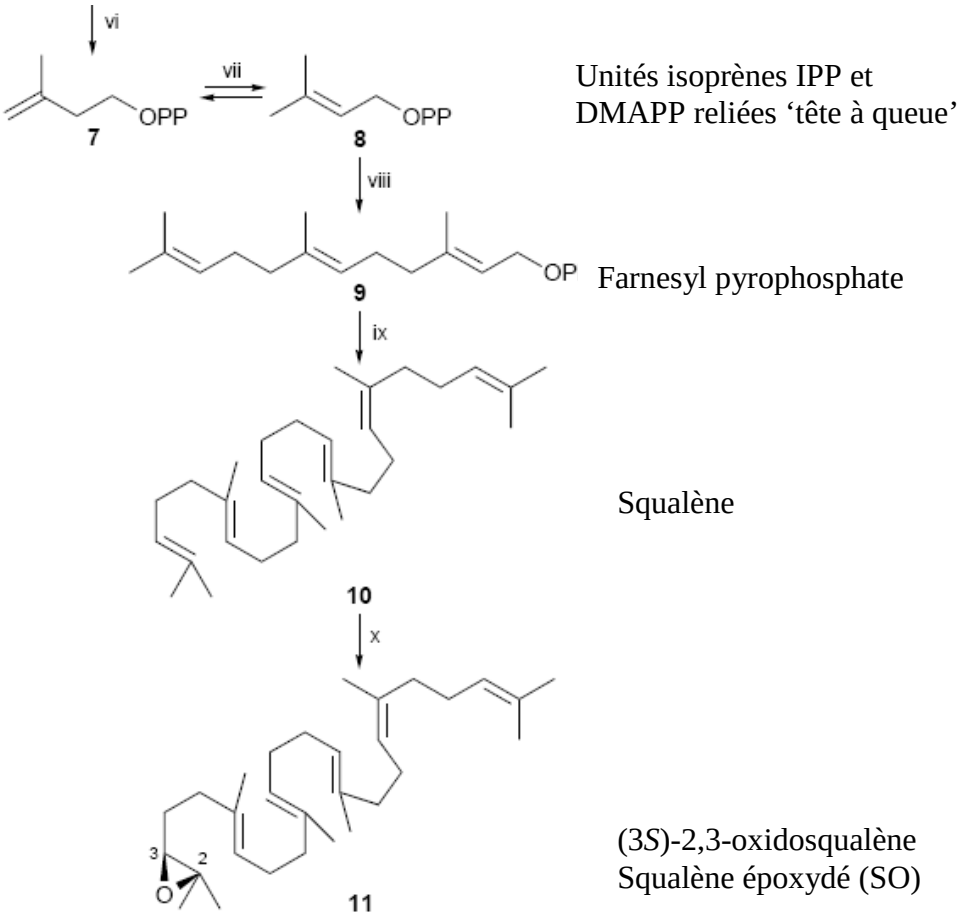


Figure 9 : 8: farnesyl pyrophosphate synthétase ; **9**: squalène synthétase (SQS) ; **10**: squalène epoxydase (SE) Brown (1998).

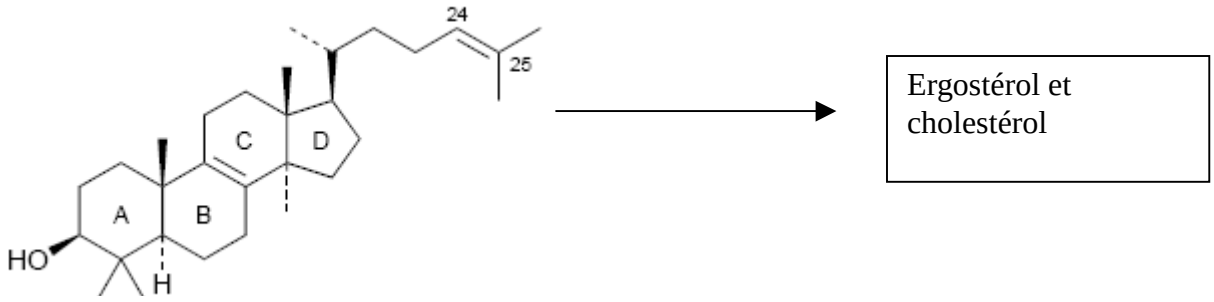
Ensuite, lors de la 3ème étape, le SO est métabolisé par l'oxidosqualène-lanostérol cyclase (OSC) en lanostérol (27) (précurseur de l'ergostérol et du cholestérol) dans le règne fongique et animal, et par l'oxidosqualène–cycloarténol cyclase (OSCC) en cycloarténol (voir figure 10) (précurseur du sistostérol et du stigmastérol) dans le règne végétal. Le cholestérol, dans le règne animal, est le précurseur des hormones stéroïdes, des sels biliaires et de la vitamine D

Il a été montré que le (3*S*)-2,3-oxidosqualène, Squalène époxydé (SO) était le composé intermédiaire dans la synthèse du 3α-hydroxylanostane, lui-même étant un composé intermédiaire dans la synthèse des acides ganodériques chez le *G. lucidum* (Brown, 1998). De même, en milieu de culture statique, une corrélation entre l'augmentation de la production d'acides ganodériques et l'augmentation de la transcription des gènes codant pour la synthèse de la HMGCoA réductase, de la squalène synthétase (SQS) et de l'OSC a été démontrée (Xu *et al.*, 2009).

La 14 α-déméthylase du cytochrome P450 (CYP51) se situe en amont de l'étape de la transformation du lanostérol en ergostérol. Cette première métabolisation est bien connue des pharmacologues puisqu'elle a donné naissance aux dérivés azolés utilisés comme antifongiques en médecine (kétoconazole, itraconazole etc…). Cette famille chimique a la propriété d'inhiber cette enzyme en se fixant sur l'atome de fer situé au centre de la structure hémique des cytochromes fongiques de type $P450_{14DM}$ (cours 'mastère drug design' 2008). Ce sont également des inhibiteurs des cytochromes humains P450 de type 3A4. C'est la raison pour laquelle de nombreuses interactions existent entre les dérivés azolés antifongiques et d'autres médicaments inhibant ou étant métabolisés par les cytochromes hépatiques ou intestinaux. C'est le cas des macrolides, des antirétroviraux (inhibiteur de protéase comme le lopinavir) ou des dérivés de l'ergot de seigle (Vidal 2006 et cours mastère drug design' 2008)

Il existe donc une affinité croisée des dérivés azolés pour les cytochromes fongiques de type $P450_{14DM}$ et les cytochromes humains P450 de type 3A4.

Ce même phénomène pourrait intervenir pour certains triterpènes de type lanostane d'origine fongique tel l'acide ganodérique A et le ganodériol. La forte métabolisation de ces triterpènes, à caractère lipophile, par les cytochromes P450, serait alors responsable de la faible biodisponibilité de ces composés administrés *per os* chez le rat (F= 0,1) (Hattori, 2001 ; Zhang *et a*l, 2009).



Lanostérol

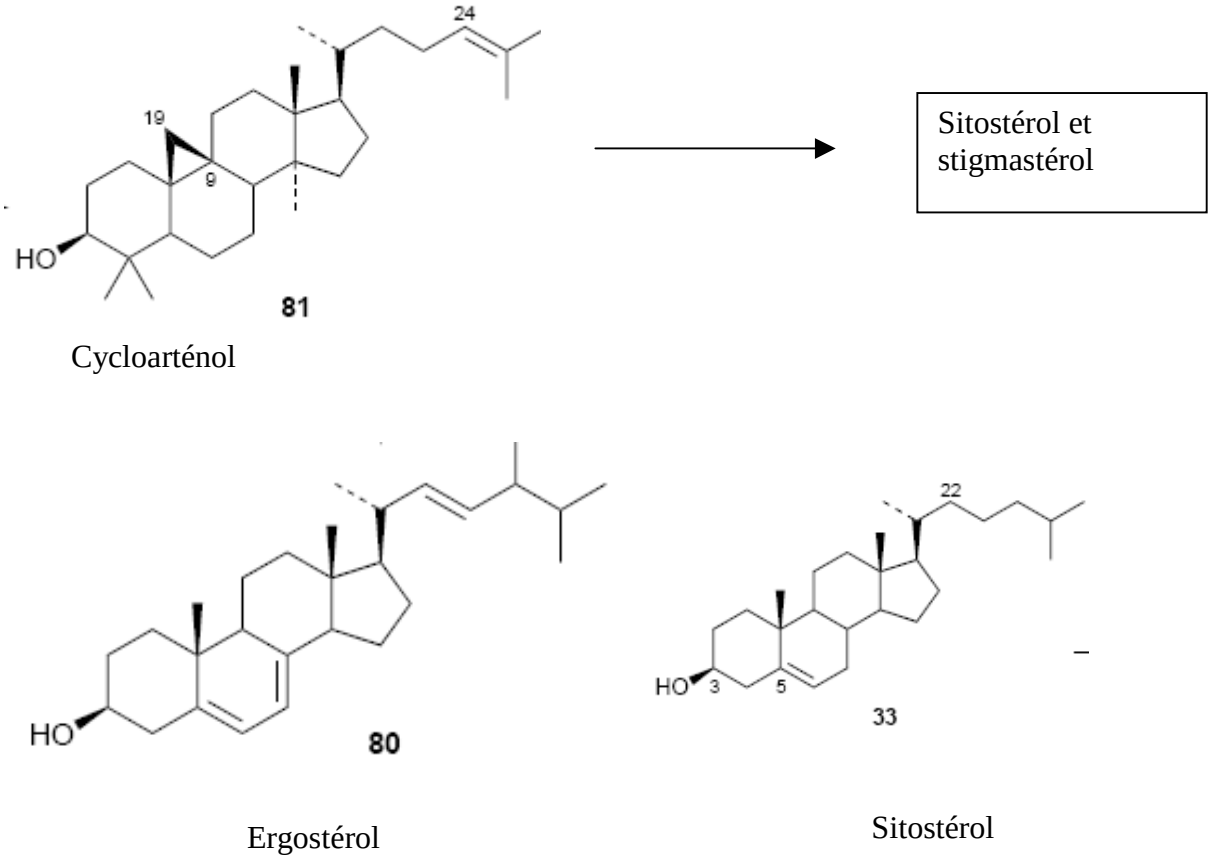
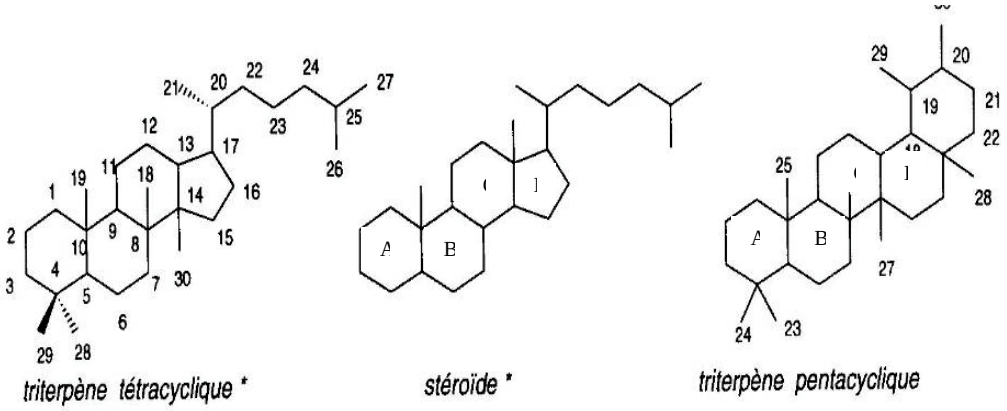


Figure 10 : voie de métabolisation du lanostérol et du cycloarténol (Brown, 1998)

2) Différences structurales entre les triterpènes tétracycliques de type lanostane et les stérols

Les triterpènes tétracycliques et les stérols ne présentent pas de différences structurales importantes. Ce sont des composés à 30 carbones issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3-squalène. Ils présentent presque toujours une hydroxylation en C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les stérols peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu trois méthyles (2 en C-4 et 1 en C-14) (figure 11)



3) Rôle

Figure 11 : 3 types de structure triterpénique (d'après Bruneton, 1999)

Chez les Eucaryotes, la synthèse des stérols est essentielle et permet de fournir les composés entrant dans la composition des membranes. Pour le règne végétal nous avons le sitostérol, pour les animaux, le cholestérol et pour le règne fongique, l'ergostérol. Tous les 3 sont issus de la cyclisation du squalène epoxydé qui résulte lui-même de la polymérisation de plusieurs molécules d'isopentenyl pyrophosphate (IPP). Toutefois, bon nombre de métabolites secondaires, tels les triterpènes de type lanostanoïde issus du *Ganoderma lucidum*, empruntent cette voie de synthèse.

Les métabolites secondaires terpéniques sont destinés à protéger la plante ou le champignon des différents agents agressifs extérieurs, en particulier des insectes, des bactéries et des champignons parasites. L'essence de térébenthine par exemple, constituée de monoterpènes, a des propriétés insecticides.

Par contre, les brassinostéroïdes que l'on peut considérer en partie comme appartenant à la classe des triterpènes, agissent sur la croissance de la plante et par conséquent sont des métabolites primaires. Il en est de même pour la gibbéréline qui est un diterpène.

Dans le règne fongique, les terpènes sont trouvés principalement sous forme triterpénique, dans les polypores particulièrement, et leur répartition dans le sporophore varie selon l'espèce étudiée. Pour le *Fomitopsis pinicola,* les triterpènes sont essentiellement localisés à la surface du basidiome et semblent être à l'origine de la formation du revêtement, que l'on peut aussi appeler 'la croûte'. Tandis que pour le *Ganoderma applanatum*, les triterpènes sont retrouvés de façon homogène dans le 'fruit' du champignon, y compris dans les spores. En revanche, la croûte de ce Ganoderme est essentiellement composée de dérivés de l'ergostérol parmi lesquels nous pouvons citer l'ergosta-7,22-dien-3-one (Rösecke & König, 2000). Leur rôle de protection serait donc double. D'une part, certains triterpènes, grâce à leur pouvoir antibiotique, protègent le carpophore d'une éventuelle contamination bactérienne (Ofodile, 2005) ; d'autre part, en formant la croûte coriace du *Fomitopsis pinicola*, les triterpènes constitueraient un rempart contre d'autres prédateurs mycophages (insectes, animaux).

3) Les triterpènes de type lanostane du genre *Ganoderma* et en particulier du *G. lucidum* asiatique en tant que métabolites secondaires.

(D'après Kim & Kim, 1999 ; Liu *et al.*, 2007)

Les premiers triterpènes isolés à partir du '*G .lucidum*' sont les acides ganodériques A et B. Ils proviennent de l'extraction alcoolique de la croûte du sporophore (Huie & Di, 2004). Les autres pour la plupart proviennent du sporophore entier, des spores ou du mycélium en culture. Ce sont des composés qui confèrent à la plupart des ganodermes leur amertume. Parmi eux, les acides ganodériques A et lucidéniques D1 sont les plus amers. Kim & Kim (1999) ont recensé 119 triterpénoïdes de type lanostane issus du *Ganoderma lucidum* selon des procédés d'extraction relativement homogènes. Ces auteurs les ont ensuite classés.

a) Extraction et purification

Dans la plupart des cas, les triterpènes sont extraits du chapeau à l'aide de solvants organiques. Les extraits secs méthanoliques, par exemple, sont mis en suspension dans l'eau puis repris par différents solvants de polarité croissante (Kohda *et al.*, 1985 ; Smânia *et al*, 1999). L'autre méthode consiste à isoler les triterpènes acides par une séparation liquide-liquide entre une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ et la solution chloroformique contenant l'extrait. La phase aqueuse est ensuite réacidifiée à pH = 3 ou 4, puis mise en contact avec du $CHCl_3$ (Hui & Di, 2004). Les fractions obtenues selon ces méthodes sont ensuite purifiées soit sur colonne chromatographique par un gel de silice, soit sur chromatographie en couche épaisse (CCE) ou alors en CLHP (HPLC) préparative ou semi-préparative phase inverse (RP) (Huie *et al*,2004)

b) Classification des triterpènes de type lanostane extraits de *G. lucidum* (d'après Kim & Kim, 1999) (Figure 12)

Les triterpènes de type lanostane du *Ganoderma lucidum* peuvent être séparés en 10 groupes selon le nombre de carbone qui constitue leur squelette (tous en possèdent 30 sauf le groupe IV et V), la position des doubles liaisons et leur degré d'oxydation.

Les triterpènes du groupe I possèdent 30 atomes de carbone et une double liaison entre le cycle B et C ($\Delta_{8\text{-}9}$). La structure de base de type lanostane est fortement oxydée (nombreuses fonctions carbonyles, carboxyles et alcools). Les composés appartenant à ce groupe sont les acides ganodériques (GA) A, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et O. Les acides ganolucidiques A, B, C, D et E, appartenant à ce groupe, se distinguent par l'absence de fonction OH ou carbonyle en R_2, tandis que l'acide ganosporerique A se caractérise par des fonction carbonyles sur les 4 premiers radicaux. Tous sont extraits du sporophore à l'exception du dernier, provenant de l'extraction des spores à l'éther. Les acides ganodériques I, L, N et O se singularisent par une hydroxylation sur le C-20, tandis que l'acide ganolucidique C est hydroxylé sur le C-29.

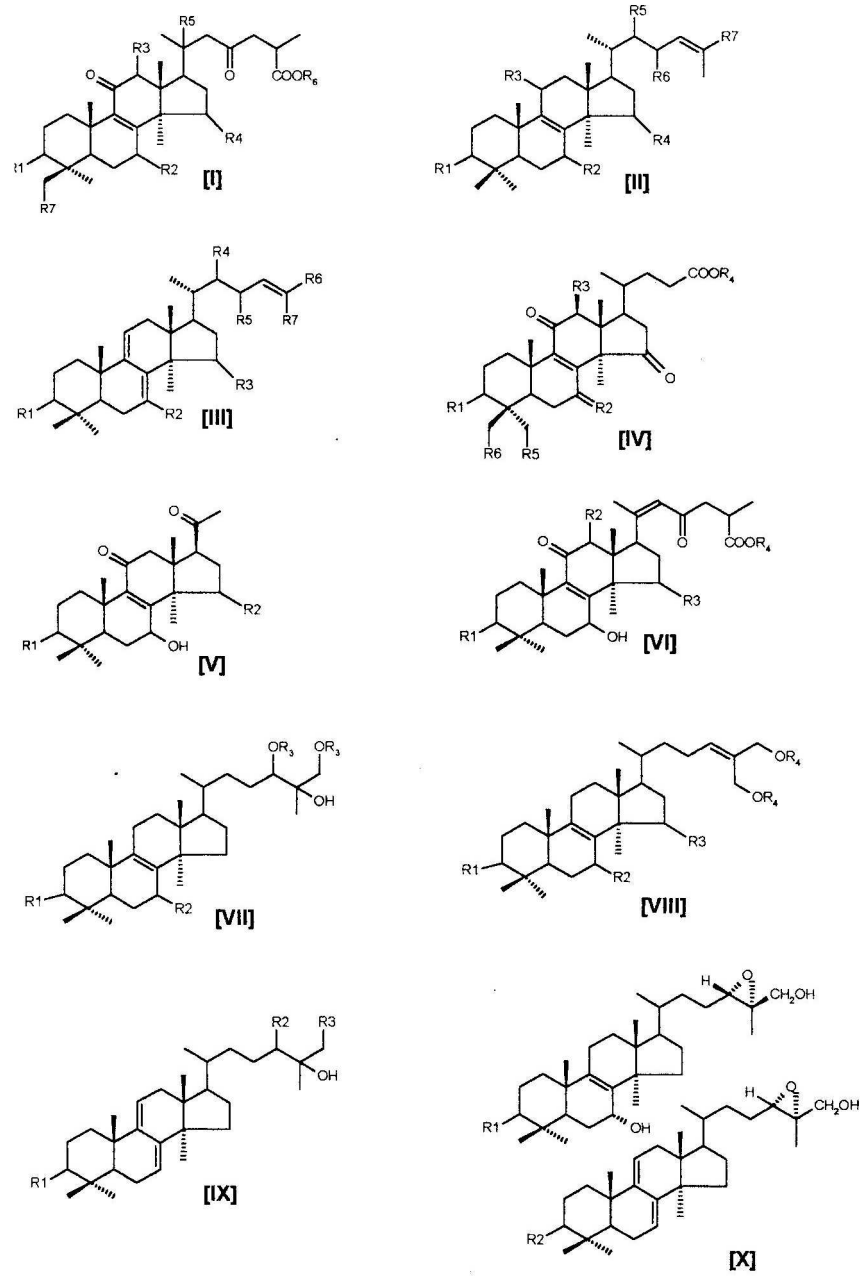


Figure 12 : les différents types de structure des triterpènes-lanostanes retrouvés chez le *G. lucidum* asiatique (Kim & Kim, 1999)

Les triterpènes du groupe II possèdent 30 atomes de carbones et 2 doubles liaisons, une située entre le cycle B et C ($\Delta_{8\text{-}9}$) et l'autre à $\Delta_{24\text{-}25}$ sur la chaîne latérale carboxylée et fixée sur le C-17. Les composés, appartenant à ce groupe, GA Ma, GA Mb, GA Mc, GA Md, GA Mg, GA Mh, GA Mi, GA Mj, une ou plusieurs fois acétylés au niveau de certaines fonctions

OH, ainsi que GA U, GA V, GA W et GA Z ont été extraits à partir de culture de mycélium. Les composés Ganoderal B et Aldéhyde ganodérique A, qui possèdent une fonction aldéhyde à l'extrémité de leur chaîne latérale, ont été extraits à partir du carpophore.

Les triterpènes du groupe III possèdent également 30 carbones, 3 doubles liaisons (2 sur le cycle B et C, 1 à $\Delta_{24\text{-}25}$). Certains proviennent de la culture de mycélium comme c'est le cas pour GA Me, Mf, Mk , P, Q, R, S, T, X, Y.... tandis que les ganodermenonol et ganodermadiol, appelés selon la nouvelle nomenclature ganodérols A et B, qui se caractérisent par une fonction alcool sur C-26, sont issus du sporophore.

Les triterpènes du groupe IV possèdent 27 atomes de Carbone et se différencient du groupe I essentiellement par une chaîne latérale en C-17 ne comportant que 5 carbones. On retrouve dans ce groupe les acides lucidéniques A, B, C etc…

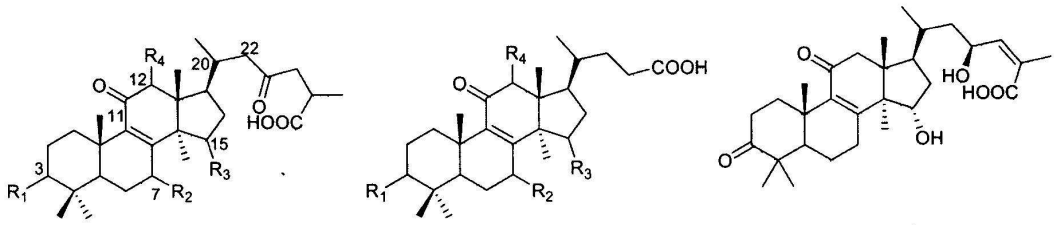
Les triterpènes du groupe V sont appelés Lucidone A, B et C et ne possèdent que 24 atomes de C et une fonction carbonyle en C-17

Les triterpènes du groupe VI possèdent 30 atomes de Carbone et une double liaison $\Delta_{20\text{-}22}$ qui les différencient du groupe I. Les composés de ce groupe sont appelés acides ganodéréniques (Gn)

Les triterpènes du groupe VII, VIII et IX possèdent 30 atomes de C, une ou plusieurs doubles liaisons aux niveaux des cycles, une double liaison supplémentaire $\Delta_{24\text{-}25}$ pour le groupe VIII ainsi que plusieurs fonctions alcools (parfois méthylé, ex : Ganodériol G et I) sur l'extrémité de leur chaîne latérale. Ils sont appelés Ganoderiols pour le groupe VII et VIII et ganodermanondiol et ganodermanontriol pour le groupe IX.

Les triterpènes du groupe X ont la particularité d'être époxydés sur leur chaîne latérale et de posséder une fonction hydroxyle sur le C-26.

c) Classification des acides triterpéniques en particulier des acides ganodériques extraits du *Ganoderma lucidum* asiatique par LC-ESI-MS^2 d'après Yang *et al.* (2007).



A B C

No.	Compound name	Type	R_1	R_2	R_3	R_4	Double bond	MW
1	12-hydroxyganoderic acid C_2	A	β-OH	β-OH	α-OH	OH	–	534
2	Ganoderic acid C_2	A	β-OH	β-OH	α-OH	H	–	518
3	Ganolucidic acid B	A	β-OH	H	α-OH	H	–	502
4	Lucidenic acid N	B	β-OH	β-OH	=O	H	–	460
5	Ganoderic acid C_6	A	β-OH	=O	=O	β-OH	–	530
6	3?-hydroxy-4,4,14-trimethyl-7,11,15-trioxochol-8-en-24-oic acid	B	β-OH	=O	=O	H	–	458
7	Ganoderic acid G	A	β-OH	β-OH	=O	β-OH	–	532
8	Ganoderenic acid B	A	β-OH	β-OH	=O	H	$\Delta_{20,22}$	514
9	Ganoderic acid B	A	β-OH	β-OH	=O	H	–	516
10	Lucidenic acid E	B	β-OH	=O	=O	β-OAc	–	516
11	Ganoderic acid AM_1	A	β-OH	=O	=O	H	–	514
12	Ganoderenic acid K	A	β-OH	β-OH	=O	β-OAc	$\Delta_{20,22}$	572
13	Ganoderic acid K	A	β-OH	β-OH	=O	β-OAc	–	574
14	7,15-dihydroxy-4,4,14-trimethyl-3,11-dioxochol-8-en-24-oic acid	B	=O	OH	OH	H	–	460
15	Elfvingic acid A	A	=O	=O	β-OH	α-OH	$\Delta_{20,22}$	528
16	Ganoderic acid A	A	=O	β-OH	α-OH	H	–	516
17	Ganoderic acid H	A	β-OH	=O	=O	β-OAc	–	572
18	12,15-bis(acetyloxy)-3-hydroxy-7,11,23-trioxo-lanost-8-en-26-oic acid	A	OH	=O	OAc	OAc	–	616
19	Ganolucidic acid A	A	=O	H	α-OH	H	–	500
20	12-hydroxy-3,7,11,15,23-pentaoxo-lanost-8-en-26-oic acid	A	=O	=O	=O	OH	–	528
21	Lucidenic acid A	B	=O	β-OH	=O	H	–	458
22	12-hydroxyganoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	OH	–	530
23	Ganoderenic acid D	A	=O	β-OH	=O	H	$\Delta_{20,22}$	512
24	Lucidenic acid F	B	=O	=O	=O	H	–	456
25	Ganoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	H	–	514
26	Lucidenic acid D	B	=O	=O	=O	β-OAc	–	514
27	Ganoderic acid F	A	=O	=O	=O	H	–	512
28	12-acetoxyganoderic acid D	A	=O	β-OH	=O	OAc	–	572
29	3-acetylganoderic acid H	A	β-OAc	=O	=O	β-OAc	–	614
30	Ganolucidic acid D	C	–	–	–	–	–	500
31	12-acetoxyganoderic acid F	A	=O	=O	=O	β-OAc	–	570
32	Ganoderic acid J	A	=O	=O	α-OH	H	–	514

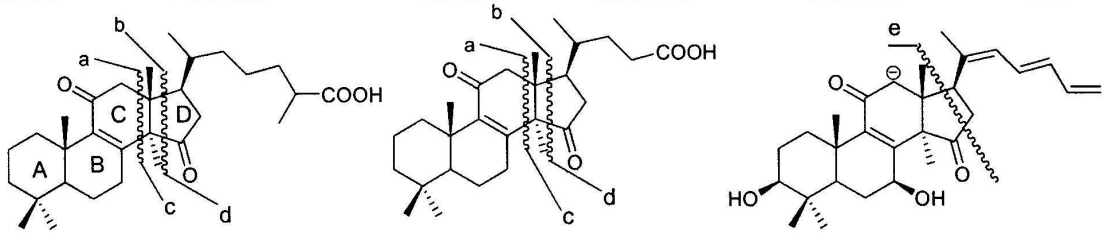


Figure 13 : différentes structures chimiques des triterpènes issus du G. lucidum asiatique. Type de fragmentation obtenu en LC-MS^2 selon les principales structures des composés (Yang *et al.*, 2007)

Selon Hui & Di (2004), les acides ganodériques ne sont retrouvés que chez le Lingzhi qu'ils apparentent au *G.lucidum.* En LC-ESI-MS^n, les acides ganodériques (figure 13 : A) majoritairement retrouvés dans les extraits méthanolique ou chloroformique de cette espèce (Yang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008), les acides lucidéniques (figure 13 : B) et ganolucidiques (figure 13 : C), peuvent être classés en 5 catégories selon leur type de fragmentation. Cette méthode préconisée par Yang *et al.* (2007) permet, grâce à l'étude des ions générés, non seulement de reconnaître plus de 30 triterpènes référencés, mais aussi l'identification de triterpènes inconnus.

En effet, tous les triterpènes acides du *G. lucidum* en ESI-MS mode négatif donnent les ions $[M-H]^-$ et $[2M-H]^-$, mais seuls les composés de troisième et de quatrième catégories (acétylés sur C-12) donnent l'ion $[M-H-H_2O]^-$ de manière intense sur le spectre de masse. Celui-ci diminue en cas de double liaison située en Δ_{20-22}, caractéristique des acides ganodéréniques.

Ce premier type de fragmentation révèle donc ici toute son importance puisqu'il permet déjà de différencier les composés de catégorie III (GA B, GA D, GA G, GA K et GnB) et IV (GA H, GA F, GA K…) des autres groupes.

Toutefois, en ESI-MS^n, la clef permettant d'identifier ces composés réside dans le mode de fragmentation des cycles du noyau lanostane (Figure 13).

Pour le groupe I, contenant les composés hydroxylés en C-7 et C-15, nous obtenons les fragments **b, b-1, b-2 et b-16** issus de la fragmentation du cycle D. Sur le spectre de masse, cela se traduit par l'apparition d'un triplet caractéristique de ce groupe. Par exemple l'acide GA A donne 299, 300, 301 *m/z.*

Si la fonction alcool en C-15 est oxydée en fonction carbonyle, comme c'est le cas des composés de catégorie III nous obtenons une prépondérance de fragment **a,** issu du clivage du cycle C. Si, pour ce groupe, le C-12 situé sur cycle C est hydroxylé, nous obtenons la masse **a+16** (16 Da correspondant à la masse de O). Par exemple pour GA B nous obtenons pour **a** la masse à *m/z* 249 et pour GA G (correspondant à GA B hydroxylé en C-12) la masse **a** à *m/z* 265.

Les composés de catégorie II possèdent 2 fonctions carbonyle en C-7 et C-15. Ils ont pour caractéristique de donner majoritairement $[M-H-H_2O]^-$ ainsi que $[M-H-H_2O-CO_2]^-$. Par contre, les cycles C et D se fragmentent difficilement et ne donnent que le fragment **a+2**. Ce qui est le

cas pour GA AM_1 pour lequel nous obtenons un faible signal égal à 249 *m/z* en plus des ions $[M-H-H_2O]^-$ à *m/z* 495 et $[M-H-H_2O-CO_2]^-$à *m/z* 451.

En ce qui concerne les composés de catégorie IV, caractérisés comme ci-dessus par 2 fonctions carbonyle, les caractéristiques changent du fait que l'acétylation de la fonction OH situé en C-12, entraîne la formation du fragment ionisé $[M-H-H_2O-CO]^-$ correspondant à une perte de masse de 42 Da. Ainsi GA H, composé de quatrième catégorie et de masse molaire 572 $g.mol^{-1}$, génère l'ion $[M-H-H_2O]^-$ à *m/z* 553, l'ion $[M-H-H_2O-CO]^-$ à *m/z* 511 ainsi que l'ion $[M-H-H_2O-CO-CO_2]^-$ à *m/z*467. Ce dernier, par MS-ESI-MS^4, donne 2 fragments b+2-H_2O et b+2-H-CH_3 à *m/z* respectifs 301 et 303.

Enfin, les composés de classe V correspondant aux acides lucidéniques, similaires aux acides ganodériques, exceptée la chaîne latérale en C-17, se reconnaissent surtout par la perte d'une molécule d'acide acétique, soit une perte de masse 60 Da, qui entraîne la formation d'un ion prédominant sur le spectre correspondant à $[M-H-CH_3COOH]^-$.

d) Activités antiprolifératives des triterpènes de type lanostane du genre *Ganoderma* (*G. lucidum*)

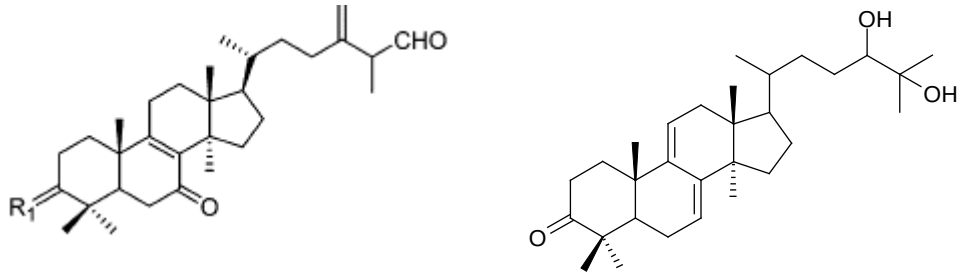
Parmi les nombreuses activités biologiques de ces triterpènes on retrouve une activité antitumorale, hypotensive, hépatoprotectrice, antioxydante, hypolipémiante, anti-inflammatoire, anti-infectieuse etc. (Paterson, 2006). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'activité antitumorale des triterpènes des *Ganodermataceae*.

d-1) Cytotoxicité directe (*G. lucidum)*

- Les acides ganodériques W, X, Y, V et Z à 100 µM, ont un net pouvoir cytotoxique sur des cellules cancéreuses d'origine hépatique (cellules d'hépatome HTC) cultivés in vitro (Toth *et al.*, 1983).

- Parmi plusieurs triterpènes de type lanostane (lucialdéhydes A, B et C, ganodermanondiol, ganodermanontriol, acides ganodériques A et C1) testés *in vitro* sur cellules cancéreuses de

type Sarcome 180, sur sarcome murin Meth-A et sur cancer pulmonaire de Lewis LLC, le lucialdéhyde C et le Ganodermanondiol (figure 14) présentent la plus forte activité antiproliférative avec respectivement des CI_{50} 10,7 et 14 µg.ml^{-1} sur LLC ; 7,1 et 11 µg.ml^{-1} sur S 180 ; 3,8 et 9,2 µg.ml^{-1} sur Meth-A (Gao J-J *et al.*, 2002).

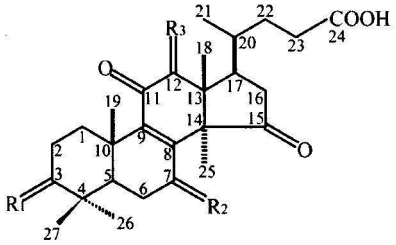


R_1 =αH, OH

Figure 14 : Lucialdéhydes C (à gauche) et le Ganodermanondiol (à droite)

- L'acide ganodérique E ainsi que les acides lucidéniques N et A présentent une activité antiproliférative significative et assez puissante sur cellules de type HepG2, HepG2,2,15 provenant d'hépatocarcinome humain (les CI_{50} respectives sont de 1,44 x 10^{-4} ; 2,06 x 10^{-4} et 1,64 x 10^{-4} µM pour HepG2, 1,05 x 10^{-4} ; 1,66 x 10^{-4} et 2,04 x 10^{-4} µM pour HepG2,2,15) (Wu *et al.*, 2001 et Zjawiony, 2004).

Toutefois, les tests MTT effectués par l'équipe de Gow-Chin Yen au département de 'Food Science and biotechnology' (Taïwan) (Hsu *et al.*, 2008) contredisent cette forte activité sur HepG2 puisqu'une CI_{50} non significative comprise entre 100 et 200 µM a été obtenue pour les acides lucidéniques A et N. En revanche, les acides lucidéniques A, B, C, N ont présenté respectivement une CI_{50} de 61 ; 19,3 ; 45 ; 64,5 µM sur HL60 (figure 15).



Lucidenic acid A	R_1=O, R_2=β-OH, R_3=H
Lucidenic acid B	R_1=O, R_2=R_3=β-OH
Lucidenic acid C	R_1=R_2=R_3=β-OH
Lucidenic acid N	R_1=R_2=β-OH, R_3=H

Figure 15 : structure des acides lucidéniques A, B, C, N (Weng *et al.*, 2007)

- A partir de l'extraction de spores de *G. lucidum*, plusieurs acides ganodériques γ, δ, ε, ζ, 0, η et θ appartenant au groupe II (Kim & Kim, 1999) ont été isolés (Min *et al.*, 2000). Leurs principales caractéristiques chimiques résident dans l'hydroxylation du C-23 et dans la possession d'une double liaison située sur $\Delta_{24\text{-}25}$. Pour le reste, R_1, R_2, R_4 correspondent à (–OH) ou (=O), R_3 à (=O) et la chaîne latérale possède à son extrémité une fonction carboxylique comme les acides ganodériques du groupe I (Kim &Kim, 1999). Leur activité antiproliférative a été testée sur Meth-A issus de sarcome murin et LLC issus de cancer pulmonaire de Lewis puis comparées avec d'autres acides ganodériques ou Ganodérols. Sur la lignée cellulaire Meth A, GA G, Ganodériol F, Ganodermanondiol, ganodermanontriol, lucidumol A et B ont montré une cytotoxicité de $CI_{50} < 10 \mu g.ml^{-1}$, tandis que les acides ganodériques (GA A, GA B, GA C1, GA G, GA C6, acide ganolucidique A ainsi que les acides ganodériques γ, δ, ε, ζ, 0, η et θ) n'ont pas montré d'activité significative. Parmi les Ganodérols, le Ganodermanondiol possède l'activité la plus forte avec une $CI_{50} = 3{,}4 \mu g.ml^{-1}$. Sur lignée cellulaire LLC, le Ganodériol F, le Ganodermanontriol et le lucidumol A ont montré respectivement une CI_{50} significative de 2,3 ; 6 et 9,6 $\mu g.ml^{-1}$. Tandis que l'acide ganodérique C1, l'acide ganolucidique A et l'acide ganodérique θ ont montré une activité modérée de valeur respective : 17 , 15,5 et 15,2 $\mu g.ml^{-1}$. Ces résultats, selon Hattori, révèleraient une activité antiproliférative plus importante des triterpènes hydroxylés sur leur chaîne latérale par rapport aux acides ganodériques (Hattori, 2001).

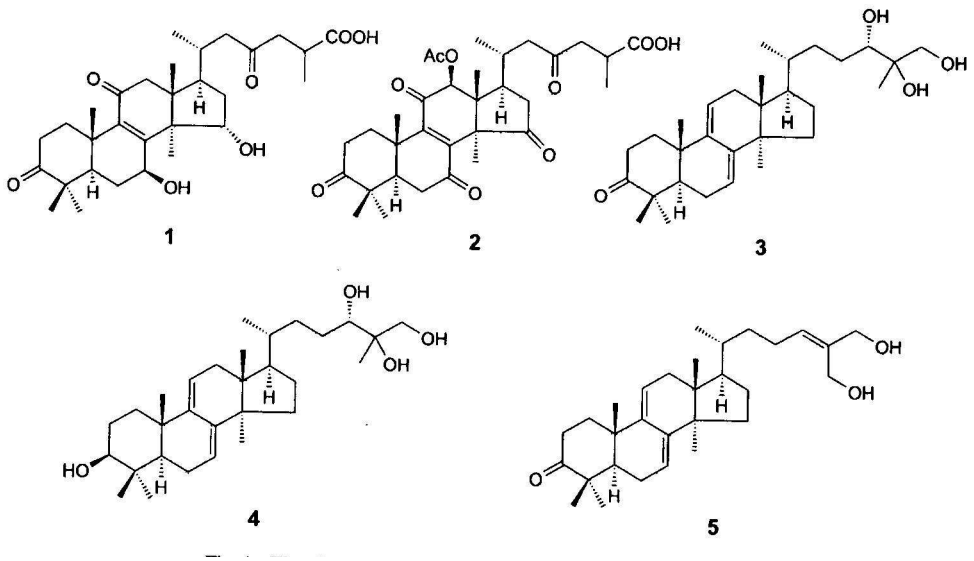


Figure 16 : 1, GA A ; 2, GA F ; 3, ganodermanontriol ; 4, ganoderiol A ; 5, ganoderiol F (Liu *et al*., 2009)

d-2) Cytotoxicité directe pour les autres espèces du genre *Ganoderma*

- A partir d'un extrait éthanolique de *G. concinnum* le 5α-lanosta-7,9 (11), 24-triene-15α,26-dihydroxy-3-one (figure 17) a montré une inhibition de prolifération égale à 15,7 ± 4,6 µM sur cellules leucémiques de type HL-60 (Gonzáles *et al.*, 2002)

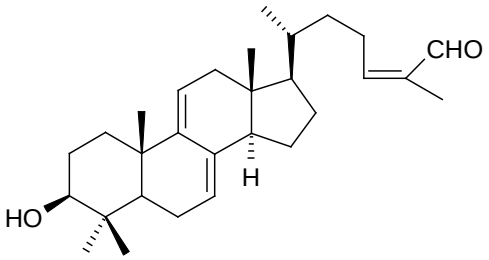


Figure 17 : structure du 5α-lanosta-7,9 (11), 24-triene-15α,26-dihydroxy-3-one

- Du *G. tsugae*, plusieurs triterpènes de type lanostane ayant une activité antiproliférative ont été extraits. L'acide tsugarique A et l'acide 3β-hydroxy-5α-lanosta-8,24-diène-21-oïque ont montré une activité significative sur cellules cancéreuses avec respectivement une CI_{50} de 3,1 et 4,4 µg.ml^{-1} sur T-24 ; 3,5 et 6,2 µg.ml^{-1} pour le deuxième composé sur HT 3 et CaSKi.

Tandis que le tsugarioside A (figure 18) possède une CI_{50} de 1,73 µg.ml^{-1} sur T-24 (Su *et al.*, 2000)

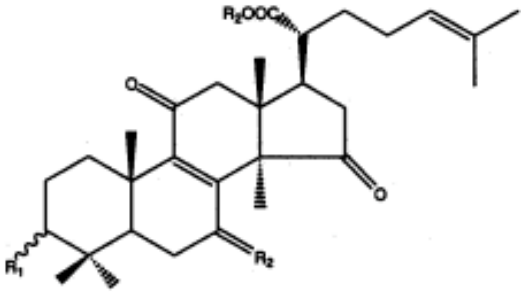


Figure 18: structure du tsugarioside A, R1 = αOAc ; R2 = β-D-glucosyl ; acide tsugarique A : R1 = αOAc ; R2 = H ; acide 3 β-hydroxy-5α-lanosta-8,24-diène-21-oique : R1 = βOac ; R2 = H (Su *et al*., 2000)

- Du ***G. applanatum*** (Yoshikawa *et al.*, 2002), le méthyl elfvingate H (figure 19) a montré une nette cytotoxicité sur les cellules Kato III (IC50 = 1.1 µg/mL) et ECA (IC50 = 1.1 µg/mL).

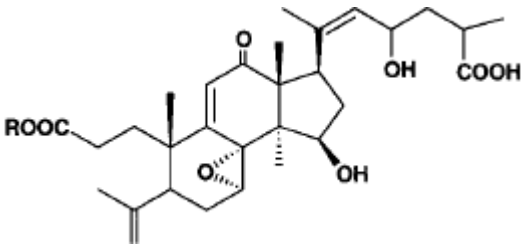


Figure 19 : structure du méthyl elfvingate H, R = Me

d-3) Mécanisme d'action ou action ciblée des lanostanoïdes principalement extrait du *G. lucidum* asiatique. Discussion sur leur Relation Structure Activité

- Ganoderma lucidum : inhibition de la protéine Farnesyl Transférase (FPT)

Les protéines Ras sont impliquées dans la régulation de la division cellulaire, la différenciation, l'organisation du cytosquelette et le trafic membranaire. Elles interviennent dans la cascade SOS-Ras-Raf-MAPK. Pour de nombreuses tumeurs, des mutations oncogéniques de la protéine Ras, responsable de la prolifération cellulaire incontrôlée sont mises en évidence. En effet, environ 30% des cancers produisent des protéines Ras mutées qui restent bloquées dans un état activé. Ces protéines doivent être fixées à la membrane plasmatique pour être actives. Pour cela, elles subissent des modifications chimiques post-traductionnelles, dont une farnésylation sur un résidu de cystéine par une farnésyltransférase (FPTase) qui reconnaît le motif CAAX porté par l'extrémité C-terminale de Ras. Les inhibiteurs de la FPTase permettent de conserver la protéine Ras dans sa forme immature et donc biologiquement inactive. L'extrait de *Ganoderma lucidum* inhibe la FTPase (IC50 = 100 µM) en concurrence avec le substrat FPP (farnesyl pyrophosphate) (Lee, 1998). Le méthyl ester de l'acide ganodérique A (figure 20) est actif à une concentration de 38 µM (Lee *et al.*, 1998).

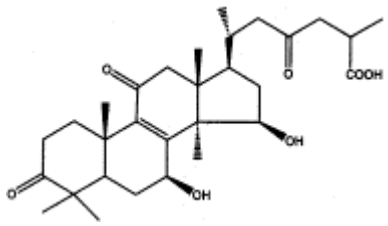


Figure 20 : Acide ganodérique A (Zaidman *et al.*, 2005).

-Ganoderma lucidum : Inhibition du facteur de transcription NF-κB (Sliva *et al.*, 2002 ; Jiang *et al*., 2008)

Le NF-κB est un facteur de transcription de gène impliqué :

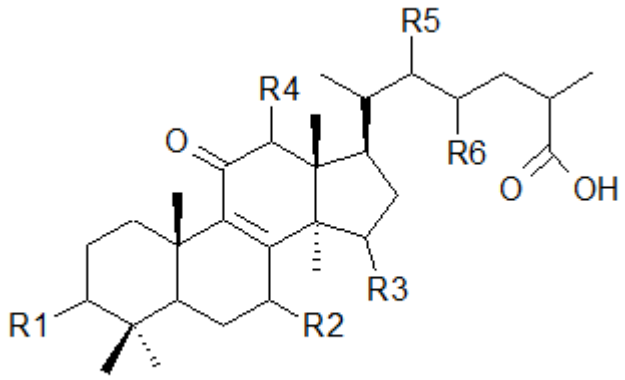
- dans les mécanismes du cycle cellulaire en favorisant l'expression de Cdk4 et par conséquent : la formation du complexe Cycline D1 / Cdk4 ;

- dans le processus inflammatoire lié à la croissance tumorale en favorisant l'expression de cyclooxygénase-2 ;

- dans la néo-vascularisation des tissus tumoraux en favorisant l'expression de facteur de croissance du tissu endothélial vasculaire ;

- mais aussi dans le processus de protéolyse de la matrice extracellulaire en favorisant l'expression de l'urokinase-type plasminogen activator (uPA).

Ces deux derniers phénomènes participent au caractère invasif des cellules tumorales et donc à la dissémination métastatique qui est un facteur de mauvais pronostics. Sliva *et al*. (2002) a, tout d'abord, montré que les extraits de *G. lucidum* enrichis en triterpènes inhibaient la croissance de cellules mammaires humaines cancéreuses et métastatiques de type MDA-MB-231. L'effet antiprolifératif a été obtenu par l'intermédiaire de l'inhibition de l'activation du facteur NF-κB et en conséquence par la diminution de l'expression de Cdk4. Ce qui s'est traduit par l'arrêt du cycle cellulaire au stade G_0/G_1 (Jiang *et al.*, 2008). Il a été démontré ensuite que GA A et GA H était à l'origine de cette inhibition de la même manière qu'il a été démontré que l'acide ganodérique T induisait l'arrêt du cycle cellulaire (Tang *et al.*, 2006) au stade G_0/G_1 sur cellules pulmonaires humaines cancéreuses et métastatiques. De plus, ces acides ganodériques, en inhibant l'activation de NF-κB et d'AP-1 (autre facteur de transcription impliqué dans l'apparition de tumeurs), inhibent l'expression d'uPA réduisant ainsi le risque de survenue de métastases dans le cancer du sein. Par contre, l'acide ganodérique GA F qui se différencie de GA A et GA H (voir figure 21) par l'absence de groupement hydroxyle, n'a pas montré de pouvoir d'inhibition. L'auteur conclut donc que plus les acides ganodériques sont hydroxylés, plus ils ont la capacité d'inhiber l'activation de NF-κB (Jiang *et al.*, 2006).



Nom du composé	R1	R2	R3	R4	R5	R6

acide ganodérique A	=O	β-OH	α-OH	H	H	=O
acide ganodérique F	=O	=O	=O	β-OAc	H	=O
acide ganodérique H	β-OH	=O	=O	β-OAc	H	=O

Figure 21 : structure de l'acide ganodérique A, F et H

De la même manière, il a été montré que l'acide lucidénique B inhibait l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 par

- l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2,

- l'inhibition de l'activité du facteur Iκκ,

- ou par le biais de l'augmentation de l'expression de IκBα.

Ces 3 mécanismes transductionnels proviennent de l'activation de la protéine kinase C ; elle-même activée par le facteur MAP (phorbol-12-myristate-13-acétate). Elles ont pour conséquences l'induction de transcription du gène codant pour l'enzyme MMP-9 (métalloprotéases matricielles).

En ce qui concerne le facteur NF-κB, celui-ci est maintenu dans la cellule sous une forme inactivée par une protéine inhibitrice : l'IκBα.

L'activation de ce facteur de trancription nécessite donc l'élimination de cette protéine par un phénomène de phosphorylation réalisée par des sérines kinases appelés Iκκ (figure 22) elles mêmes activé par la PKC.

Les métalloprotéases matricielles de type MMP-9 ou gélatinase-B agissent par la dégradation des protéines des membranes basales. La membrane basale ainsi que le stroma interstitiel constitue la matrice extracellulaire dont le rôle est de diviser les comportements tissulaires. La dégradation de celle-ci, déclenchée par l'expression du gène codant pour MMP-9, est en partie responsable du caractère invasif des cellules tumorales, notamment celles qui ont été utilisées dans cette article : les HepG2 (Weng *et al.*, 2008 ; Rivière, 2006). L'acide lucidénique B en inhibant les facteurs de transcription NF-κB et AP-1, inhiberait ainsi l'expression de MMP-9 ce qui réduirait le caractère invasif des cellules tumorales de type HepG2.

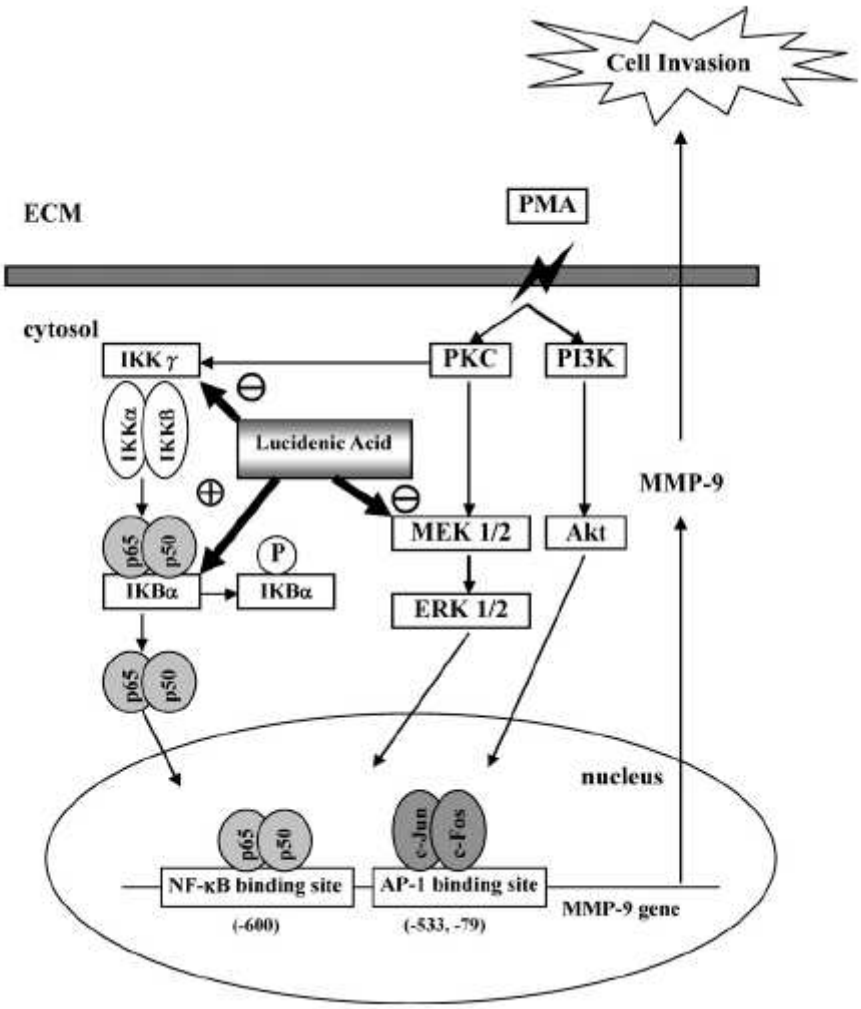


Figure 22 **:** mécanisme transductionnel, activé par le facteur MPA et inhibé par l'acide lucidénique B, responsable du caractère invasif des cellules $HepG_2$ (Weng *et al.*, 2008)

Ganoderma lucidum : Inhibition enzymatique (5α-réductase)

A partir du *G. lucidum*, plusieurs triterpènes ont été testés pour leur activité inhibitrice sur la 5α-réductase. Cette enzyme intervient dans la transformation de la testostérone en 5α-dihydrotestostérone, molécule indispensable dans le développement des organes génitaux, la pilosité et la croissance des tissus prostatiques. Toutefois, elle est responsable, en cas d'augmentation anormale des concentrations, d'hypertrophie ou de cancer de la prostate. Ainsi, le Finastéride, puissant inhibiteur de la 5α-réductase, est une molécule très utilisée dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

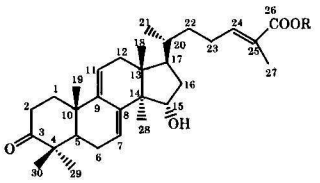
En ce qui concerne les triterpènes possèdant un pouvoir inhibiteur sur cette enzyme, on retrouve les acides ganodériques et les ganodérols. Parmi les ganodérols, les composés possédant une double liaison $\Delta_{24\text{-}25,}$ comme le ganodériol F ou le 5α-lanosta-7,9(11),24-triène-15α,26-dihydroxy-3-one, sont plus actifs que les autres composés testés. Ensuite, parmi les composés ayant une double liaison $\Delta_{24\text{-}25}$, ceux ayant une fonction carboxylique en bout de chaîne (fixée sur C-17) comme GA DM et GA T (figure 23) sont plus actifs que celles ayant une fonction hydroxyle (Ganodérols). Le potentiel inhibiteur de ces 2 acides s'accroît lorsque le pH augmente, ce qui indique que les triterpénoïdes acides agissent préférentiellement sous forme anionique.

Deux théories, établies sur la relation structure-activité des acides ganodériques, expliqueraient l'inhibition de la 5α-réductase.

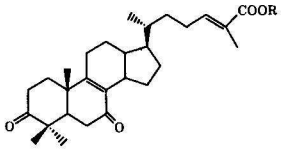
La première considère que la présence d'une double liaison $\Delta_{24\text{-}25}$ située en α et β de la fonction carboxylique à l'extrémité de la chaîne latérale mimerait la partie comprise entre C-3 et C-5 du cycle A de la testostérone.

La deuxième analogie structurale proviendrait de la carbonylation des triterpènes en C-3 qui est aussi caractéristique de la testostérone. Il a été montré en effet qu'une fonction carbonyle en C-3, comme c'est la cas pour GA DM, GA T et le 5α-lanosta-7,9(11),24-triène-15α,26-dihydroxy-3-one, augmentait l'activité inhibitrice des triterpènes. Les acides ganodériques T et DM, possédant les 2 conditions, constitueraient ainsi des ligands compétitifs de la testostérone et inhiberaient sa transformation, par la 5α-réductase, en DHT.

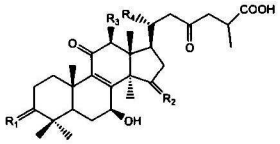
Ces théories restent encore maintenant au stade des suppositions car le mécanisme n'est pas encore réellement connu. Les CI_{50} de GA DM, GA T et 5α-lanosta-7,9(11),24-triène-15α,26-dihydroxy-3-one sur la 5α-réductase sont respectivement de 10,6 ; 8,6 et 41,9 µM, celui du finastéride est de 0,73µM (Liu *et al.*, 2006)



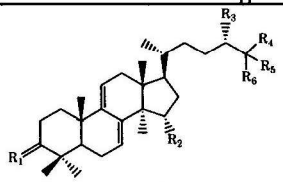
ganoderic acid TR (**1**)
methyl ester of **1** (**14**)



ganoderic acid DM (**2**)
methyl ester of **2** (**15**)



constituent	R_1	R_2	R_3	R_4
ganoderic acid A (**3**)	O	H, OH	H	H
ganoderic acid B (**4**)	OH, H	O	H	H
ganoderic acid C2 (**5**)	OH, H	H, OH	H	H
ganoderic acid D (**6**)	O	O	H	H
ganoderic acid I (**7**)	OH, H	O	H	OH



constituent	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
5α-lanosta- 7,9(11),24- triene-15α,26- dihydroxy-3-one (**8**)	O	OH	$\Delta^{24(25)}$		CH_2OH	CH_3
ganoderol B (**9**)	OH, H	H	$\Delta^{24(25)}$		CH_2OH	CH_3
ganodermatriol (**10**)	OH, H	H	$\Delta^{24(25)}$		CH_2OH	CH_2OH
ganodermanontriol (**11**)	O	H	OH	OH	CH_2OH	CH_3
ganoderiol A (**12**)	OH, H	H	OH	OH	CH_2OH	CH_3
ganoderiol F (**13**)	O	H	$\Delta^{24(25)}$		CH_2OH	CH_2OH

Figure 23 : structure moléculaire de plusieurs triterpènes impliqués dans l'inhibition de la 5α-réductase (Liu *et al.*, 2006)

D'autres études ont été effectuées sur l'acide GA DM. Celles-ci ont montré que ce composé, ainsi que le ganodérol B se liait aux récepteurs androgéniques du DHT (Liu *et al.*, 2007 ; Liu

et al., 2009a). Son mode d'action serait donc lié à l'inactivation des récepteurs androgéniques et donc à la diminution de la transcription des gènes impliqués dans la multiplication cellulaire par exemple. En ce qui concerne le pouvoir antiprolifératif de GA DM, celui-ci est actif entre 10 et 50 µM sur cellules de type LNCaP (cellules humaines prostatiques cancéreuses androgeno-dépendant) ainsi que sur cellules de type PC-3 (cellules cancéreuses prostatiques humaines issues de métastases osseuses (non androgéno-dépendant) (Liu *et al.*, 2009). Enfin, GA DM a montré une inhibition sur la différenciation et la fusion des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes responsables de la lyse osseuse rencontrée dans le cancer de la prostate métastasée. Cette inhibition passe par l'inactivation de NFATc1 qui est un facteur de transcription de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Ce facteur est lui-même activé par le NF-κB déjà mentionné ci-dessus (Miyamoto *et al.*, 2008)

- Ganoderma amboinense: inhibition de l'ADN topoisomérase et polymérase

Les ADN polymérases et topoisomérases sont impliquées respectivement dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN de la cellule (Li *et al*., 2005). L'inhibition de l'activité de ces enzymes induit l'apoptose des cellules.

L'acide ganodérique X (figure 24) inhibe l'ADN topoisomérase I (CI_{50} = 55 µg/mL) et l'ADN topoisomérase II (CI_{50} = 25 µg/mL).

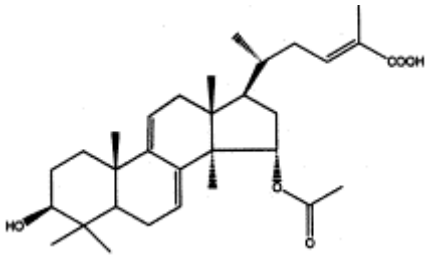


Figure 24 **:** acide ganodérique X (Li *et al*., 2005)

e) Utilité des triterpènes de type lanostane et en particulier des acides ganodériques en taxinomie des *Ganodermataceae* ; **profil chromatographique.**

Les techniques chromatographiques sont considérées comme une méthode très utile pour le contrôle des plantes et champignons médicinaux. Elles permettent, en effet, d'une part

d'évaluer la teneur en principe(s) actif(s) lorsque celle-ci est connue ainsi que ses produits de dégradation, et d'autres parts, de caractériser chimiquement une espèce. C'est la raison pour laquelle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ainsi que la Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) ont accepté et reconnu la nécessité d'utiliser des techniques chromatographiques (CLHP, LC-MS, CCM…) pour le contrôle de la qualité ainsi que pour l'identification des espèces médicinales (Chen *et al.*, 2008).

La première de ces techniques est celle de la chromatographie sur couche mine (CCM). Elle est préconisée dans la pharmacopée chinoise (Pharmacopée chinoise, 2000) pour la reconnaissance du *Ganoderma lucidum* asiatique et du *Ganoderma sinense*, tous deux assimilés au Lingzhi. Il est mentionné que leur reconnaissance s'effectue par la comparaison de leur profil de migration, en particulier des zones de migration fluorescentes à 365 nm, avec ceux de substances témoins (non décrites dans le texte). De même, la reconnaissance des spécimens asiatiques apparentés au *Ganoderma lucidum*, peut être réalisée par CCM après vaporisation de H_2SO_4 10 %. Deux spots rouges correspondant à GA B et GA C. permettent de les distinguer des autres espèces de champignons (Kohda *et al.*, 1985).

En ce qui concerne la chromatographie liquide sous haute pression en phase inverse (CLHP-RP), cette technique a permis de révéler, au niveau des acides ganodériques et des ganodérols, que des souches de *G. lucidum* d'origines différentes (Chine, Japon et Corée), présentaient des différences significatives sur le plan qualitatif et quantitatif. Parmi les Ganodérols, le Ganodériol A fut le composé majoritaire des spécimens chinois, alors que pour les autres spécimens (Coréen, cultivés au Vietnam), ce composé n'a pas été retrouvé. De même, le Ganodériol F, non retrouvé sur le spécimen chinois, fut un constituant majeur des spécimens japonais mais mineur pour les spécimens coréens. En revanche, parmi les acides ganodériques, tous les spécimens ont présenté l'acide ganodérique A en tant que composé majeur. De plus, une même souche cultivée sur des milieux différents a présenté des rapports similaires en acides ganodériques / ganodérols. Enfin, il a été constaté qu'à partir de l'extraction de spores de *Ganoderma lucidum*, la quantité de triterpènes de type lanostane extraite était 5 à 20 fois supérieure aux quantités obtenues par l'extraction des carpophores (Hattori, 2001 ; Gao *et al.*, 2004).

Une autre étude a comparé les chromatogrammes UV de plusieurs *G. lucidum* asiatiques provenant de 5 régions chinoises. Tous ont présenté 19 pics d'absorption identiques, correspondant aux mêmes acides ganodériques et un même composé majoritaire : l'acide

ganodérique H (correspondant au pic 11 sur les profils chromatographiques de la figure 25) (Chen *et al*., 2008).

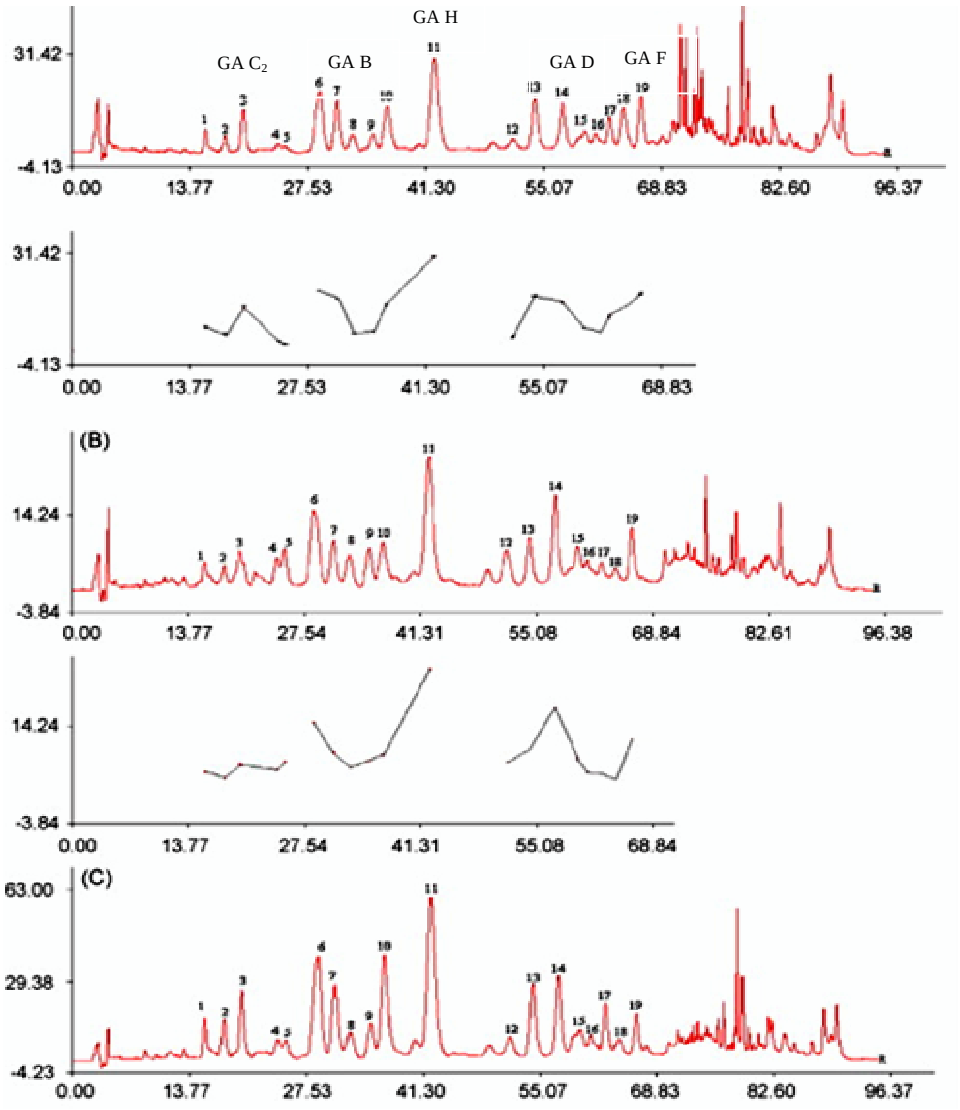


Figure 25 : profil chromatographique en HPLC et diagramme de plusieurs spécimens désignés sous le nom de G. *lucidum* issues de 3 régions de Chine : (A) 5 spécimens de Huangshan ; (B) 4 spécimens de Jiaxiang ; (C) 5 spécimens de Jinzhai (Chen *et al.*, 2008)

Ainsi, même si les différentes souches de *G. lucidum* asiatique présentent des variations quantitatives et parfois qualitatives au niveau de leurs triterpènes, leur profil chromatographique (notamment en ce qui concerne les spécimens chinois dont les composés majoritaires sont les acides ganodériques) restent relativement similaires.

Par contre, ceux-ci varient beaucoup plus entre les espèces. En effet, l'HPLC-RP a permis de classer 64 spécimens de Ganodermes asiatiques en 18 groupes selon leur profil chromatographique basé sur l'analyse des triterpènes. Ce résultat a été identique à celui obtenu par les observations macroscopiques, et les tests d'inter-fertilité. De même, la CLHP-RP a permis de différencier '*Ganoderma lucidum*' et '*G. tsugae*' récoltés sur 3 régions différentes de Chine (Su *et al.*, 2001). Nishitoba a également montré que le *Ganoderma lucidum* asiatique pouvait être classé en 2 groupes : le premier synthétisant principalement des acides ganodériques, le deuxième des acides lucidéniques (Nishitoba *et al.*, 1986).

De même, des variations qualitatives et quantitatives de 6 acides ganodériques (C_2, B, AM_1, K, H et D) sur plusieurs spécimens provenant de 6 espèces différentes (*G. amboinense, G. lucidum, G. sessile, G. atrum, G. tropicum, G. sinense*), dont certaines sont réputées médicinales, ont été démontré par HPLC-RP. Selon Wang *et al.*, (2006) *G. tropicum* est du point de vue qualitatif, l'espèce la plus proche de *G. lucidum* avec 6 acides ganodériques en commun, tandis que *G. amboinense*, *G. atrum*, *G. sessile* et *G. sinense* présentent de nombreuses différences, tant au niveau quantitatif que qualitatif.

D'autres études ont montré que *G. sinense* était l'espèce qui différait le plus puisque, sur 15 acides ganodériques issus de *G. lucidum*, seul GA C_2 est retrouvé (Liu *et al.*, 2009b ; Zhao *et al.*, 2006) .

Cette étude montre 2 choses : 1) que les acides ganodériques ne sont pas spécifiques du *G. lucidum* asiatique et 2) qu'ils constituent, au même titre que les autres triterpènes, un moyen taxinomique supplémentaire pour la différentiation des ganodermes.

Ainsi, la détermination des triterpènes de type lanostane, en particulier des acides ganodériques, par CLHP-RP est non seulement un moyen d'évaluer la qualité des extraits, mais aussi un outil taxinomique supplémentaire pour la classification des Ganodermes.

Ainsi, de la même façon que les styrylpyrones constituent des marqueurs chimiotaxinomiques pour les Hymenochetaceae (Fiasson & Niemelä, 1984), l'analyse par CLHP-RP des triterpènes de type lanostane, en particulier les acides ganodériques, permettrait de différencier les *Ganodermataceae* entre eux.

4) Activité antiproliférative des stérols retrouvés chez le *G. lucidum* et *G. sinense*

G. sinense également, utilisé en médecine traditionnelle, possède peu d'acides ganodériques. Pourtant, il présente au même titre que *G. lucidum* une activité antiproliférative sur 4 lignées cellulaires différentes (Liu YW *et al.*, 2009b). Or, sur les profils chromatographiques des deux extraits, un même composé a été révélé : l'ergostérol. Ce composé, présent dans la plupart des champignons, est un élément structural de la paroi cellulaire fongique. Ce composé existe également sous formes dérivées pour lequel une activité antiproliférative a déjà été démontrée (Bok *et al.*, 1999). D'après la littérature, d'autres dérivés de l'ergostérol extraits de spécimens du genre *Ganoderma* possèdent également des propriétés antiprolifératives.

Par exemple, à partir de la culture de mycélium de *Ganoderma lucidum*, deux molécules dérivées de l'ergostérol ont montré une activité antiproliférative sur cellules cancéreuses d'origine hépatique de type Hep 3B. Il s'agit du 9,11-dehydroergosterol peroxyde (figure 26) qui possède une CI_{50} = 16,7 µg.ml^{-1} et du peroxyde d'ergostérol de CI_{50} = 19,4 µg.ml^{-1} (Chen *et al.*, 2009)

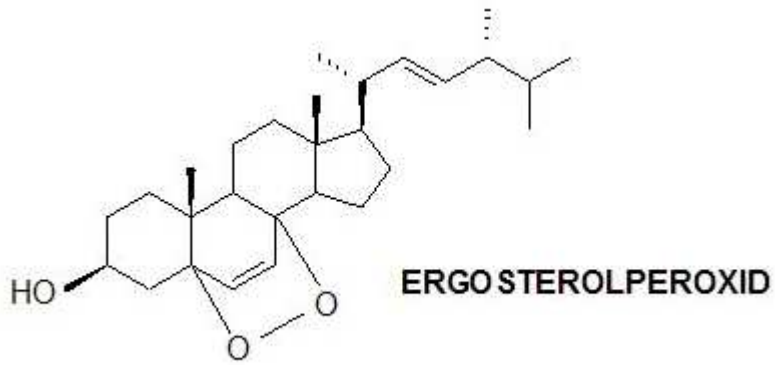


Figure 26 : structure du 9,11-dehydroergosterol peroxyde (Chen *et al.*, 2009)

Ensuite, plusieurs dérivés de l'ergostérol extrait de l'espèse asiatique, dont certains sont estérifiés sur C-2 ou C-3, ont montré une activité antiproliférative sur cellules issues d'hépatocarcinome de type PLC/PRF/5 et sur cellules cancéreuses naso-pharyngées de type

KB. Celle ayant montré la plus forte activité sur les deux souches est l'ergosta-7,22-dien-2β, 3α, 9α-triol avec respectivement une CI_{50} de 1,17 et 0,89 µg.ml$^{-1.}$ (Lin & Tome, 1991).

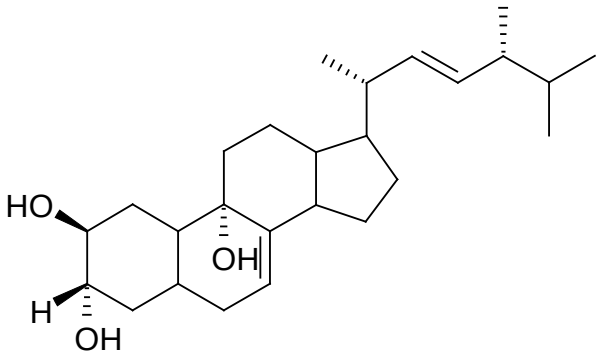


Figure 27 : l'ergosta-7,22-dien-2β, 3α, 9α-triol

Ainsi, la nature des composés bioactifs *in vivo* n'étant pas encore bien définie, d'autres études comparant l'activité des triterpènes et des stérols issus du genre *Ganoderma* devraient être envisagées. De même, la teneur en acides ganodériques constitue-t-elle la seule garantie concernant la qualité des extraits ou spécialités présentées, de manière implicite ou explicite, comme ayant des propriétés curatives.

5) Problème d'ordre taxinomique

A ce premier problème concernant la nature des composés responsables de l'activité des ganodermes s'ajoute le problème taxinomique. En effet, l'identification des souches utilisées dans les travaux analytiques, portant sur l'étude des triterpènes, semble aléatoire. Par exemple, aucune description macro- et micro-morphologique n'accompagnent ces travaux. De plus, les résultats de séquençage de Moncalvo *et al.*, (1995) montrent que les espèces asiatiques nommées *G. lucidum* et *G. tsugae* sont différentes des espèces européennes et nord-américaines désignées respectivement sous le même nom (Moncalvo *et al.*, 1995). Ils montrent également que les spécimens asiatiques désignés sous le nom de *G. lucidum* correspondraient à deux espèces différentes : l'une correspondrait à l'espèce chinoise, l'autre à l'espèce taïwanaise.

Ainsi, les variations quantitatives et qualitatives des acides ganodériques et autres triterpènes, obtenus entre plusieurs spécimens apparentés au *G. lucidum* asiatique, pourraient provenir du

fait que ces spécimens appartiennent à plusieurs espèces différentes. Par exemple, les travaux de Nishitoba *et al*. (1986) ont montré qu'une souche de ganoderme appelée populairement 'Saegusa' et apparenté au *G. lucidum* se distingue par la présence majoritaire d'acides lucidéniques à l'inverse d'une autre souche plus couramment employée qui comporte majoritairement des acides ganodériques.

En conséquence, l'analyse qualitative et quantitative par HPLC-RP des triterpènes de type lanostane, dans un but taxinomique, ou dans le but de garantir la teneur en lanostanoïdes potentiellement antitumoraux, ne vaut que si les spécimens ont été préalablement identifiés par des méthodes conventionnelles (macro et micromorphlogique) et moléculaires. De même, il est important de savoir, parmi les composés bioactifs *in vitro,* quels sont les composés responsables de l'activité in *vivo* : triterpènes de type lanostane ou dérivés de l'ergostérol ?

III) Recherche de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores des Antilles françaises

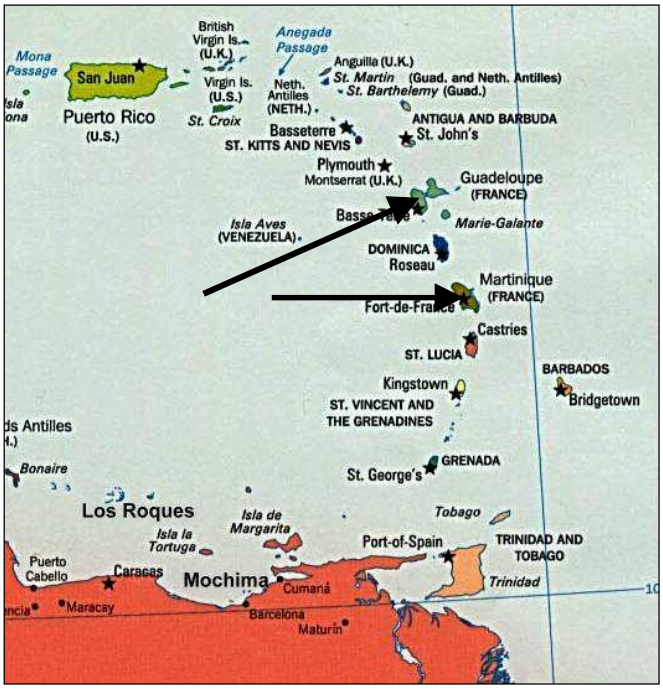


Figure 28 : Carte géographique des petites Antilles

Par rapport à beaucoup de régions tropicales, la région Caraïbe (figure 28) est relativement bien connue pour sa biodiversité fongique. Minter *et al.* (2001) recensent 11 268 espèces de

champignons (au sens le plus large du terme), ce qui reste très en deçà des chiffres théoriques déduits du rapport de diversité putatif entre champignons et végétaux (ce rapport s'échelonne de 3,5 : 1 à 8,4 : 1 ; Roberts & Spooner, 1999). La flore de cette région du monde étant riche d'au moins 11 000 espèces (Acevedo-Rodriguez & Strong, 2008), on peut attendre entre 38 500 et 92 400 espèces fongiques (55 000 en adoptant une moyenne « raisonnable » de 5 : 1). On connaîtrait donc actuellement entre 12,2 et 28,6 % de la diversité fongique régionale (20,5 % avec la moyenne de 5 : 1). Il reste beaucoup de travail pour les mycologues taxinomistes, même si bien des régions tropicales sont plus pauvrement explorées (par exemple, 3% des champignons de Guyane française sont connus, selon ces mêmes critères – Courtecuisse, 2005).

Suivant cette logique, un programme de recherche a été lancé sur les Antilles Françaises (F.W.I.) en collaboration avec divers organismes en charge de la gestion ou de la conservation des milieux naturels (DIREN, Office National des Forêts) et une check-list préliminaire des espèces fongiques connues de ce secteur, d'après la littérature, a été assemblée (Courtecuisse, 2006). Les 1200 espèces citées représentent 7,7 % de la fonge potentielle en se basant sur le même calcul que ci-dessus (moyenne du ratio à 5 et référence pour la flore : Fournet, 2002). Des missions de collecte se succèdent depuis 2003, qui ont permis de rassembler près de 6 000 spécimens, appartenant à environ 2 600 espèces différentes (évaluation préliminaire). Quelques travaux concernant des espèces nouvelles ont déjà été publiés et constituent le début d'une série prometteuse.

Dans le cadre de ce programme, plusieurs spécimens de polypores, en particulier de la famille de *Ganodermataceae*, ont été récoltés afin de constituer une réserve de matière première nécessaire pour la recherche de nouvelles molécules à activité antitumorale.

Les Antilles présentent, en effet, des conditions extrêmes (climat, insectes mycophages, bactéries et autres champignons) contre lesquelles les champignons doivent se défendre, par l'intermédiaire de métabolites secondaires qu'ils produisent. Les métabolites secondaires constituant l'une des principales sources de substances à activité pharmacologique, il est probable que les ganodermes ou autres polypores des Antilles constituent une réserve potentielle de nouvelles molécules exploitables au niveau médical et en particulier au niveau oncologique.

Mais les incertitudes taxinomiques entourant la famille des *Ganodermataceae*, notamment en ce qui concerne le *Ganoderma lucidum* qui est le taxon le plus cité à propos de ces usages traditionnels et des études chimiques ou pharmacologiques, rendent indispensable, comme nous l'avons démontré précédemment, l'association de l'approche taxinomique fine aux recherches moléculaires et pharmacologiques. Pour les ganodermes, mais aussi pour tous les autres champignons supérieurs, cette démarche améliore de manière reproductible, la compréhension des liens qui unit : la pertinence d'usage, la composition chimique de tel ou tel taxon ainsi que la présence de métabolites actifs pour chacun d'entre eux.

A) Première étape : choix et identification des spécimens récoltés, exemple des *Ganodermataceae*

Notre travail sur le terrain fut essentiellement axé sur la recherche et la récolte de polypores en général et de *Ganodermataceae* en particulier. La reconnaissance des *Ganodermataceae* sur le terrain s'effectue dans un premier temps, par l'observation de l'hyménophore qui est poré (Homobasidiomycètes —› *Aphyllophoromycetideae*) et blanchâtre en surface (parfois formant un bourrelet blanc ou ocre, stérile, au niveau de la marge du chapeau), et dans un second temps par l'observation du revêtement piléique qui peut être brillant, vernissé, laqué ou mat, coriace et parfois recouvert de spores. La couleur du chapeau, généralement de couleur brun noir, brun rouge, ocre brun ou ocre orangée peut être zonée concentriquement, soit par une alternance de couleurs (celles citées ci-dessus), soit au niveau des reliefs (plis, bosses, bourrelets, sillons).

Toutefois, adopter cette seule et unique démarche pour reconnaître les *Ganodermataceae* sur les lieux de récolte n'est pas suffisante, car certains genres n'appartenant pas à cette famille peuvent être confondus avec certains spécimens du genre *Ganoderma*. Par exemple, un de nos spécimens, identifié sur des critères microscopiques et désigné sous le nom de *Microporellus* cf *dealbatus* (figure 29), possède, comme certains ganodermes, un chapeau réniforme dont le revêtement est zoné concentriquement.

Figure 29 : *Microporellus* cf *dealbatus*

Ainsi, sur le terrain il est difficile de pouvoir distinguer les spécimens de cette famille, d'autant plus que la diversité fongique dans les Antilles françaises est encore mal connue.

Pourtant, l'aspect macro-morphologique, pour avoir été largement décrit dans la littérature, reste encore un outil de reconnaissance relativement fiable pour la sélection des *Ganodermataceae*. Murrill (1908) considérait l'écologie, la distribution géographique, le substrat, et la macro-morphologie comme étant des caractères taxinomiques primordiaux pour la reconnaissance des *Ganodermataceae.*

Par contre, la distinction des genres de cette famille, par leur simple aspect macro-morphologique, est beaucoup plus difficile et nécessite d'aborder, dans un premier temps, la systématique de cette famille.

1) Différents genres de la famille des *Ganodermataceae* Donk (d'après Steyaert, 1967, 1980 ; Gottlieb & Wright, 1999a, 1999b ; Moncalvo & Ryvarden, 1997).

Le caractère taxinomique principal qui caractérise la famille des *Ganodermataceae* (ordre des *Ganodermatales* Jülich) créé par Donk en 1948, est la morphologie des spores (échinulées ou ornementées et à double paroi). Tous les spécimens de cette famille sont lignicoles, saprophytes ou parasites et développent sur leur substrat, une pourriture blanche. Les genres sont :

a) Le genre *Ganoderma* P. Karsten

Selon la classification de Steyaert (1980), dont nous nous sommes inspirés, nous pouvons distinguer 3 sous-genres à l'intérieur de ce taxon.

Le premier regroupe les spécimens ayant un revêtement supérieur laqué ou vernissé et correspond au sous-genre *Ganoderma* (au sens de Steyaert).

Le deuxième rassemble les spécimens au revêtement coriace (croûte) et correspond au sous-genre *Elfvingia* (P. Karsten) Imazeki.

Le troisième regroupe les spécimens dont le revêtement est mat et bien distinct de la chair : sous-genre *Plecoderma* Steyaert.

Ces 3 groupes semblent également se distinguer par la couleur de leur chair : elle est brun pâle et de couleur uniforme ou bicolore pour *Ganoderma* ; de couleur uniforme brune ou brun noir pour *Elfvingia* ; et de couleur uniforme ocre pâle pour *Plecoderma* (Moncalvo, 2000).

a-1) Sous-genre *Ganoderma*

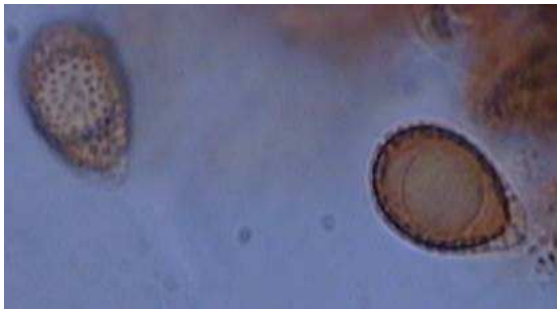


Figure 30 : basidiospores du sous-genre *Ganoderma*

Figure 31 : Spécimen du sous-genre *Ganoderma*

Les spécimens de ce groupe sont stipités, sessiles ou dimidiés, la chair est le plus souvent subéreuse et de couleur uniforme ou bicolore, chamois, brun cannelle, brun tabac mais rarement brun chocolat. La surface supérieure est souvent marquée de zones concentriques alternants des couleurs noirs, rouges, rouge ocres ou ocre jaunes et des reliefs (sillons, plis, bourrelets, rides et bosses) parfois aussi disposés radialement (figure 31). La forme du

chapeau peut être semi-circulaire, flabelliforme ou réniforme, la surface porée est le plus souvent blanchâtre. Les spécimens du sous-genre *Ganoderma* se caractérisent par des spores (figure 30) de forme subsphérique, ovoïde ou oblongue, à double paroi, échinulées et tronquées au niveau de l'apex. Ce sous-genre est principalement caractérisé par un revêtement constitué d'extrémités hyphales (appelé également piléocystides) rangées en palissade et formant un hyménoderme. Les cellules du revêtement se distinguent par un renflement ou un élargissement de leur extrémité, provoqué par l'accumulation, à l'intérieur des hyphes, d'une substance cireuse (Steyaert, 1967a). Les piléocystides sont figées dans une résine plus ou moins compacte, qui se dissout facilement dans la potasse (KOH 5%). L'aspect brillant (parfois plus ou moins mat selon les espèces), laqué et vernissé qui est une conséquence de la micro-morphologie des cellules du revêtement permet de les reconnaître sur le terrain. Toutefois, ce type de reconnaissance, comme nous le verrons par la suite, n'est pas fiable et peut générer des risques d'erreur d'identification.

Ce sous-genre peut être divisé en trois groupes selon Gottlieb & Wright (1999a): **le premier** rassemble les spécimens dont les piléocystides sont lisses et de forme cylindrique. Ce groupe, dans lequel se placent le *G . lucidum* (Curtis : Fr.) P. Karsten *sensu stricto*, ainsi que le *G. resinaceum* Boudier, correspondrait à la section *Ganoderma* décrite par Steyaert (1980). (figure 32 : images 1, 2, 3, 4).

Ensuite, le **deuxième groupe** rassemble les spécimens dont les piléocystides ne sont pas cylindriques mais renflées au niveau de l'apex en forme de massue. Au sommet de ces hyphes se forment de petites excroissances de forme sphéro-pédonculées (figure 32 : image 5). Ce groupe correspondrait à la section *Characoderma* de Steyaert (1980). Les espèces caractéristiques sont, d'après Steyaert (1980) et Gottlieb & Wright (1999a), le *G. tropicum* et le *G. tuberculosum.*

Enfin, le **troisième groupe** rassemble les espèces dont les piléocystides sont élargies au niveau de l'apex et diverticulées latéralement (en forme d'andouillet) (figure 32 : image 6, 7, 8). On y retrouve les espèces *G. multiplicatum*, *G. sulcatum* et *G. zonatum*. Il ne correspond à aucune espèce décrite par Steyaert puisque cet auteur place *G. multiplicatum* dans la section *Ganoderma.*

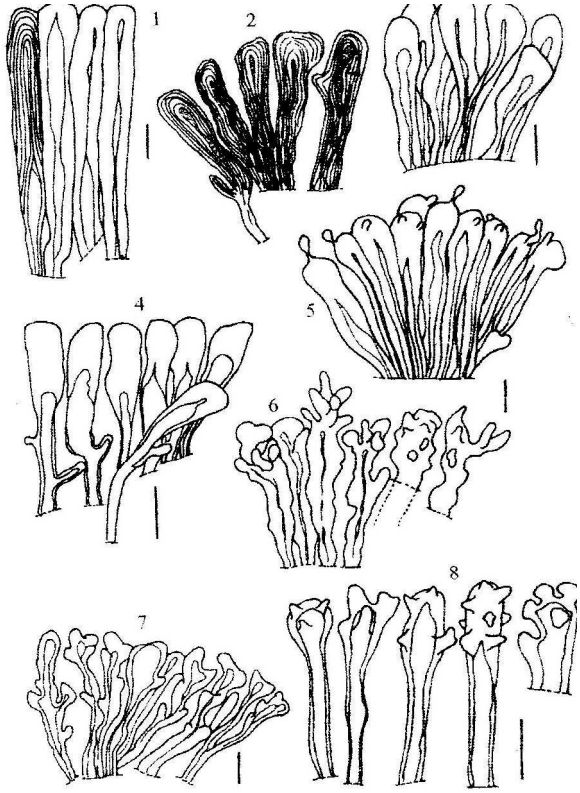


Figure 32 : 1 bar = 10 µm ; **1** (*G. sessile*, holotype)-**2** (*G. resinaceum*, holotype)-**3** (*G. lucidum var. capense*, holotype)-**4** (*G. lucidum*), *Hymenioderma vera* (hyphes du revêtement cylindriques) ; **5** (*G. platense*) Hyménoderme claviforme (hyphes du revêtement dont l'apex présente des bosses de forme sphéro-pédonculées) ; **6** (*G. multiplicatum*, holotype)-**7** (*G. sulcatum*, holotype)-**8** (*G. multiplicatum*, holotype), Hyménoderme formé par des extrémités hyphales diverticulées (Gottlieb & Wright, 1999a)

La classification du sous-genre *Ganoderma*, basée sur la forme des piléocystides, est difficile puisque les terminologies utilisées précédemment par les auteurs successifs ne sont pas homogènes (Gottlieb & Wright, 1999a).

Toutefois, celle proposée par ces derniers semble pertinente puisqu'elle nous a permis d'établir, à partir de nos collections, certaines analogies entre les différentes formes de piléocystides, et la position cladistique des spécimens.

En revanche, en ce qui concerne la réaction des piléocystides au Melzer[1], nous n'avons pas constaté de relation entre la forme des hyphes du revêtement et la présence ou non d'une amyloïdie de ces mêmes cellules.

[1] le revêtement est dit amyloïde si les piléocystides prennent une couleur bleu violet ou noir au contact d'une solution de Melzer)

a-2) Sous-genre *Elfvingia* (P. Karsten) Imazeki

Figure 33 : spécimen du sous genre *Elfvingia*

Le chapeau est de forme semi-circulaire généralement, dimidié, rarement stipité, coriace, zoné concentriquement et parfois radialement. Le revêtement est mat, souvent recouvert de spores, ce qui lui confère une couleur brun cacao (figure 33). La marge peut être obtuse, parfois stratifiée, et forme à chaque moment de sa croissance un bourrelet de couleur blanc crème. La surface porée est généralement de couleur blanchâtre, brunissante au toucher ou naturellement et parfois jaunissante. Ces caractères morphologiques permettent de distinguer sur le terrain les spécimens appartenant à cette catégorie.

Le revêtement peut être de type trichodermique pour *G. applanatum* (Pers.) Patouillard, c'est-à-dire que la cire, épaisse et coriace, est déposée en dessous des hyphes terminaux. L'extrémité des hyphes est donc à l'air libre et forme le trichoderme (figure 34).

Il peut être également de type anamixodermique. C'est le cas de *G. adspersum* (Shulz.) Donk qui possèdent des extrémités hyphales parfois hyalines (hyphes génératrices) ou brunes (hyphes squelettiques) engluées dans une résine épaisse, compacte et coriace. Les spécimens ayant un tel revêtement constitue, pour Steyaert (1980), le sous-genre qu'il désigne sous le nom *Anamixoderma* (figure 35). La différenciation de ces deux types de revêtement est rendue difficile par l'épaisse couche de résine compacte et coriace qui imprègne les extrémités hyphales du revêtement. Corner (1983) précise, à ce sujet, qu'il n'a jamais pu observer parmi les spécimens étudiés, le revêtement trichodermique décrit par Steyaert.

Une troisième espèce, présente en Europe et appelé *G. australe* (Fr.) Patouillard, se distingue de *G. applanatum* par des spores plus longues [8,5-10(-12) x 5-7,5 µm *vs* 6-8,5 x 4,5-6 µm]. Toutefois, le type de cette espèce, récolté sur une île du Pacifique par Fries, n'existant plus, il est difficile de savoir si elle peut être réduite en synonyminie avec *G. adspersum* (Ryvarden &

Gilbertson, 1993). D'ailleurs, pour les mêmes raisons, Gottlieb & Wright (1999b) ont fait le choix d'abandonner ce nom pour désigner certains ganodermes du sous-genre *Elfvingia*

Dans tous les cas, ce groupe de spécimens, dont les traits morphologiques ont été cités ci-dessus, sont communément rassemblés dans le 'complexe *applanatum-australe'*. C'est la raison pour laquelle nous les avons réunis ici dans le sous-genre *Elfvingia.*

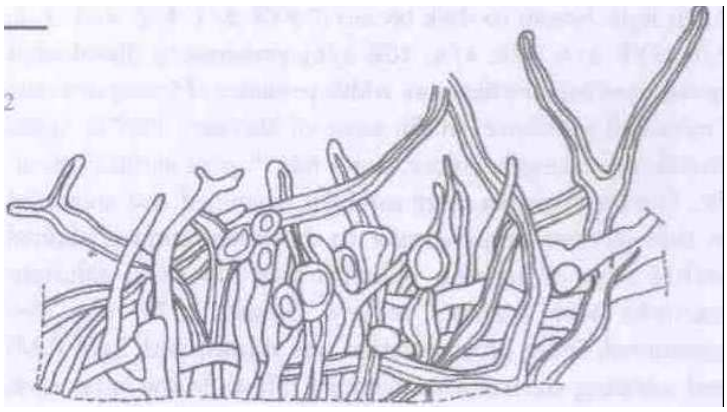


Fig 34: revêtement trichodermique (*G. applanatum*) (Gottlieb & Wright, 1999b)

Fig 35 : revêtement anamixodermique SW16 (*G. australe*)

Un dernier élément morphologique permettrait de séparer les spécimens de ce sous-genre en 2 catégories. En effet, Gottlieb & Wright (1999b) ont distingué, parmi les spécimens appartenant à ce sous-genre, deux types de spores : celles dont les ornementations sont distribuées au hasard sur une paroi interne lisse (*G. applanatum*), et celles dont la disposition des échinules suit celles de sillons longitudinaux situés sur la paroi interne (*G. lobatum*).

a-3) Sous-genre *Plecoderma* Steyaert (1980)

Le revêtement est constitué exclusivement d'hyphes hyalines emmêlées les unes aux autres, et figées dans une résine compacte et abondante. L'ensemble constitue une couche compacte mais flexible, de couleur blanchâtre, nettement distincte de la chair dont la couleur est ocre pâle et la texture molle, parfois spongieuse à l'état frais (figure 36). Deux espèces sont représentatives : *G. amazonense* Weir et *G. philippii* (Bres. & Henn.) Bres.

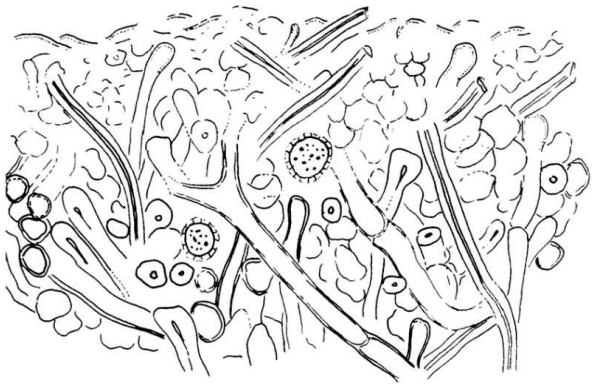


Figure 36 : revêtement de *G. amazonense*

b) Genre *Amauroderma* Murrill

Le chapeau est de forme généralement circulaire ou semi-circulaire, flabelliforme, avec un stipe souvent élancé d'insertion centrale ou latérale. Le revêtement est généralement mat, parfois brillant (figure 37). La surface supérieure du chapeau peut être zonée concentriquement ou non. Ces traits morphologiques, en particulier la silhouette élancée de ces carpophores, le stipe fin supportant un chapeau zoné concentriquement et de forme cylindrique, sont caractéristiques des *Amauroderma* et permettent, sous réserves des résultats obtenus en microscopie ou par séquençage des ITS, de les distinguer sur le terrain. Les spores sont échinulées, leur forme est généralement globuleuse, et la partie apicale n'est pas tronquée (figure 38:)

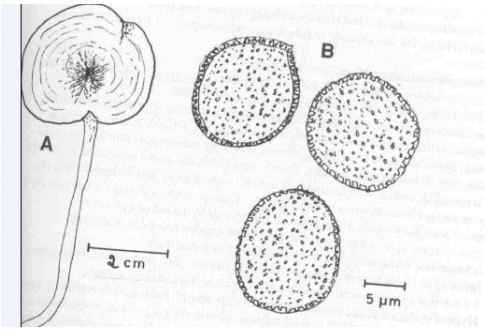


Figure 38 : spores *d'Amauroderma*

Figure 37 : Sporophore d'*Amauroderma rude*

c) Genre *Haddowia* Steyaert

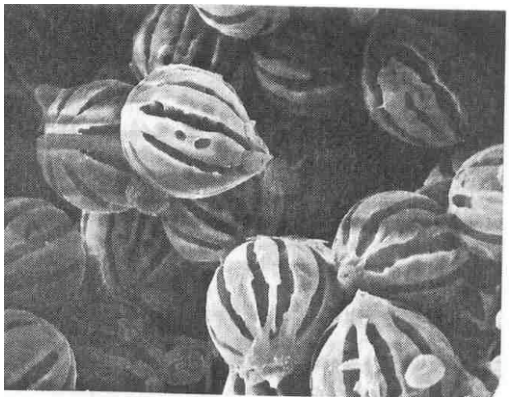


Figure 39 : basidiospores de *H. longipes*

Ce genre ne comporte que 3 espèces dont la plus connue est *H. longipes*. Le stipe étroit et petit, est fixé latéralement sur la partie supérieure du chapeau. Le revêtement est brillant et laqué. Les spores présentent des crêtes longitudinales (figure 39). Sa forme de lampadaire permet de le reconnaître sur le terrain.

d) Genre *Humphreya* Steyaert

Le chapeau peut être stipité ou dimidié, le revêtement est mat ou laqué, zoné concentriquement avec une marge souvent en léger bourrelet de couleur blanc crème. La chair est blanche, molle et presque spongieuse. Elle ressemble à celle de *G. amazonense*, ce qui peut être sur le terrain une source de confusion entre cette espèce et les spécimens appartenant à ce genre, en particulier pour *H. coffeatum* (Gottlieb & Wright, 1999b).

Les spores du genre *Humphreya* ont une ornementation réticulée (*H. lloydii*) ou formant des arêtes plus ou moins longues de manière longitudinale (figure 40 et 41 : *H. coffeatum*) ou latérale (*Ganoderma flaviporum*[2]). Les ornementations sont parfois anastomosées.

[2] Nous avons placé cette espèce dans le genre *Humphreya*, de par la morphologie de ses spores semblable à celle des autres *Humphreya*. Toutefois, la discussion concernant l'éventualité d'une nouvelle combinaison de cette espèce est abordée dans le chapitre suivant.

Figure 40 : sporophores de *H. coffeatum*

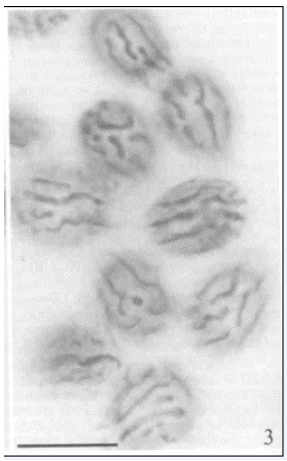


Figure 41 : basidiospores de *H.coffeatum*

e) Genre *Tomophagus* Murrill

Ce nom de genre ne contient qu'une seule espèce : *Tomophagus collossus,* actuellement mieux connue sous le nom de *Ganoderma colossum.* Cette espèce se distingue par une chair molle, épaisse, fibreuse et spongieuse, de couleur crème, et des spores de grande taille (15-19 x 10,5-12,5 µm) (Ryvarden, 2004).

2) Difficultés d'identification sur le terrain : ressemblances et pièges

A travers la description des différents genres de la famille des *Ganodermataceae*, nous avons pu constater que certains traits macro-morphologiques permettaient de les identifier sur le terrain. Toutefois, il existe certains pièges à connaître ou à éviter.

a) Ressemblances entre les genres

Revêtement brillant

L'aspect laqué et brillant n'existe pas seulement dans le sous-genre *Ganoderma* ; il existe également pour certaines espèces des genres *Humphreya* et *Haddowia*. Exemple : *Humphreya eminii* ou *Haddowia longipes.*

L'insertion du stipe

Pour un jeune spécimen d'*Humphreya coffeatum* dont le chapeau est réniforme, l'insertion du stipe peut être latérale, puis à maturité les lobes situés à l'arrière du chapeau se développent, se rejoignent et peuvent fusionner. L'insertion devient alors centrale et le chapeau circulaire. La morphologie finale peut alors évoquer certains spécimens du genre *Amauroderma.*

Figure 42 : *H. coffeatum*

Figure 43 : *Microporellus* cf *dealbatus*

b) Hétérogénéité morphologique

D'après Moncalvo & Ryvarden (1997), on peut recenser 386 noms au sein des *Ganodermataceae*, dont 116 sont retenus comme synonymes et 50 considérés comme ambigus et donc éliminés. Il reste donc 220 espèces reconnues dans la famille des *Ganodermataceae,* dont la plupart ont été récoltées en région tropicale.

D'après les mêmes auteurs, le nombre de synonymes est sans doute sous-évalué car de nombreuses espèces n'ont été décrites qu'à partir d'une seule collection ou d'une seule localité. Or, on sait que les espèces de la famille des *Ganodermataceae* ont une grande hétérogénéité morphologique. Par exemple, il n'est pas rare de constater :

Une variation des couleurs au sein d'une même espèce

Nous avons ici l'exemple de deux spécimens de l'espèce *H. coffeatum* dont l'aspect diffère selon le degré de maturité du carpophore. Le spécimen brillant correspond à un jeune carpophore. Celui se terni durant son développement.

Figure 44 : *H. coffeatum* (l'exemplaire le plus mûre

est situé à droite)

La présence ou non d'un stipe

La présence d'un stipe n'est pas un critère discriminant puisque pour une même espèce certains carpophores en possèdent un, d'autres non. D'après Moncalvo (2000), sa présence dépend de l'emplacement du substrat où le champignon va développer son sporophore.

Figure 45*: Ganoderma gibbosum*

Figure 46*: Humphreya coffeatum*

3) Description macro et microscopique

Devant l'hétérogénéité morphologique existant au sein d'une même espèce et les ressemblances existant entre les genres d'une même famille ou de familles différentes, une simple reconnaissance macro-morphologique n'est pas suffisante. Il est donc primordial d'effectuer, pour chaque spécimen récolté, une description macroscopique accompagnée d'une description de son écologie (voir partie expérimentale) suivie d'une description microscopique des spores, des hyphes du revêtement ainsi que des hyphes de la chair et des tubes (éléments déterminants pour l'identification des taxons). L'observation des caractères micro-morphologiques nous a permis d'émettre une première hypothèse sur l'identité des spécimens récoltés.

4) Taxinomie et phylogénie moléculaire

a) But taxinomique (voir partie expérimentale)

Néanmoins, certaines descriptions méthodiques basées sur des critères macro et microscopiques se sont révélées insuffisantes. C'est pour cela que l'on a eu recours au séquençage de certains marqueurs moléculaires, notamment des espaces internes de transcripton 'ITS1 et ITS2' (ITS : espace interne de transcription Moncalvo *et al.*, 1995) situés entre les séquences 18S, 5,8S et 28S codant pour la synthèse des ribosomes (Gardes & Bruns, 1993) (voir partie expérimentale). La confrontation des hypothèses obtenues selon les deux approches (traditionnelles et moléculaires) permet de confirmer ou d'affiner la détermination des espèces.

b) But phylogénique

Le séquençage des ITS a permis de situer certaines *Ganodermataceae* récoltées aux petites Antilles françaises au sein du cladogramme ou arbre phylogénique établit par la mycothèque de l'UCL. L'arbre phylogénique permet de montrer les liens de parenté entre des entités supposées avoir un ancêtre commun. Chacun des nœuds de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants.

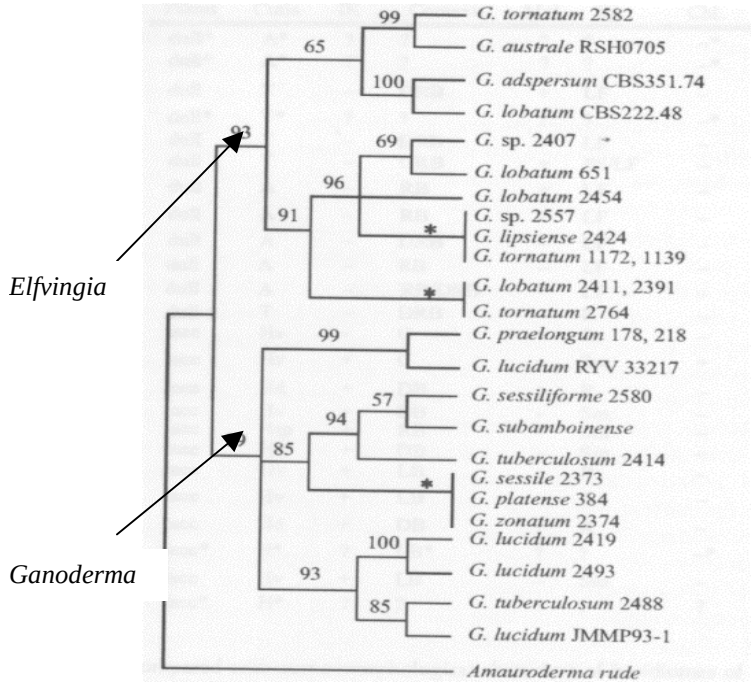


Figure 47 : phylogénie partielle du genre *Ganoderma*.(Gottlieb *et al*., 1999)

Sur cet exemple (figure 47), nous avons 2 clades distincts, séparant le groupe des *Elfvingia* du groupe des *Ganoderma*. La phylogénie, dans ce cas, permet de confirmer la taxinomie basée sur des aspects morphologiques. De même, *Amauroderma* forme un clade à part du clade des Ganodermes.

c) Position phylogénique de certaines *Ganodermataceae* récoltées aux Antilles françaises (cladogramme de l'UCL et Moncalvo, 2000)

Ce travail a été réalisé par l'équipe de la mycothèque de l'Université Catholique de Louvain et supervisé par Cony Decock. Cet arbre phylogénique est en corrélation avec celui présenté ci-dessus puisqu'il sépare, entre autres, les *Ganodermataceae* dont **le revêtement est différencié** (piléocystides rangés en palissade, renflées en forme de cylindre ou clavées, correspondant au sous-genre *Ganoderma*) et **celles dont le revêtement est indifférencié,**

correspondant au sous-genre *Elfvingia*. La position cladistique des spécimens récoltés est entourée sur les figures 51, 53, 57, 58, 59.

c-1) Complexes identifiées dans le groupe des *Ganodermataceae* dont le revêtement est différencié

Du point de vue taxinomique, **le complexe *lucidum*** ne comprend que des spécimens récoltés en région tempérée de l'hémisphère nord et de l'hémisphère sud. On retrouve, entre autres, dans ce complexe *G. lucidum, G. praelongum* ainsi que les espèces retrouvées uniquement sur Conifères *G. carnosum, G. valesiacum, G. oregonense et G. tsugae.* Les piléocystides sont cylindriques et amyloïdes. Les spores possèdent des échinules épaisses, longues et peu denses. Un spécimen récolté sur *T. canadensis* en Amérique du Nord, désigné sous le nom de *G. tsuga*e (Leg. Pierre-Arthur Moreau), ainsi qu'un *G. lucidum sensu stricto* récolté à Sainte Croix-Volvestre (France) récolté sur Chênes vert[3] (Leg. Anne Favel) ont été observés au niveau micro-morphologique. Les deux espèces ont montré des piléocystides cylindriques et amyloïdes (plus importante pour *G. lucidum*) de forme identique (60-80 x 6-12 µm). En revanche, les basidiospores, malgré une morphologie similaire (forme elliptique-ovoïde, apex parfois convexe, échinules épaisses, longues et espacées), sont de tailles différentes : 6-[6,5]-7 x 10-[10,66]-12 µm pour *G. tsugae vs* 7-[7,9]-8,5 x 11,5-[12,3]-13 µm pour *G. lucidum.* De même, seules les spores du *G. lucidum* ont présenté à certains endroits des ornementations allongées en forme de serpentin. Deux autres *G. lucidum sensu stricto* récoltés en Vendée (F) (Leg René Pacaud) et en Dordogne (F) (Leg Cony Decock ; figure 48), utilisés pour les tests pharmacologiques, ont présenté des piléocystides ainsi que des basidiospores semblables au spécimen pyrénéens et conformes au *G. lucidum* (Curtis) P. Karst *sensu stricto* décrit par Steyaert (1967a) et Ryvarden & Gilbertson (1993).

[3] Identification confirmée par séquençage des ITS à l'INRA de Marseille, malgré une macro-morphologie similaire au *G. resinaceum* : carpophore sessile, léger après dessiccation, présence de résine importante sur le revêtement, chair pâle, douce, molle et fragile)

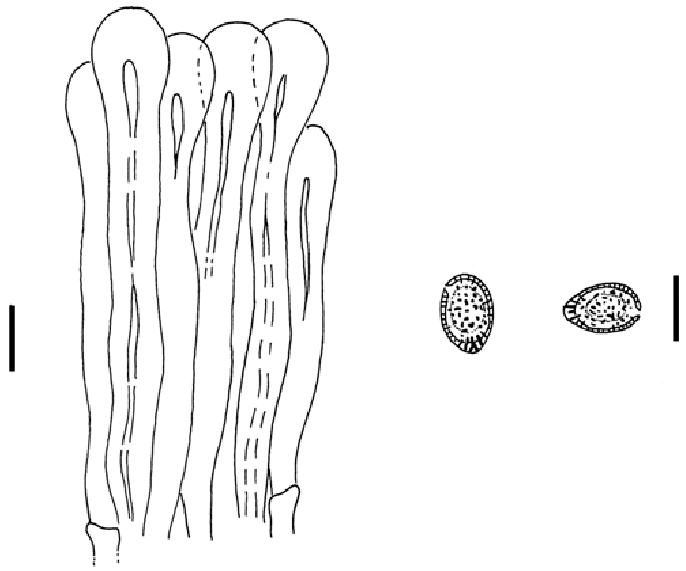


Figure 48 : piléocystides et basidiospores de *G. lucidum sensu stricto* (Leg. Cony Decock ; 1 bar = 10 µm)

Selon la photographie et la description effectuées par Rivoire (2007), la forme du *G. tsugae* (stipité, flabelliforme et aplati au niveau du chapeau), la chair bicolore (blanchâtre et molle sur la couche supérieure, puis brune et de texture subéreuse près des tubes) et l'ornementation des spores (ornementations arrondies) sont des caractéristiques retrouvées également chez *G. valesiacum*.

Ces résultats, basés sur des critères morphologiques, sont en corrélation avec les résultats de séquençage (figure 51 : 1) sur lequel *G. tsugae* et *G. valesiacum* apparaissent monophylétiques. Ainsi, ces deux espèces pourraient être conspécifiques malgré la distance géographique qui les sépare, et la différence d'hôte (*G. valesiacum* sur *Larix,* mais également sur d'autres conifères, d'après Moncalvo & Ryvarden, 1997). Par contre, elles sont, par leurs micro-morphologies et les résultats de séquençage, non conspécifiques à *G. lucidum.*

Le point commun retrouvé pour tous les spécimens de ce complexe réside donc dans la forme des cellules du revêtement. En effet, d'après la littérature (Steyaert, 1980 ; Ryvarden & Gilbertson, 1993 ; Gottlieb & Wright, 1999a) et d'après nos observations, y compris celles effectuées sur l'holotype de *G. praelongum* (figure 51 : 2), les piléocystides sont de forme cylindrique, fortement amyloïdes et de taille comprise entre 60 et 80 µm.

En ce qui concerne les ganodermes utilisés en médecine traditionnelle asiatique, *G. tsugae* est le deuxième nom d'espèce cité après *G. lucidum* dans les travaux axés sur la recherche de substances bioactives. De plus, la littérature ancienne distingue une espèce utiliseé en médecine traditionnelle asiatique récoltée sur conifères (Songshanlingzhi ou Lingzhi des pins et des sapins) (Lapassat, 2000)

Toutfois, d'après Moncalvo *et al*. (1995) cette espèce serait uniquement présente dans l'hémisphère nord sur le continent américain, dans les forêts de conifères, et éventuellement présente dans le nord Est de la Chine (*comm. pers*. Cony Decock), mais absente de Taïwan et du Japon.

D'un autre côté, la variété *G. tsugae* var. *jannieae* Wasser, Zmitr. & Didukh, récoltée dans la province chinoise de Jilina sur *Pinus* sp., pourrait correspondre à l'espèce utilisée dans les travaux pharmacologiques antérieurs (Chen & Chen, 2002 ; Wasser *et al.*, 2006).

Néanmoins, aucune recherche de composé, comme les triterpènes, ni même de recherche portée sur l'utilisation traditionnelle, n'accompagnent la description de cette variété. De plus, bien que son écologie (zone tempérée, sur *Pinus*) ainsi que son contexte pâle soient similaires à ceux de *G. tsugae* Murill, la forme courte et clavée de ses piléocystides, semble l'éloigner des spécimens appartenant au complexe *lucidum* (cylindriques sur 60-80 µm).

Il est donc peu probable que *G. tsugae* soit réellement impliqué dans la médecine traditionnelle chinoise, ou qu'il soit à l'origine des acides ganodériques ou tsugariques décrits dans la littérature. Les spécimens utilisés en médecine chinoise, que l'on nomme Lingzhi des pins, correspondraient à une autre espèce, dont la nomination n'a pas encore été établie selon la classification traditionnelle.

SPÉCIMENS EXAMINÉS :

Ganoderma lucidum (W.Curt. : Fr.) P. Karsten :

France, Dordogne, région de Sarlat. Sur Chêne. 2009. Leg. C. Decock. Det. C. Decock. **France**, Vendée, La Roche-sur-Yon. 10 Octobre 2008. Leg. R. Pacaud. Det. R. Pacaud. **France**, Ariège Pyrénées. Sur chênes vert. 27 Septembre 2007. Leg C. Lécuru. Det S. Welti.

Ganoderma tsugae Murrill. :

Etats-Unis, Harvard. Sur souche *T. canadensis*. 27 Août 2006. PAIUSA 82

Ganoderma praelongum Murr. :

LECTOTYPE : **CUBA**, Alto Cedro, province de Santiago de Cuba. Sur arbre mort. 19 Mars, 1908 (NY, fragm. BR).

Le complexe *resinaceum sensu lato* regroupe des espèces présentant toutes des chlamydospores dans la chair ou lorsqu'elles sont mises en culture (Moncalvo, 2000). Ce complexe se divise en deux clades. Le premier concerne les spécimens récoltés en zone tempérée (*G. resinaceum*) (figure 51 : 5), tandis que le deuxième se distingue par des spores plus petites et concerne les spécimens récoltés en zone tropicale *(G. weberianum)*(Figure 51 : 3 et figure 50). Les spores de *G. resinaceum* présentent des échinules moins épaisses, moins longues mais plus denses que *G. lucidum* (figure 49) (Steyaert, 1980 ; Moncalvo, 2000). Sa chair est épaisse, de couleur chamois (brun chocolat à proximité des tubes), de texture liégeuse, plus molle et moins ferme que celle du *G. lucidum*. Les carpophores du *G. resinaceum* sont légers après dessiccation. Une de nos récoltes, SW17, appelée *G. subamboinense* var. *laevisporum* (voir partie inventaire) dont les piléocystides sont également cylindriques (voir figure dans la partie inventaire) et amyloïdes, se situe dans ce clade. Sa séquence ITS est identique à celle du *G. subamboinense* retrouvée sur GenBank (X78736) (figure 51 : 4). Sa chair est bicolore, brune près des tubes et de couleur fauve près du revêtement. Elle présente également des zones ou des taches blanchâtres relativement étendues, de la même façon que pour *G. tsugae.* Au niveau micro-morphologique, la principale différence observée entre les complexes *resinaceum* et *lucidum* résident *a priori* dans la longueur des piléocystides : entre 60 et 80 µm pour le complexe *lucidum vs* 40 à 50 µm pour le complexe *resinaceum*. En revanche, pour les deux groupes présentent des piléocystides cylindriques et amyloïdes.

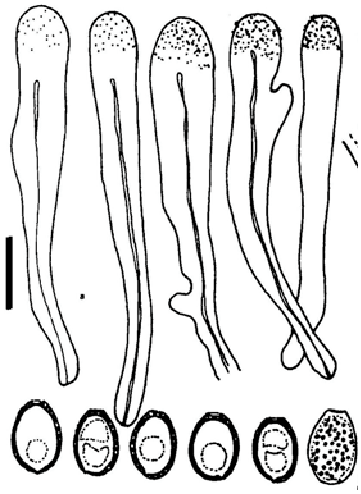


Figure 50 : Piléocystides et basidiospores de *G. weberianum* ; 1 bar = 10 µm (Torres-Torres, 2007)

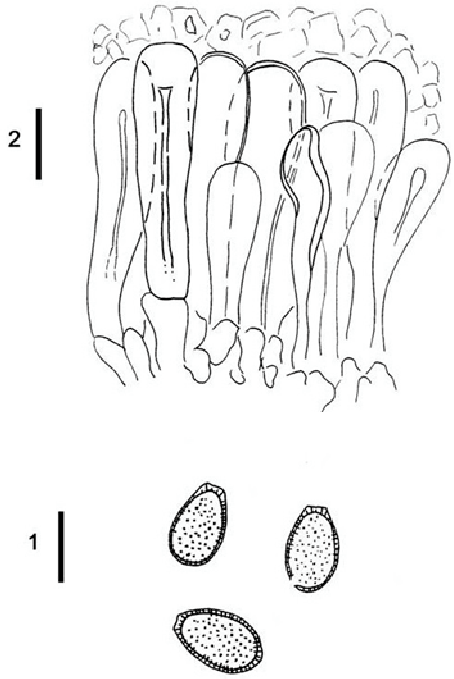


Figure 49: Piléocystides et basidiospores de *G. resinaceum* ; 1 bar = 10 µm (Leg. Cony Decock)

SPÉCIMENS EXAMINÉS :

G. resinaceum Boud.

Belgique, Brabant Wallon, Perbais, sur chênes. 2009. Leg Cony Decock. Det Cony Decock.

G. subamboinense P. Henn

Martinique, Prêcheur, Anse Couleuvre, sentier de la cascade de la rivière Couleuvre. Sur *Artocarpus altilis*, en forêt mésophile secondaire âgée. 13 août 2007. *SW 17* (LIP) – séquence MCU C494531 ; Leg. J.-P. Fiard. Det. C. Decock

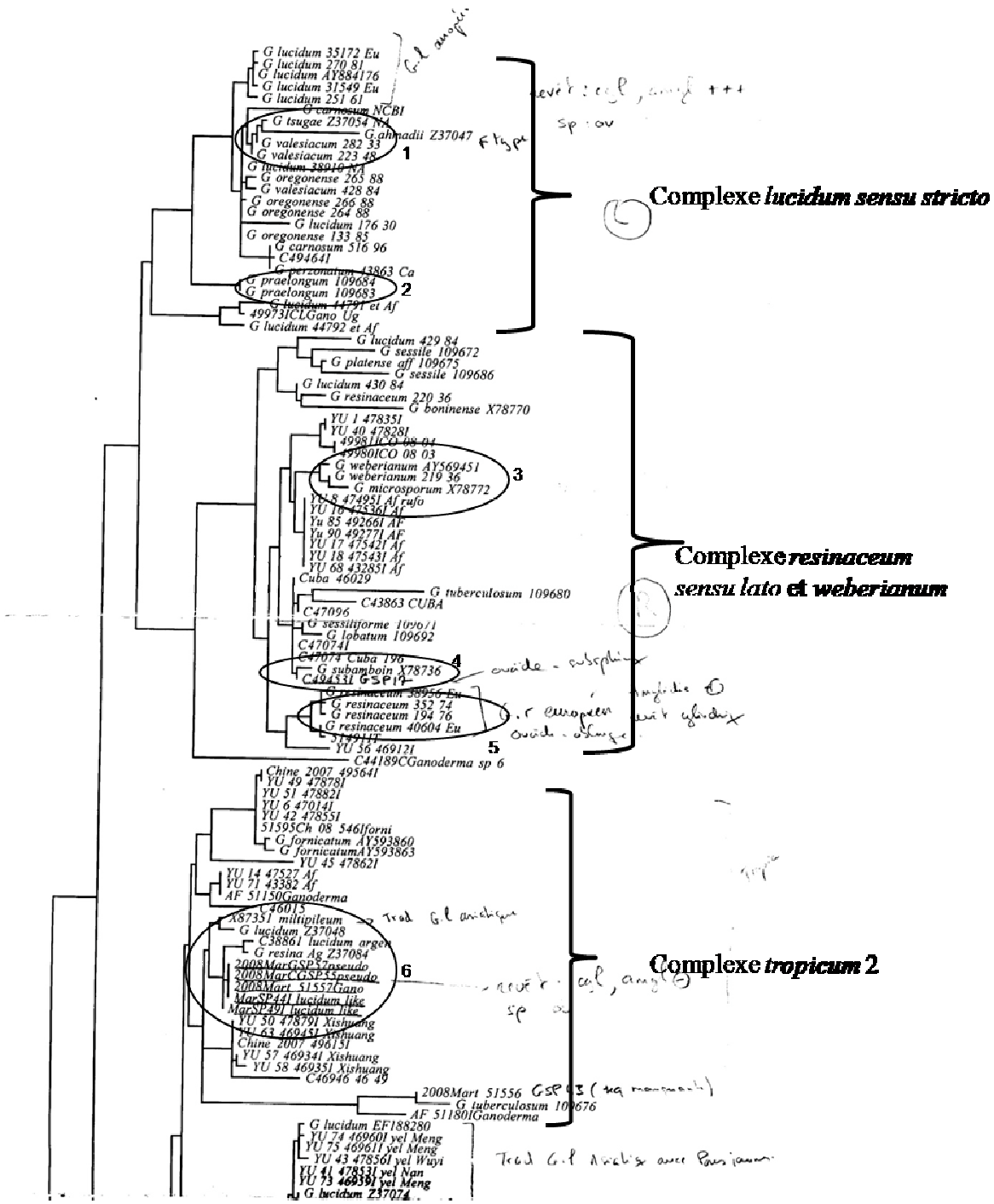


Figure 51

Le complexe *curtisii* ne produit pas de chlamydospores (Moncalvo, 2000). Il peut être divisé en deux groupes. Le premier concerne les spécimens du nord-est américain et du Costa Rica, correspondant à *G. curtisii* ; le deuxième concerne les spécimens d'Asie orientale qui possèdent une chair pâle et une surface porée jaunissante (*comm. pers.* Cony Decock) (Chine, Taiwan, Corée, Japon et Vietnam) (Figure 53 : 2). Deux spécimens achetés en Chine *(G. lucidum* asiatique de référence 1 et 2) correspondent à cette description morphologique. De

plus, leurs spores sont de forme ovoïde avec des échinules longues, épaisses et cylindriques. Leur piléocystides, courtes (20-30 µm) mais larges (8-12 µm), clavées, pyriformes ou légèrement cylindriques à proximité de l'apex, lisses, parfois bosselées latéralement ou au sommet, et amyloïdes (figure 52) se différencient de celles du *G. lucidum sensu stricto* européen (figure 48) qui sont cylindriques et longues (70-80 µm). Ainsi, les Ganodermes du deuxième groupe sont désignés à tort sous le nom de *Ganoderma lucidum* ou *G. tsugae*, traditionnellement appelé Lingzhi (Moncalvo, 1995 ; Wang *et al.*, 2009).

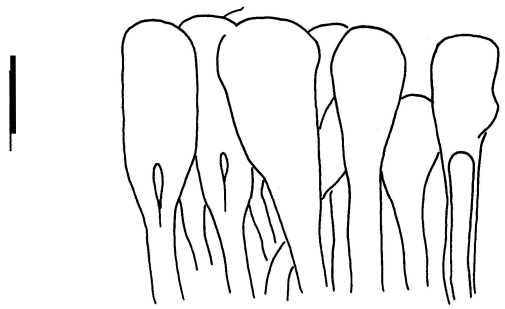


Figure 52 : piléocystides de *G. lucidum* asiatique (1 Bar = 10 µm)

Le complexe *tropicum* est un groupe hétérogène, non monophylétique qui peut être séparé en deux clades distincts : *tropicum* 1 et *tropicum* 2. **Le complexe *tropicum* 1** regroupe des spécimens de Cuba récoltés par Cony Decock, une espèce asiatique utilisée en médecine traditionnelle, également désignée sous le nom de *Ganoderma lucidum*, et nos récoltes de Martinique correspondant aux spécimens SW45, SW46, SW47, SW49 et SW6 (figure 53 : 3). La micro-morphologie des spécimens antillais est identique à celle de l'holotype de *G. tuberculosum* (spores ovoïdes à subsphériques et cellules du revêtement clavées et non amyloïdes - voir plus loin la description dans la partie inventaire). **Le complexe *tropicum* 2** regroupe plusieurs spécimens chinois et une espèce correspondant à *G. multipileum* (spécimen indien) dont la séquence a été obtenue sur GenBank. Le séquençage des ITS a permis de rapprocher certains de nos spécimens (SW55, SW49, SW44, SW 57) récoltés aux Petites Antilles avec l'espèce taiwanaise désignée sous le nom de *G. lucidum*. Wang *et al.* (2009), après observation morphologique de l'holotype, a renommé cette espèce, située sur le même clade que le spécimen indien, sous le nom de *G. multipileum* (figure 53 : 1). Nos spécimens dont les piléocystides sont de forme cylindrique à conique, non amyloïdes et de longueur

égale à 25-30 µm correspondent à une nouvelle espèce que nous avons nommé provisoirement *Ganoderma martinicense* Welti & Courtecuisse (voir la description figurant dans la partie inventaire).

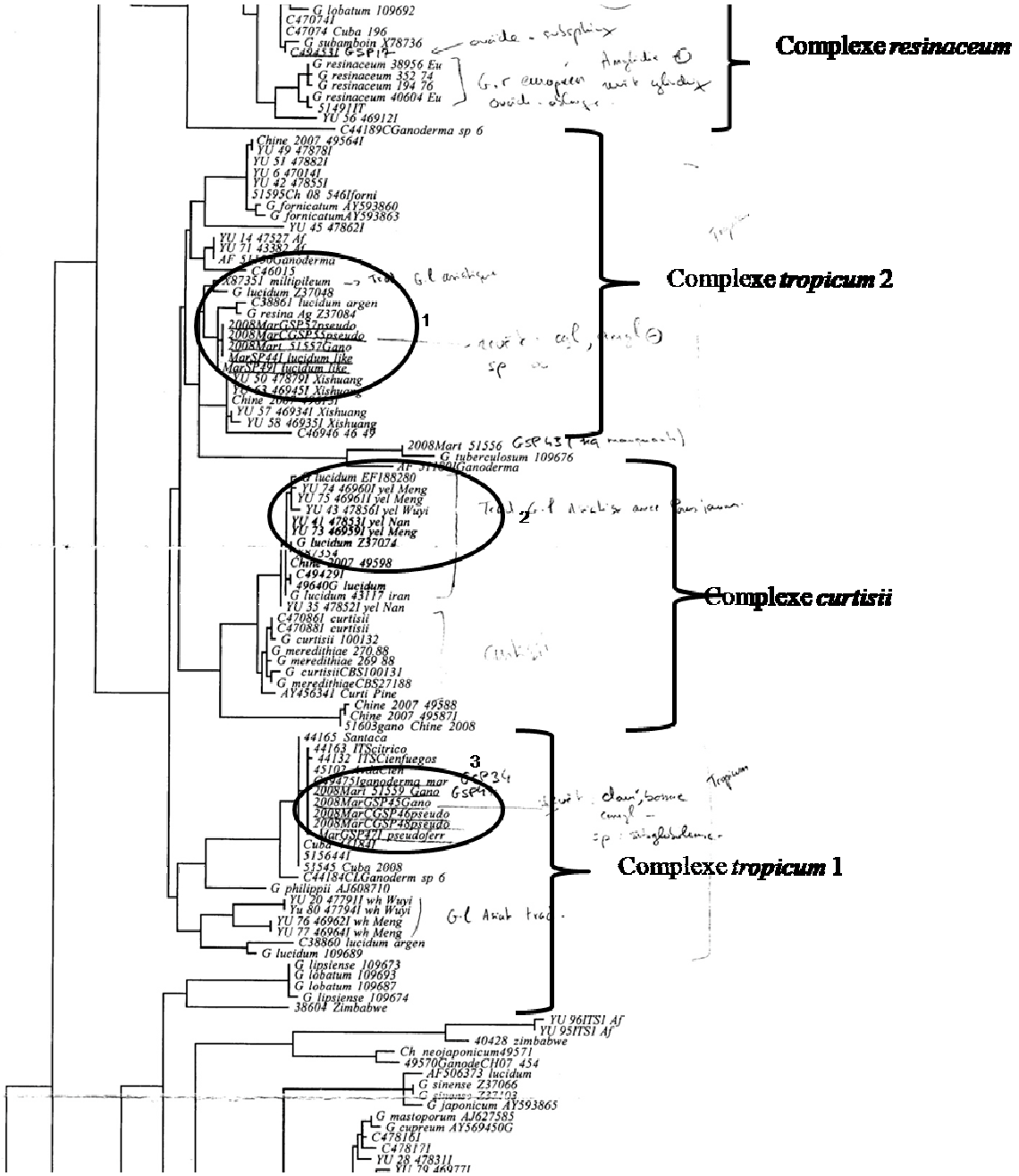


Figure 53

Le complexe des *Ganoderma* dont le revêtement est de type intermédiaire (revêtement laqué et sublaqué)

Il regroupe plusieurs sous-clades. D'abord, celui des ganodermes parasitant les palmiers comme *G. zonatum* (figure 57) en Floride ou *G. boninense* en Asie du Sud-Est, en Australie et dans les îles du Pacifique. Le revêtement de *G. zonatum* est sublaqué, les piléocystides sont courtes (20-25 µm), amyloïdes, claviformes, bossues par endroit, ses spores sont oblongues et finement échinulées (description des spores : voir Steyaert, 1967b). Un autre spécimen, de couleur brun-noir, récolté sur l'île de la Réunion dans le cadre d'une thèse en Pharmacie (Thomas Manidren, 2009) et identifié comme *G.* cf *boninense* (voir description de Steyaert, 1967 et figure 55) présente les mêmes spores que *G. zonatum*. Par contre, les piléocystides sont irrégulièrement claviformes, le plus souvent capités, lobulés ou bourgeonnant latéralement. L'aspect général est ramifié ou 'antlered like' (figure 54).

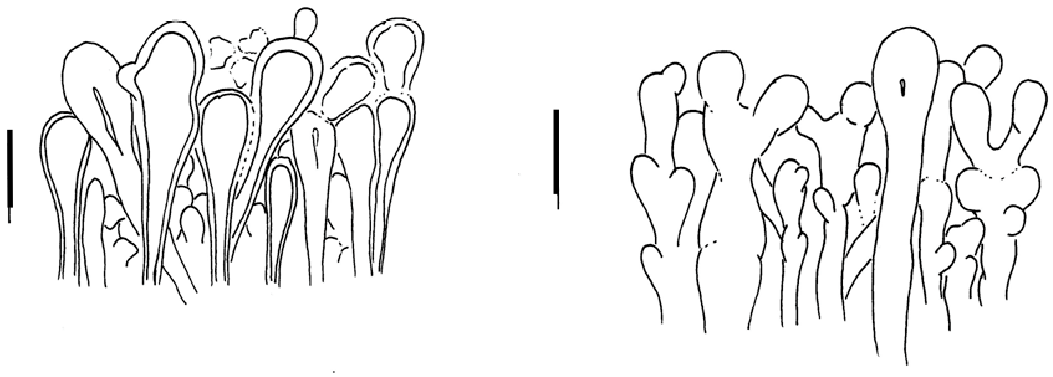


Figure 54 : piléocystides de *G. zonatum* à gauche et piléocystides de *G* . cf *boninense* à droite (1 bar = 10 µm).

Figure 55 : *Ganoderma* cf. *boninense* Patouillard (Leg. Thomas Manidren. Det. Stéphane Welti)

SPÉCIMENS EXAMINÉS :

G. zonatum Murr.

LECTOTYPE : **Etats-Unis**, Floride, sur arbre couché, 1902 (NY, fragm. BR)

G. cf *boninense*

France, l'île de la Réunion, forêt de Mare-Longue. Le 11 octobre 2007. Leg. Thomas Manidren. Dét. Stéphane Welti

L'autre groupe de ce clade concerne le complexe *sinense* (figure 57) . Il inclut les spécimens de Chine, de Taiwan et de Corée. Ils sont de couleur noire, laqués, brillants, la chair est brun-noir, de consistance liégeuse et sont utilisés en médecine traditionnelle. *G. sinense*, d'après la pharmacopée Chinoise, correspond, tout comme '*G. lucidum*' au Lingzhi. *G. neojaponicum* ainsi que *G. formosanum* sont également retrouvés dans ce clade. Un de nos spécimens acheté en Chine, répondant aux caractéristiques morphologiques de *G. sinense*, a été étudié au plan micromorphologique. Les piléocystides sont courtes et clavées, en forme d'ampoule, amyloïdes et se développent de manière perpendiculaire aux hyphes génératrices (figure 56).

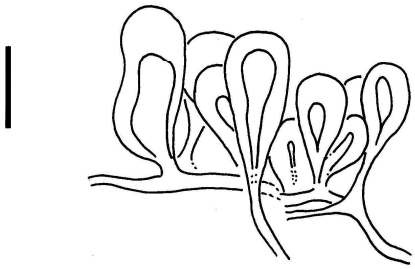


Figure 56 : piléocystides de *G. sinense* 1 bar = 10 µm

Ainsi, la forme des piléocystides de ce clade au revêtement intermédiaire (sublaqué ou mat) n'est pas homogène, contrairement aux spécimens retrouvés dans les complexes *lucidum* ou *resinaceum*.

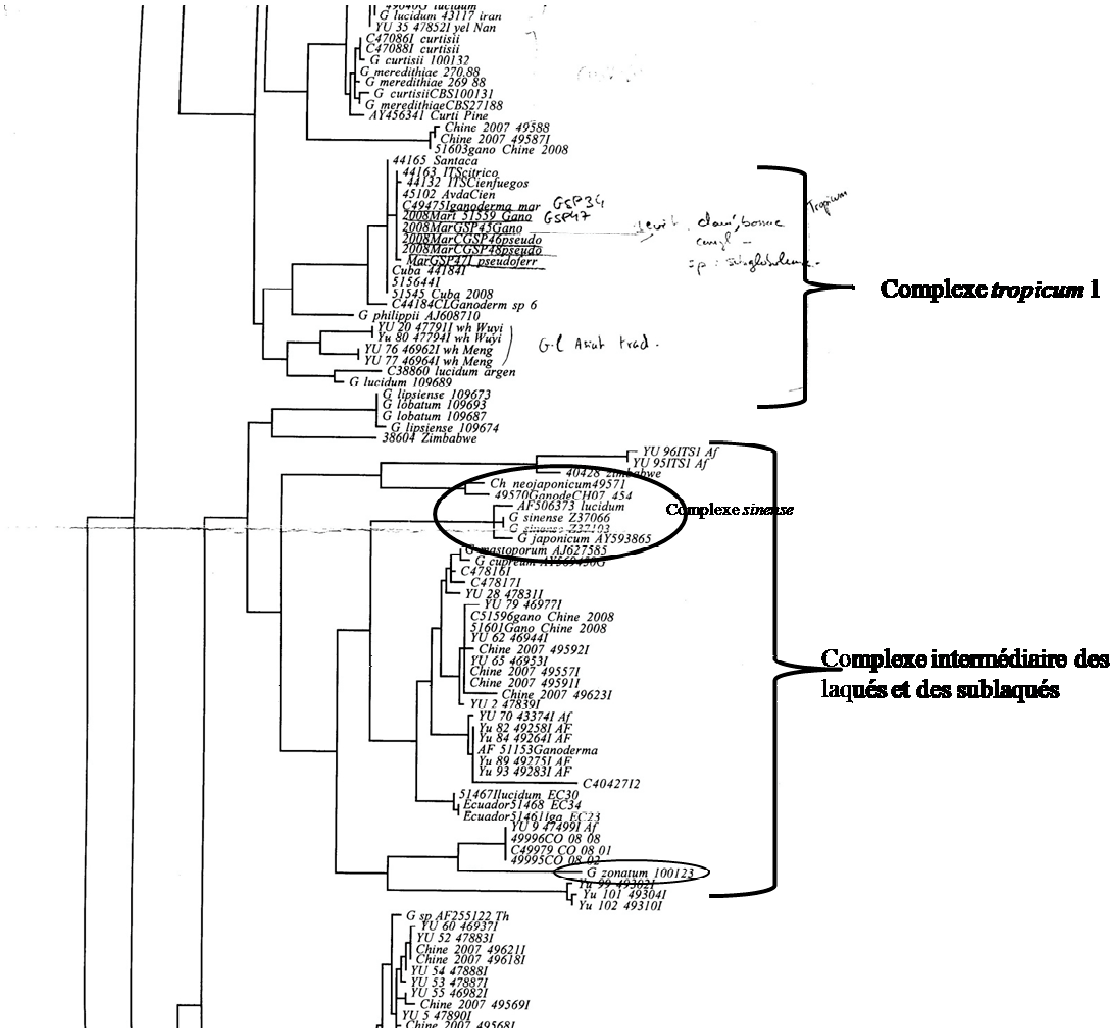


Figure 57

c-2) Complexes retrouvés dans les Ganodermataceae dont le revêtement est indifférencié

c-2) Complexes retrouvés dans les *Ganodermataceae* dont le revêtement est indifférencié

Le complexe applanatum-australe

Il regroupe les Ganodermes dont le revêtement est indifférencié, coriace. Leur chair est brun-noir. Moncalvo (2000) situe également dans cet immense clade une espèce correspondant à *G. pfeifferi* dont le revêtement est laqué, mais dont la chair est également noire. Cet exemple mentionné par Moncalvo (2000) est cité de manière à mettre en exergue les limites de la taxonomie basée sur des critères morphologiques. Ce complexe est divisé en deux groupes : celui regroupant les spécimens d'Europe, du Japon et de l'Amérique du Nord, et celui regroupant les spécimens retrouvés dans l'hémisphère sud en zone tropicale. Dans ce dernier sous-clade, correspondant au '*G. australe* complex *sensu stricto'*, sont retrouvées deux nouvelles espèces récoltées aux Petites Antilles : l'une correspondant au *G. neogibbosum* (figure 58 : 1) et l'autre correspondant au *G. parvigibbosum* sur *Pinus* et *Arecaceae* (figure 58 : 2).

Dans tous les cas, ces résultats de séquençage montrent qu'il existe, au niveau tropical, plusieurs espèces différentes apparentées au *G. australe* et que celles-ci sont toutes différentes de l'espèce européenne *G. adspersum* (Schulz.) (= synonyme de *G. europaeum* Steyaert).

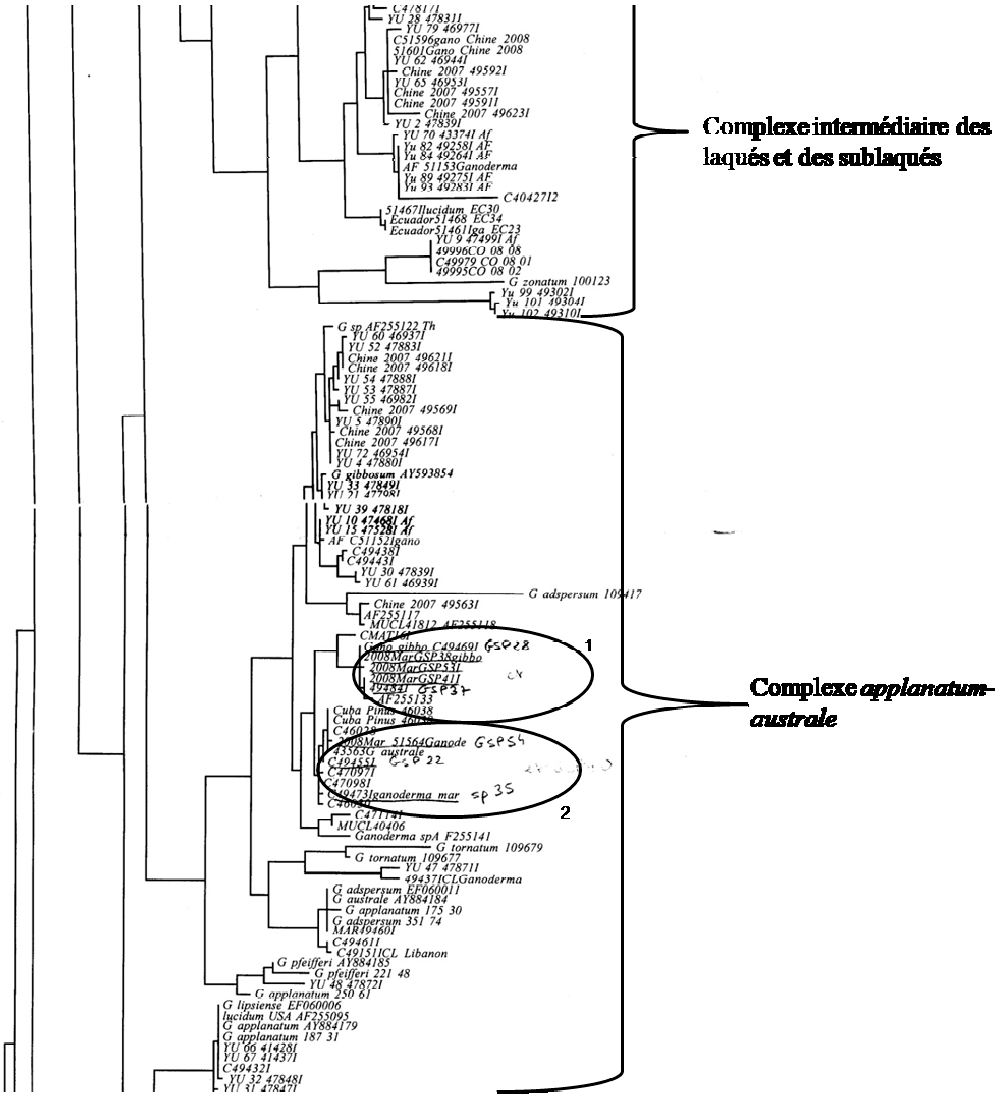


Figure 58

Le complexe des leucoganodermes (*comm. pers.* Cony Decock) regroupe différents clades monophylétiques dont les spécimens représentatifs possédent tous une chair molle, de couleur ocre pâle. Le revêtement caractérisant ce clade est constitué d'hyphes hyalines entremêlées les unes aux autres, figées dans une résine compacte, et bien distinctes de la chair. On retrouve dans ce groupe le genre *Humphreya* Lloyd, le genre *Tomophagus* Murrill dont l'unique représentant correspond à *T. colossus* (Fr.) Murrill, ainsi que certaines espèces du genre *Ganoderma* (*G. amazonense, G. hildebrandii, G. flaviporum*). Les caractères morphologiques permettant de distinguer ces genres monophylétiques entre eux ne sont pas encore bien définis. C'est la raison pour laquelle, comme nous l'expliquerons par la suite, certaines attributions génériques comme celles de *G. flaviporum* ou *G. amazonense*, pour lesquels un changement de combinaison serait envisageable, sont pour l'instant maintenues. Dans ce

complexe, nous retrouvons certaines de nos espèces récoltées en Martinique (figure 59) comme *Humphreya coffeatum.*

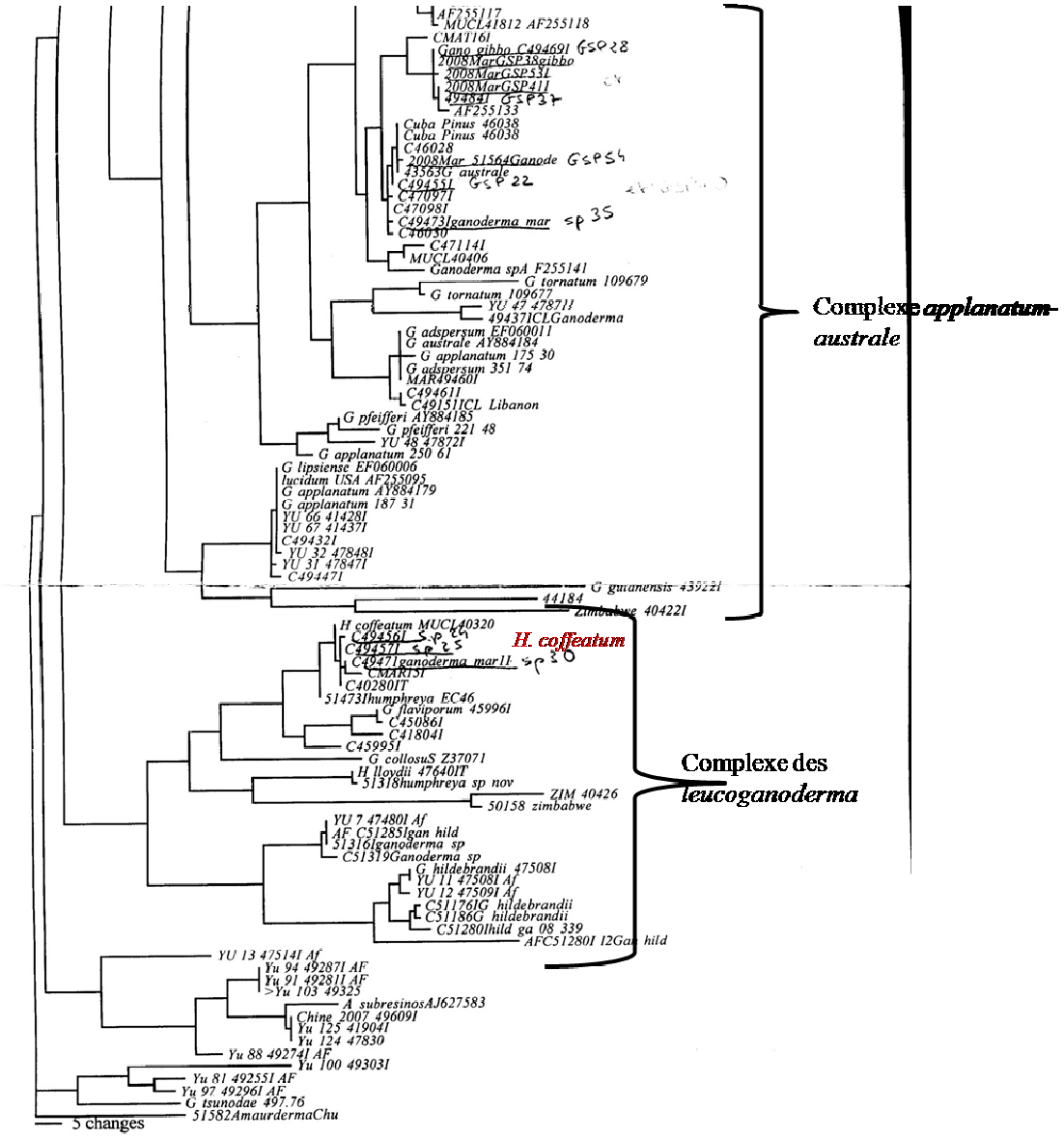


Figure 59

B) Inventaire et description des *Ganodermataceae* présentes dans les îles des Antilles françaises.

La récolte des spécimens identifiés selon la méthode traditionnelle et moléculaire, ainsi que les données publiées, permettent de dresser un inventaire provisoire des *Ganodermataceae* présentes sur les îles des Antilles, tandis que la description des autres polypores récoltés ayant fait l'objet d'un criblage pharmacologique figure en annexes de la thèse.

Ce travail préliminaire s'appuie sur les reconstructions phylogéniques du genre parues récemment (Moncalvo, 2000 ; Hong & Jung, 2004 ; Wang *et al.*, 2009) et s'intègre également dans une nouvelle approche des *Ganodermataceae* (C. Decock, Louvain-la-Neuve, Belgique, au travail duquel nous collaborons par ailleurs), qui donnera lieu prochainement à une synthèse générale.

Dans l'état actuel de notre approche, certaines récoltes ne peuvent être déterminées avec certitude. Dans la majorité des cas, soit les caractères morphologiques, soit le résultat des séquençages (voir partie expérimentale) et du positionnement sur les arbres phylogénétiques en cours de réalisation permettent de cerner leur groupe d'appartenance (espèces collectives, clades, ensembles à débrouiller). Pour ces cas, des travaux complémentaires (nouveaux séquençages, examen de types d'espèces tropicales pour confrontation des caractères morphologiques, études chimiques et chromatographiques, ou nouvelles récoltes pour compléter le matériel examiné) sont nécessaires.

Nous listons donc uniquement les taxons qui réunissent un ensemble de caractères suffisamment significatifs pour être décrits correctement et retrouvés ultérieurement sur le terrain. Trois espèces nouvelles sont proposées ; deux d'entre elles appartiennent au complexe *G. australe* et la troisième au groupe de *G. multipileum*. Leur validation (diagnose latine) sera effectuée dans le cadre d'une publication, actuellement sous presse (Welti & Courtecuisse, 2009). De ce fait, les noms correspondants sont mentionnés ici sous la forme « *nom. prov.* ».

Les données publiées disponibles proviennent de différentes sources : Patouillard (1899), Patouillard, *in* Duss (1903), Murrill (1908), Ryvarden (1983, 2000a), David & Rajchenberg (1985), Moncalvo & Ryvarden (1997), rassemblées partiellement dans la synthèse de Minter *et al.* (2001) et de manière exhaustive par Courtecuisse (2009).

Pour la Martinique et la Guadeloupe (et dépendances), on trouve citées les espèces suivantes (pour l'ensemble des deux îles, sauf mention contraire) : *Amauroderma exile* (Berk.) Torrend, *A. rude* (Berk.) Torrend, *Ganoderma australe* (Fr. : Fr.) Patouillard, *G. colossum* (Fr.) Baker (Martinique), *G. dussii* Patouillard (Guadeloupe), *G. lucidum* (W. Curtis : Fr.) P. Karsten, *G. lucidum* var. *badium* Patouillard (Guadeloupe), *G. mangiferae* (Léveillé) Patouillard (Guadeloupe), *Ganoderma sp.* (Minter *et al.* pour la Guadeloupe), *G. stipitatum* (Murrill) Murrill (Guadeloupe), *Humphreya coffeatum* (Berk.) Steyaert (Martinique).

Certains de ces noms sont critiques, dans l'état actuel des connaissances et nous discuterons de leur pertinence ci-dessous, dans une énumération détaillée qui ajoute nos propres apports. Certaines de nos déterminations sont encore préliminaires. Elles concernent les récoltes effectuées lors des missions sur le terrain et tiennent compte des reconstructions phylogéniques en cours réalisés par C. Decock (voir ci-dessus).

Sous chaque espèce, listée sous son nom actuel correct, on trouvera les synonymes principaux (en particulier ceux présentant une pertinence biogéographique – pour une liste plus complète des synonymes, voir Courtecuisse, 2009), les citations issues de la littérature pour le secteur considéré (toutes les références effectivement consultées sont assorties du symbole [!]), des commentaires sur le caractère critique éventuel ou sur les problèmes qui se posent autour de la citation, des informations, discussions, descriptions et illustrations pour les récoltes personnelles, en particulier si elles sont nouvelles pour le secteur géographique.

1) Genre *Amauroderma* Murrill, 1905, *Bull. Torrey Bot. Cl.* 32(7), p. 366

a) *Amauroderma exile* (Berk.) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.* 18, p. 142

BASIONYME : *Polyporus exilis* Berk., 1856, *Hooker's J. Bot.* [London] 8, p. 173 [LECTOTYPE : Brésil, Panure, Amazonas State, « Spruce n°31 » (K)]

= *Polyporus macer* Berk., *Hooker's J. Bot.* [London] 8, p. 176 [LECTOTYPE : Brésil, Panure, Amazonas State, « Spruce sans n° » (K)] ≡ *Ganoderma macer* (Berk.) Patouillard, 1889, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 79 ≡ *Fomes macer* (Berk.) Saccardo, 1891, *Syll. Fung.* 9, p. 178 [!] ≡ *Amauroderma macer* (Berk.) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.* 18, p. 140

= *Ganoderma rufobadium* Patouillard, 1889, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 78 [HOLOTYPE : Vénézuéla (Gaillard)]

Citations dans la littérature :

* Minter *et al.* (2001) p. 41, 750 [Guadeloupe], 756 [Martinique] [!].

Pas de récolte personnelle. Pour une description, voir Ryvarden (2004, p. 55).

DISCUSSION : Cette espèce n'est pas critique.

b) *Amauroderma intermedium* (Bresadola & Patouillard) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.* 18, p. 128

BASIONYME : *Ganoderma intermedium* Bresadola & Patouillard, *in* Patouillard, 1889, *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 5, p. 76 [LECTOTYPE : Brésil (FH)] ≡ *Amauroderma rude* var. *intermedium* (Bresadola & Patouillard) Furtado, 1968, *Revision Gen. Amauroderma*, p. 251

= *Ganoderma guadelupense* Patouillard, 1899, *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 15, p. 198 [LECTOTYPE : Guadeloupe, Camp Jacob, « Duss 111 » (FH)] [!] ≡ *Fomes guadelupensis* (Patouillard) Saccardo & P. Sydow, 1902, [Saccardo] *Syll. Fung.* 16, p. 153 [!]

Citations dans la littérature :

* Patouillard, (1899) p. 198 [Guadeloupe] – s.n. *G. guadeloupense* [!].

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 35 [Guadeloupe, Basse-Terre ; Basse-Terre, sur *Mammea americana*, Duss 111, 878] ; [Martinique ; Morne-Rouge (fond Marie-Reine), Duss 1695] – s.n. *G. guadalupense* [!].

* Murrill, (1908) p. 118 [Guadeloupe – *s.n. Ganoderma rude*] – « according to Bresadola, this species is not different from *G. intermedium* Bres. & Pat. » : voir la discussion ci-dessous [!].

* Ryvarden (1983) p. 20 [Guadeloupe ; Camp Jacob, HOLOTYPE : *G. guadelupense* Duss 111 (FH)] [!].

* Moncalvo & Ryvarden (1997) p. 44 [Guadeloupe ; Camp Jacob, LECTOTYPE *G. guadelupense* Duss 111 (FH)] [!].

* Minter *et al.* (2001) p. 41, 750 [Guadeloupe – *s.n. Amauroderma rude*] [!].

Pas de récolte personnelle. Pour une description, voir Ryvarden (2004, p. 56).

DISCUSSION : Moncalvo & Ryvarden (1997) indiquent qu'un complexe d'espèces se cache sous le binôme *A. rude*, qui nécessite une révision taxonomique critique. *Amauroderma rude* (Berk.) Torrend, 1920, *Broteria, Bot.* 18, p. 127 [BASIONYME : *Polyporus rudis* Berk., 1839, *Ann. Mag. Nat. Hist.* 3, p. 323 [LECTOTYPE : Tasmanie, « R. Gunn, ex herb. Sir W. Hooker » (K)] ≡ *Ganoderma rude* (Berk.) Patouillard,

1889, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 76] au sens large est signalé de nombreux pays tropicaux (et c'est sous ce nom que quelques auteurs identifient leurs récoltes issues du domaine Caraïbe, comme on le voit ci-dessus) mais il semble actuellement que seules les récoltes paléotropicales correspondent à *A. rude* au sens strict (le type est originaire de Tasmanie), alors qu'il serait préférable de conserver *A. intermedium* pour les récoltes néotropicales. C'est en tous cas l'option adoptée par Ryvarden (2004), que nous suivons volontiers en nous basant sur notre expérience actuelle et sur les arguments qui semblent s'accumuler au gré des études moléculaires en cours (C. Decock, *comm. pers.*). Quoiqu'il en soit, les récoltes antillaises futures devront être décrites soigneusement pour apporter des éléments à cette discussion.

2) Genre *Ganoderma* P. Karsten, 1881, *Rev. Mycol.* [Toulouse] 3, p. 17.

***a) Ganoderma amazonense* Weir**, 1926, *Bull. U.S. Dept. Agric.* 1380, p. 84 [LECTOTYPE : Brazil, Amazonas, Para, Cocal Grande, sur *Spondias lutea* dans une plantation de *Hevea brasiliensis*, « Weir », s.n. (BPI 62043)]

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre. Sur grosse pièce de bois mort, en forêt mésophile secondaire âgée. 27 août 2008. *SW 59* (LIP). Leg. S. Welti. Det. S. Welti.

DESCRIPTION :

Chapeau spatulé ou elliptique vu de dessus, d'insertion latérale assez étroite, non stipité, souvent bossu au point d'insertion, de petite taille : 5-6 cm de long, 4,5-5,5 cm de large, 1-1,8 cm d'épaisseur à la base et 0,3-0,5 cm vers la marge. Consistance non évaluée sur le frais mais revêtement rigide et cassant sur échantillon sec. Surface mate, non vernissée, glabre, marquée par des cernes concentriques et étroits sans relief très perceptible, l'ensemble étant plutôt légèrement cabossé ou chagriné que réellement sillonné concentriquement ; une grosse excroissance prolonge la bosse du point d'attache sur toute la longueur du chapeau et jusqu'à 0,5 cm de la marge sur l'un des échantillons, donnant l'impression qu'il s'agit d'un ancien primordium très allongé (40 x 13-18 mm) sous lequel a poussé une autre couche piléique plus plane constituant le sporophore récolté. Couleur brun chocolat à châtain moyen ou foncé par cernes concentriques peu distincts, la marge n'étant pas spécialement plus claire, sauf à l'extrême bord qui est étroitement jaune orangé terne ou crème (cette couleur éventuellement

limitée à la partie inférieure de la marge). Marge un peu flexueuse, assez fine, voire aiguë. **Stipe** nul, mais l'insertion se fait par la face supérieure du chapeau et une partie du sporophore peut esquisser un pied en continuité avec la bosse du chapeau à ce niveau. **Chair** subéreuse, un peu compressible sur échantillon sec (prend l'empreinte de l'ongle, par exemple), non zonée concentriquement, dépourvue de toute ligne sombre, de couleur très claire, beige pâle à chamois pâle ou café au lait, les parties supérieures étant les plus claires, assez peu épaisse : 3-9 mm. **Hyménophore** légèrement convexe et parfois bosselé, de couleur assez claire, ocre brunâtre avec des zones plus jaunâtres, brunissant au toucher. Tubes non stratifiés, 3-7 mm de long, moutarde à cannelle clair, de texture subéreuse à l'état frais puis ligneuse au sec. Pores circulaires ou anguleux, assez variables et séparés par des dissépiments fins pour le genre (d'où un aspect un peu chatoyant de l'hyménophore en faisant varier l'incidence de la lumière), relativement fins mais parfois assez amples pour le genre (2-3, parfois 4/mm).

Figure 60 : *G. amazonense* Weir ; SW 59. Aspect morphologique des basidiomes (Régis Courtecuisse)

Spores : 8-[8.2]-9 x 6-[6.25]-7 µm (Q = 1.28), subsphériques à ovoïdes, guttulées, les échinules sont épaisses, longues et distantes entre elles, avec la présence rare de crêtes courtes et sinueuses longitudinales au niveau de l'apex. Elles sont de couleur brun clair au KOH 5% presque jaune et beaucoup plus pâles et hyalines comparé aux autres espèces de ganoderme excepté les échinules qui possèdent la couleur brune habituelle des autres ganodermes. Leur aspect, hormis leurs ornementations, se rapproche de ceux des spores de *Humphreya*. **Les piléocystides du revêtement du chapeau** ne sont pas différenciées comme peuvent l'être

celles des ganodermes laqués. Elles sont de couleur orangé au KOH 5% et l'ensemble du revêtement résulte de l'agglutination de l'extrémité d'hyphes génératrices ou squelettiques, de spores et d'autres débris fongiques baignant dans une espèce de résine qui donne à l'ensemble une structure relativement compacte mais souple. L'épaisseur est de 150 à 200 µm. **Les hyphes du contexte** peuvent être séparées en deux groupes : certaines sont larges, de diamètre x 3-5 µm, aux parois épaisses (1-1,5 µm dépaisseur), les autres sont plus fines (< 2 µm), noduleuses par endroit, légèrement sinueuses, aux parois épaissies. Aucune hyphe génératrice n'a été retrouvée. **Les hyphes du dissépiment** sont hyalines et possèdent une paroi épaisse. On observe également deux types d'hyphes. Tout d'abord, celle de type arboriforme ou squeletto-ligative (Corner, 1983) dont la partie proximale est rectiligne et de diamètre égal environ à 4µm, et ramifiées dans la partie distale dont les extrémités sont pointues, de diamètre plus étroits égal à 1-1,5µm, plus sinueuses, noueuses parfois, aux parois plus fines avec de faux septum, et dont l'apex est pointu. L'autre type d'hyphes est de nature ligative (Corner, 1983), c'est-à-dire rectiligne et épaisse au centre, dont chaque extrémité se ramifie de manière bilatérale pour former une arborescence à l'image des hyphes squeletto-ligatives.

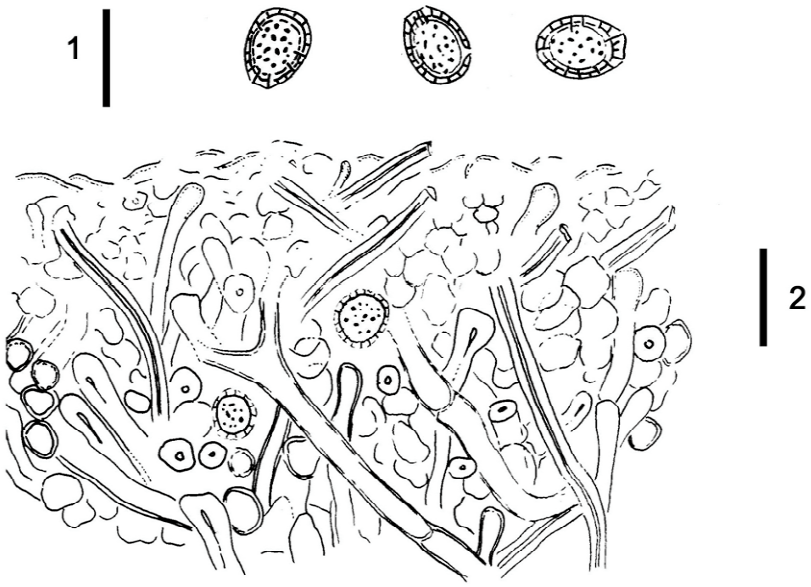


Figure 61 : *Ganoderma amazonense* Weir ; SW 59. 1 = spores ; 2 = pipeipellis (1 bar = 10 µm).

DISCUSSION : Ce taxon est nouveau pour la Martinique ; il était connu de Grenada pour les Petites Antilles, et de Jamaïque et de Porto Rico pour les Grandes Antilles (Minter *et al.*, 2001, p. 247). On le trouve également dans plusieurs pays des Néotropiques (Moncalvo & Ryvarden, 1997, p. 19), plus précisément au Brésil (d'où vient le type, révisé par Gottlieb & Wright, 1999b, p. 1295) et au Honduras (Steyaert, 1980, p. 165), au Costa Rica (Carranza, 1993), en Colombie (Guzmán *et al.*, 2004 ; Ruiz & Varela, 2006), mais aussi des Paléotropiques (Sierra Leone, Zaïre : Steyaert, *l.c.*, p. 166). Cette distribution afro-américaine est assez intéressante pour être soulignée mais elle devra être confirmée par des études plus fines, en particulier moléculaires (le séquençage de nos échantillons a malheureusement échoué). Par ailleurs, des mentions en sont faites en Asie (Malaisie : Corner, 1983, p. 154, et plus récemment Inde : Foroutan & Vaidya, 2007, p. 915) mais Moncalvo & Ryvarden (*l.c.*) confirment le doute exprimé par Corner lui-même sur l'identité des taxons malaisiens avec les récoltes d'Amérique (et d'Afrique). Il semble prudent de ne pas étendre l'aire de cette espèce à l'Asie pour le moment, la courte description des auteurs indiens ne reprenant pas les caractères particuliers signalés par Corner (couleur jaune sous le revêtement, dextrinoïdie des hyphes squelettiques), ce qui ne permet pas de trancher dans un sens ni dans l'autre. En suivant la clé de Ryvarden (2004), notre récolte ne pose pas de problème particulier de détermination. Elle se range dans le sous-genre *Plecoderma*. Les petites spores de couleur pâle, aux échinules épaisses et espacées formant les aspérités pariétales fines situées entre l'endo et l'exospore, le revêtement piléique sans organisation précise, ainsi que le contexte de couleur café au lait ou ocre pâle en sont des caractéristiques convaincantes. Cependant, il faut noter que Gottlieb & Wright (*l.c.*) donnent des pores petits (3-4/mm) et un dissépiment épais, alors que notre récolte présente des dissépiments fins pour le genre, les pores étant, de ce fait, de formes assez variables et parfois assez amples.

Il sera très intéressant d'obtenir des séquences de ce taxon pour le positionner dans la phylogénie des *Ganodermataceae*. En effet, certains caractères semblent le rapprocher des *Humphreya* et il pourrait s'agir d'un représentant d'un taxon (générique ou infra-générique) à isoler au sein de cette famille. La chair pâle, les spores claires aux échinules tendant à s'anastomoser, le revêtement piléique particulier, sont suffisamment originaux pour susciter cette question.

– *Ganoderma australe* (Fr. : Fr.) Patouillard, 1889, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 71

BASIONYME : *Polyporus australis* Fr. : Fr., 1828, *Elench. Fung.* 1, p. 108 [Type perdu, décrit initialement de « Pacific Is. »]

Citations dans la littérature :

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 35 [Guadeloupe, Basse-Terre ; Camp Jacob, sur bois pourrissant de *Prunus occidentalis* et d'*Artocarpus incisa*, Duss 115, 116, 124] [!].

* David & Rajchenberg (1985) p. 287 [Martinique ; forêt de Pointe Rouge, 10.1976 ; famille Martinel, 04.1977] [!].

SPECIMENS EXAMINES RELEVANT DE *G. australe* S.L.: **Martinique**, Rivière-Pilote, Morne Aca. Sur tronc mort, en forêt sempervirente saisonnière d'horizon inférieur à horizon type. 30 novembre 2006. *SW 2* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Guyane française**, Sinnamary, Paracou, site de recherche du CEMAGREF, parcelle GUYAFLUX. Sur gros tronc couché mort, en forêt méso-hygrophile secondaire. 27 février 2007. *RC/GUY07.021 = SW 10* (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Guyane française**, même lieu, même date. Sur tronc couché mort et très dégradé, en forêt méso-hygrophile secondaire. 27 février 2007. *RC/GUY07.030 = SW 11* (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Martinique**, Prêcheur, Anse des Galets. Sur arbre mort, en forêt sempervirente saisonnière tropicale secondaire. 30 août 2007. *SW 31* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, même lieu, même date. *SW 32* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre. Sur tronc couché, en forêt mésophile secondaire âgée. 25 août 2008. *SW 52* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre. Sur tronc couché, en forêt mésophile secondaire âgée. 27 août 2008. *SW 58* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, Le Robert, Bois Pothau. Sur tronc couché mort, en forêt méso-xérophile. 30 août 2008. *SW 58bis* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 59bis* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 62* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti.

DISCUSSION : L'application de ce nom pose de nombreux problèmes, déjà discutés en partie par Moncalvo & Ryvarden (1997). Le type est introuvable ou détruit et on peut simplement rappeler que les spécimens originaux proviennent des îles du Pacifique ; ceci laisse planer une grande incertitude sur la pertinence de l'usage de ce nom, d'une part pour des récoltes européennes (usage fréquent sur le vieux continent où le nom *G. adspersum* serait sans doute préférable pour l'espèce dont il est alors question) ou d'autre part pour des récoltes américaines. Le complexe *G. australe* (au sens le plus large) semble presque cosmopolite et il

renferme des taxons assez nombreux, dont certains semblent indiscernables sur la base d'une approche morphologique traditionnelle (voir Yeh, 1991 ; Yeh *et al.*, 1994 – cités par Moncalvo & Ryvarden, 1997). Les travaux de phylogénie moléculaire en cours (C. Decock, *comm. pers.*) permettent déjà d'isoler clairement deux taxons pour notre aire d'étude. Nous les décrivons de manière détaillée ci-dessous, sans toutefois les nommer pour le moment, afin de permettre de les retrouver et d'en cerner plus précisément l'amplitude de variation morphologique. Cette attribution de noms viendra avec l'achèvement des reconstructions phylogéniques du groupe. A côté des spécimens qui s'inscrivent clairement dans ces deux taxons, il nous reste un certain nombre de collections (des Antilles et de Guyane française) qu'il n'est pas possible d'attribuer précisément pour me moment (soit que le séquençage n'ait pas été possible, soit que la position dans les cladogrammes disponibles ne permette pas de les délimiter clairement, soit que les caractères morphologiques soient particuliers ou divergents de l'ensemble des morphotypes connus) – voir la liste ci-dessus. De même, il semble prudent d'attendre la révision des spécimens de Duss et de David (cités ci-dessus de la littérature) pour attribuer plus précisément les récoltes signalées par ces auteurs.

b) *Ganoderma colossum* (Fr.) Baker, 1918, *Cent. Fung. Malay.* 5, p. 42

BASIONYME : *Polyporus colossus* Fr., 1851, *Nov. Act. Soc. Sci. Upsal.* III, 12, p. 56 [LECTOTYPE : Costa Rica, Puntarena, sur *Cedrela odorata*, « A.S. Oersted, s.n. » (UPS)] ≡ *Tomophagus colossus* (Fr.) Murrill, 1905, *Torreya* 5, p. 197

= *Polyporus flavescens* Montagne, 1857, *Ann. Sci. Nat., Bot.* IV, 5, p. 368 [***illeg.***, non Rostkov, 1848] ≡ *Ungulina flavescens* (Montagne) Patouillard, 1900, *Essai Tax. Hyméno*, p. 103

Citations dans la littérature :

* Patouillard (1889) p. 340 [Martinique ; Duss 14] – s.n. *Polyporus flavescens* [!].

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 35 [Martinique ; Saint-Pierre, Duss 14] – s.n. *Ungulina flavescens* [!].

Pas de récolte personnelle. Pour une description, voir Ryvarden (2004, p. 78).

DISCUSSION : en fonction des caractères morphologiques discriminants (très grandes spores, piléocystides cristallifères, entre autres) nous aurions préféré adopter le genre *Tomophagus* comme genre autonome et utiliser la combinaison de Murrill pour ce taxon. Néanmoins, l'espèce se place dans les clades basaux de la famille des *Ganodermataceae* (C. Decock, *pers. comm.*), un groupe encore assez confus, dans lequel le 'genre' *Humphreya* est aussi impliqué

(voir discussion plus loin). Bien que la combinaison originale de caractères soit remarquable, il est alors préférable de conserver l'espèce dans le genre *Ganoderma s.l.* pour le moment.
G. colossum est connu de diverses regions tropicales et subtropicales (Ryvarden, 2000).

c) *Ganoderma dussii* Patouillard, 1899, *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 15, p. 198 [LECTOTYPE : Guadeloupe, Basse-Terre ; Baillif, sur bois pourrissant d'*Acacia lebeck* et de *Cassia fistula*, Duss 887 (FH)] [!].

Citations dans la littérature :

* Patouillard (1899) p. 198 [Guadeloupe] [!].

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 36 [Guadeloupe, Basse-Terre ; Baillif, sur bois pourrissant d'*Acacia lebeck* et de *Cassia fistula*, Duss 134, 887] [!].

* Ryvarden (1983) p. 16 [Guadeloupe ; Duss 887 (FH), reçu 07.1898] – étude du type qui est stérile et appartient au complexe de *G. lucidum* [!].

SPECIMENS EXAMINES : **Guadeloupe**, Petit-Bourg ; Leg. F. Lurel. Det. S. Welti.

Lectotype : Guadeloupe, Basse-Terre ; Baillif, sur bois pourrissant d'*Acacia lebeck* et de *Cassia fistula*, Duss 887, reçu le 29 Juillet 1898 (FH).

Description

Le chapeau mesure de 7 à 15 cm de diamètre, réniforme à circulaire à maturité avec une variété de couleur organisée en zones concentriques. D'abord de couleur noire ou très sombre au centre, puis brun-rouge à rougeâtre à environ une demi largeur du chapeau, jaunâtre en périphérie puis blanchâtre au niveau de la marge qui est de forme obtuse et arrondie. Les zones colorées ne sont pas bien délimitées et semblent se délaver au fur et à mesure que l'on s'approche de la périphérie. La surface est presque lisse et légèrement rapeuse en périphérie. Le bourrelet en périphérie précédent la marge blanchâtre et délavée est de faible amplitude mais relativement large. Une substance résineuse blanchâtre et bleutée recouvre en partie la surface au centre du chapeau. **Le stipe** est excentré, 6 x 2 cm, de couleur brun sombre presque noir, brillant et laqué, cylindrique et vaguement noduleux (figure 65).

La chair est de couleur cannelle brun pâle, plus sombre vers les tubes. Sa consistance est douce et subéreuse et montre d'étroites bandes blanchâtres plus ou moins parallèles à la surface du chapeau et à l'hyménophore. Les tubes sont courts (5 mm à proximité du stipe). **Hyménophore** tendant à être décurrent sur le stipe, présentant quelques bosses peu marquées, correspondant à des zones de croissante interne de la chair, une particularité également mise en évidence sur des coupes, sur lesquelles la limite inférieure de la couche des tubes peut être affectées d'irrégularités en raison de ce phénomène. La surface porée est de couleur ocre chamois et le dissépiment est fin. Les pores sont denses à très denses (4-5/mm).

Les spores font environ 11 x 6,5 µm (Q = 1,6-1,7), les parois sont assez pâles, étroites, presque hyalines de couleur jaune dorée au KOH 5%. **Les piléocystides** de l'hyménoderme sont rapidement et fortement amyloïdes. Leur forme est conique à la base puis cylindrique élargie au sommet, ou simplement clavée. La partie renflée mesure 20-25 x 7-9 µm, la paroi s'épaissit à partir de la moitié supérieure puis remplit les piléocystides sur leur tiers supérieur.

DISCUSSION :

L'unique spécimen de Guadeloupe a été déterminé après l'examen du type de l'espèce . L'aspect morphologique de celui-ci est assez similaire (excepté la surface porée encore immature qui montre des pores en voie de formation et une surface porée un peu plus pâle et un peu plus jaunâtre (voir figure ci-dessous la comparaison de l'aspect du revêtement supérieur du carpophores du spécimen récolté et du type). Les piléocystides des deux spécimens ont présenté une amyloïdie intense et rapide au Melzer. Malheureusement, les spores du type sont très rares au point que Ryvarden, dans ses commentaires, constate qu'aucune spore n'a été vue. Pour notre part, quelques unes ont été observées mais sous forme agglomérée et collapsée. Sur le spécimen récemment récolté, quelques spores ont été observées, malgré son stade de développement encore immature. Il est également regrettable qu'aucune donnée moléculaire ne puisse soutenir cette identification à l'heure actuelle. Nous pensons toutefois que cette hypothèse sera confirmée grâce à nos prochaines récoltes en Guadeloupe.

Figure 65 : *Ganoderma dussii* Pat. ; Aspect morphologique de la surface supérieure du chapeau. A gauche : spécimen récemment collecté par F. Lurel en Guadeloupe ; à droite : lectotype (FH) (S. Welti)

– *Ganoderma lucidum* (Leyss. : Fr.) P. Karsten, 1881, *Rev. Mycol.* [Toulouse] 3, p. 17

BASIONYME : *Boletus lucidus* Leyss., 1761, *Fl. Halensis*, p. 300 [NEOTYPE : W. Curtis, 1781, *Fl. Londin.*, pl. 224 (iconotype désigné par Steyaert, 1961)] ≡ *Polyporus lucidus* (Leyss.) **: Fr.**, 1821, *Syst. Mycol.* 1, p. 353 [!] ≡ *Fomes lucidus* (Leyss. : Fr.) Fr., 1851, *Nov. Symb. Mycol.*, p. 61 ≡ *Placodes lucidus* (Leyss. : Fr.) Quélet, 1888, *Fl. mycol. Fr.*, p. 399 = *Boletus laccatus* Timm, 1788, *Fl. megalop. Prodr.*, p. 269 ≡ *Ganoderma laccatum* (Timm) Patouillard *in* Bresadola, 1932, *Icon. Mycol.* 21, p. 1004

Citations dans la littérature :

* Patouillard (1889) p. 340 [Martinique ; Duss 16] [!].

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 35 [Guadeloupe, Basse-Terre ; Vieux-Fort, Gourbeyre, Basse-Terre, sur différents bois blancs, Duss 317, 721, 988, 1074] [!].

* David & Rajchenberg (1985) p. 286 [Martinique ; forêt de Pointe Rouge, 10.1976] – avec mention de l'appartenance de cette récolte au « complexe » de *G. lucidum* [!].

DISCUSSION : on ne manquera pas de remarquer l'absence de ce taxon dans la clé des espèces néotropicales à chapeau laqué de Ryvarden (2000), ce qui laisse à penser que le spécialiste norvégien considère l'espèce comme absence de cette région du monde. Cet avis coïncide

avec les conclusions d'études précédentes (Moncalvo *et al.*, 1995). Il semble plus prudent d'**éliminer ce nom** des listes de *Ganodermataceae* antillaises.

– *Ganoderma lucidum* var. *badium* Patouillard, 1899, *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 15, p. 199 [Holotype :] [!].

Citations dans la littérature :

* Patouillard (1899) p. 198 [Guadeloupe ; sur différents arbres, mais surtout sur citronnier] [!].

* Patouillard *in* Duss, 1903, p. 36 [sans localité] [!].

DISCUSSION : la courte description, telle que reprise par Saccardo (Saccardo & P. Sydow, 1902 : "*Pileo sessili v. substipitato, convexo, parum nitido, badio, margine albo; poris albis, dein umbrinis, angulosis, prima aetate fimbriatis; tubulis brunneis, trama molli, vix colorata; sporis ellipticis, echinulatis, 10 x 6*") est très vague et ne permet par une interprétation moderne de ce taxon. Les différences mises en avant entre la variété et le type sont le chapeau moins brilliant et les couleurs plus sombres. L'écologie est aussi imprécise ("a*d truncos arborum diversarum*"), et il n'est pas possible de maintenir ce taxon dans un cadre révisé selon des critères actuels, en attendant la révision d'un éventuel matériel authentique.

d) *Ganoderma mangiferae* (Léveillé) Patouillard, 1890, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5, p. 74

BASIONYME. : *Polyporus mangiferae* Léveillé, 1846, *Ann. Sci. Nat., Bot.* III, 5, p. 130 [LECTOTYPE : Tahiti, Mahe Island, « M. Perville 1841 » (PC) – voir discussion]

Citations dans la littérature :

* Patouillard *in* Duss (1903) p. 36 [Guadeloupe, Basse-Terre ; Basse-Terre, sur racine pourrie de *Mangifera indica*, Duss 119] [!].

Pas de récolte personnelle.

DISCUSSION : Les connaissances actuelles sur ce taxon ne permettent pas de conclure sur le fait qu'il s'agisse d'une espèce autonome. Son origine géographique peut être attribuée sans ambiguïté aux Seychelles (où se situe Mahé, comme le précise Léveillé lui-même pour une autre espèce dans la même publication – *Hexagona cyclophora*, à la p. 143) et non pas à

Tahiti (comme indiqué par ni si son aire d'indigénat est large sous les Tropiques. N'ayant pas pu consulter la description originale de Léveillé, il est même difficile d'affirmer l'origine géographique précise de ce taxon. Il s'agit vraisemblablement d'un ganoderme décrit des Seychelles (où se situe l'île de Mahé) et non de Tahiti (comme indiqué par Moncalvo & Ryvarden, 1997). D'autres spécimens des Seychelles figurent dans l'herbier BR. Les mentions sont rares dans la littérature : Lloyd (1912, 1917), cité par Ryvarden (2004) la signalerait de plusieurs pays africains, dont Madagascar ; Chipp (1921), cité par Corner (1983) de Malaisie, Bresadola (1932, pl. 1010), l'illustre et le cite des Seychelles et des Mascareignes. Si on accorde crédit à Patouillard en ce qui concerne la présence de l'espèce aux Antilles, elle aurait pu y être introduite avec son support, *Mangifera indica*, une plante originaire du domaine indo-malaisien (Fournet, 2002, p. 1050). Nous la conservons dans la liste des ganodermes antillais jusqu'à plus ample informé et bien qu'elle puisse être d'autonomie douteuse. La description originale (Léveillé, 1846) est la suivante : "*Pileo suberoso-lignose sessili semi-orbiculari vel accretionibus elongato nudo sulcato postice fusco antice lurido, margine patente obtuse sterili, poris angulatis ochroleucis obtusis, intus concoloribus, cotextu fulvo. – Hab. Mahé, ad truncos* Mangiferarum, *Pervillé (Herb. Mus. Par.)*" and assorted with the note : "Obs. Chapeau très coriace, presque ligneux, d'abord semi-orbiculaire, puis allongé, par suite des accroissements qui se font en avant ; il est épais de 1 à 2 centimètres au point d'insertion, et diminue en avançant vers la marge, qui est épaisse et obtuse. Les pores sont petits, d'une couleur plus pale que celle du chapeau.".

e) *Ganoderma martinicense* Welti & Courtecuisse, *nom. prov.*

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Trinité, lieu-dit Tartane, bois de Pointe Rouge. Arbre couché ; forêt sempervirente saisonnière tropicale d'horizon inférieur. 21 août 2007. *SW 27* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, Le Robert, Bois Pothau. Sur tronc couché mort de *Inga laurina*, en forêt méso-xérophile. 24 août 2008. *SW 44* (LIP) – séquence MCU GSP44 lucidum-like ; Leg. C. Lechat. Det. C. Decock. **Martinique**, Case-Pilote, Morne Venté. Sur tronc couché de cf. *Haematoxylum campechianum* en forêt méso-xérophile. 25 août 2008. *SW 49* (LIP) – séquence MCU GSP49-I lucidum-like ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Trinité, lieu-dit Tartane, bois de Pointe Rouge. Sur souche, en forêt sempervirente saisonnière tropicale d'horizon inférieur. 26 août 2008. *SW 55* (LIP) – séquence

MCU GSP55pseudo ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 57* (LIP) – séquence MCU 51557gano ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock.

DESCRIPTION : (*SW 55*)

Chapeau (figure 72) réniforme à semi circulaire, stipité, ortho-pleuropodal et d'insertion latérale, de taille variable, par exemple 5 cm de projection pour un diamètre de 6 cm sur un petit spécimen et jusqu'à 20 cm de projection pour un diamètre de 30cm pour le plus grand. Consistance ni flexible ni rigide mais légèrement compressible, le revêtement cédant à la pression du doigt. Surface brillante, vernissée et glabre, globalement plane à légèrement concave, mais bosselée par des bourrelets amples (3-4 cm de largeur) et concentriques sur les 2/3 du chapeau en partant de la base, tandis que la périphérie présente des bosses également concentriques, peu marquées et de faible amplitude ; de plus, les bourrelets sont compliqués par de nombreux plis ou stries radiales. Couleur majoritaire brun-rouge avec quelques reflets bleutés discrets, brun orangé vers la périphérie puis ocre et enfin blanc au niveau de la marge qui est fine et légèrement ondulée, parfois lobulée, d'épaisseur variable selon la taille des spécimens de 0,5 à 2 cm. **Stipe** en forme de pied de vigne, jusqu'à 12 x 3 cm, vernissé. **Chair** brun cannelle uniforme, avec un liseré de couleur safran en dessous de la surface piléique, d'épaisseur variant de 1 à 0,5 cm, marquée en son milieu, sur toute l'étendue du chapeau, par un faisceau de substances mélanoïdes étroit et discontinu, dur et compact. **Hyménophore** plan, blanc, brunissant au toucher et présentant des reflets vert bleuté lorsqu'il est plié. Tubes longs de 1-0,5 cm, brun chocolat. Surface porée délimitée vers la marge par un bourrelet ocre brun, vernissé, correspondant au recouvrement de la marge par le revêtement piléique, Sécrétion importante de résines à la surface des pores qui sont fins (5 / mm), de forme très variable (circulaire, quadrangulaire, triangulaire) et séparés par un dissépiment assez fin. **Odeur** de pain brioché.

Figure 72 : *Ganoderma martinicense* Welti & Courtecuisse; SW 44. Aspect morphologique des basidiomes (S. Welti).

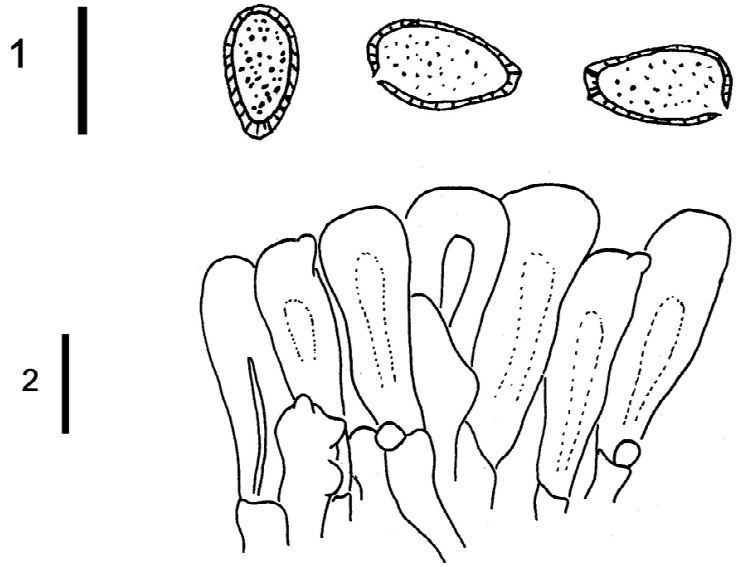


Figure 73 : *Ganoderma martinicense* Welti & Courtecuisse ; SW 55. 1= spores; 2 = piléocystides du revêtement hyménodermique. (1 trait = 10 µm) (S. Welti del.).

Spores (figure 73) 10-[10,9]-12 x 5-[6,05]-7 µm (Q = 1,80), ou 9,5-[10,05]-11 x 6-[6,44]-7µm (Q = 1,56) (*SW* 44), ovo-amygdaliformes, ovoïdes-oblongues (*SW 44*), tronquées au niveau de l'apex, brunes au KOH, le myxosporium ainsi que l'endospore étant opaque, tandis que le sporothécium est hyalin, peu guttulées. Paroi finement échinulée, faiblement rugueuse,

les échinules, courtes, d'épaisseur moyenne, relativement dense, ayant l'extrémité arrondie. **Revêtement piléique** (figure 73) hyméniforme, à hyphes terminales clavées et lisses, pyriformes mais plus généralement cylindriques sur une courte longueur (env. 25 µm – jusqu'à 40 µm [*SW 44*]), x 6-9 µm au niveau de la partie clavée ; très rarement et courtement diverticulées à la base et peu souvent bossues au sommet. La couche de résine à l'intérieur des cellules au niveau de l'apex est visible et abondante. Les piléocystides ne sont pas amyloïdes. De nombreuses boucles sont observées.

DISCUSSION : Cette espèce est affine à *G. multipileum* G. Hou, 1950, *J. Taiwan Mus.* 3, p. 101-104 '*multipilea*'). *G. multipileum* a été démontré représenter les spécimens d'Asie tropicale dénommés *G. lucidum* jusqu'ici (Wang *et al.*, 2009). Il semble très improbable que ce taxon asiatique (connu de Taiwan, des Philippines et d'Inde) soit présent aux Antilles. Nous pensons qu'il s'agit ici d'un vicariant, pour le moment repéré seulement en Martinique. Notre espèce se différencie de *G. tuberculosum* par des spores finement échinulées, oblongues, des piléocystides courtes, de forme cylindrique. En revanche, elle se rapproche des spécimens désignés sous le nom de *G. multipileum*, apparentés au *G. lucidum* taiwanais par Wang *et al.* (2009) et qui sont monophylétiques avec le spécimen indien X87351, dont la séquence ITS peut être retrouvée sur GenBanK (figure 53).

f) *Ganoderma* ***neogibbosum*** **Welti & Courtecuisse, *nom. prov.***

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre, en direction de l'Anse Lévrier. Sur *Artocarpus altilis*, en forêt mésophile secondaire âgée. 16 août 2007. *SW 28* (LIP) – séquence MCU 49469 ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre. Sur tronc couché mort, en forêt mésophile secondaire âgée. 2 septembre 2007. *SW 37* (LIP) – séquence MCU 49484 ; Leg. C. Lécuru. Det. C. Decock. **Guadeloupe**, Petit-Bourg, Trace Merwart. Tronc couché mort, en forêt mésophile secondaire. 12 août 2008. *SW* 38 (LIP) – séquence MCU GSP38gibbo ; Leg. S. Welti & R. Courtecuisse. Det. C. Decock. **Guadeloupe**, Sainte-Rose, Sentier des Contrebandiers. Sur souche, en forêt mésophile secondaire. 15 août 2008. *SW 41*(LIP) – séquence MCU GSP41-I ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre. Sur tronc couché, en forêt mésophile secondaire âgée. 25 août 2008. *SW 53*(LIP) – séquence MCU GSP53-I ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock.

Figure 62 : *Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse ; SW 37. Aspect morphologique des basidiomes (C. Lécuru).

DESCRIPTION :

Chapeau sessile ou dimidié, parfois stipité et d'insertion latérale, semi-circulaire ou presque, de taille variable : 9-18 cm de longueur, 10-29 cm de large, 1-5 cm d'épaisseur à la base et 0,6-1,5 cm d'épaisseur vers la marge. Consistance coriace ligneuse, non flexible et non compressible, le revêtement cédant difficilement à la pression du doigt. Surface plane puis plan-convexe en séchant ou au contraire incurvée en périphérie, mate et glabre, parfois pruineuse et saupoudrée d'une abondante sporée, bosselée ou portant des bosses concentriques larges et espacées à la base, de plus en plus étroites et serrées en périphérie ; des bosses secondaires radiales marquent les deux-tiers du chapeau en partant de l'insertion, qui est pourvue d'un tubercule assez peu marqué mais pouvant atteindre 3 x 3 cm. La marge est aiguë, ondulée et légèrement couvrante. Couleur générale brun café au lait avec des zones sous jacentes innées d'un brun plus sombre, brun chocolat ou brun moutarde (il est parfois nécessaire de brosser le chapeau pour éliminer les sporées avant de pouvoir évaluer ces tonalités), concentriques et étroites, brun chocolat à maturité. Marge blanche et aiguë, immédiatement soulignée d'une zone ocre clair fugace. **Stipe** absent ou bien développé, lorsqu'il est présent, en continuité avec le chapeau et formant le premier relief concentrique de la face supérieure du chapeau, jusqu'à 13 x 4 cm, tortueux et coriace comme un cep de vigne, concolore au chapeau. **Chair** subéreuse, fibreuse radialement, marquée de nombreuses

incrustations de substances mélanoïdes, noires et coriaces, sous forme de ponctuations ou de stries radiales à la base et qui se projettent en périphérie en deux bandes parallèles au revêtement piléique, de couleur safran juste au dessous du revêtement sur une zone très étroite, brun cannelle jusqu'au premier liseré et enfin brun chocolat à brun-rouge jusqu'aux tubes, d'épaisseur variable : 0,3-0,4 cm en périphérie à 2,2-3 cm au point d'insertion. **Hyménophore** blanc en surface mais ocre au niveau de la marge, brunissant au toucher et en séchant, et prenant facilement l'empreinte digitale, décurrent sur les formes stipitées. Tubes brun chocolat noir avec des marbrures blanches, 0,8-2,2 cm de long, de texture subéreuse puis dure en séchant. Pores circulaires, 6-7 /mm.

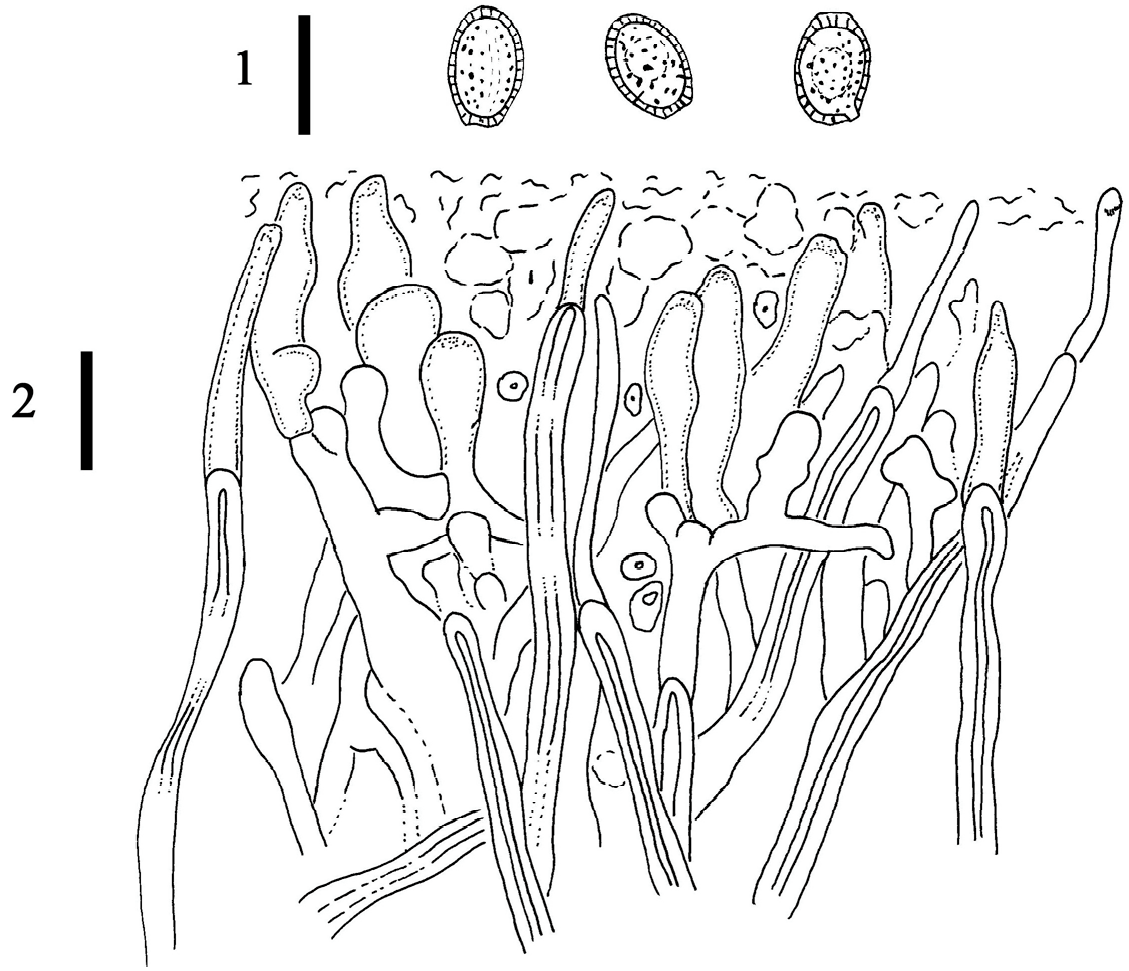


Figure 63 : *Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse ; SW 37. 1 = spores ; 2 = cellules du revêtement (1 bar = 10 µm) (S. Welti det.).

Spores (voir figure 63) 8-[8,75]-9 x 5,5-[6,025]-6,5 µm (SW 28), 8-[8,52]-9 x 5-[6,19]-7 µm (SW 37), elliptiques, tronquées au sommet, de couleur jaune brun doré, guttulées, à double paroi portant des échinules larges, longues et peu denses (apparence faiblement rugueuse), parfois alignées longitudinalement, chaque ligne semblant reposer sur des faisceaux parallèles au grand axe ; l'endospore ainsi que le myxosporium sont opaques au KOH 5%, le sporothécium ou exospore est hyalin. **Revêtement piléique** (voir figure 63) coriace, à extrémités hyphales pointues ou arrondies, d'interprétation difficile sur certaines préparations mais parfois visiblement squelettique ou génératrice. Sur la partie apicale des hyphes squelettiques à paroi épaisse, des appendices hyalins à paroi fine, délimités par un faux septum se développent. Les hyphes génératrices sont plus larges, plus ondulées, en forme de bouteille, à paroi très fine, conservées certainement par la présence d'une cire compacte et épaisse. Extrémités souvent hyalines ou brun-jaune doré, imprégnées d'une cire de couleur brun-jaune. Boucles observées sur certaines préparations. Le revêtement est de type anamixodermique car tous les éléments cellulaires sont le plus souvent imprégnés dans la cire ; cependant au centre du chapeau, les prélèvements peuvent montrer certaines extrémités hyphales à paroi épaisse, de type squelettique, positionnés au dessus du dépôt de cire. **Hyphes squelettiques** de type arboriforme, à partie basale x 4-5 µm, rectiligne, à paroi épaisse, brune et à partie distale ramifiée, torsadée, aux extrémités pointues, la paroi restant épaisse, excepté dans certaines zones apicales généralement hyalines généralement séparées par un septum secondaire. **Hyphes ligatives** de type *Bovista* (?) en faible quantité, x 1- 2 µm, ramifiées et torsadées, hyalines, à paroi fine et portant des septa résiduels. Les hyphes de type arboriforme sont moins nombreuses lorsque l'on s'éloigne de la périphérie et laissent place à des hyphes squelettiques plus traditionnelles, rectilignes et peu ramifiées. **Hyphes du dissépiment** réunissant les mêmes types de populations hyphales mais dans une proportion différente : les hyphes hyalines de type *Bovista* s'intercalant entre les hyphes de type arboriforme sont beaucoup plus nombreuses et les ramifications plus importantes. Dans la lumière des tubes ont été observés, parmi un vaste réseau d'hyphes hyalines enchevêtrées et ramifiées, de nombreux renflements correspondant à de grosses boursouflures d'hyphes squelettiques avortées ou non (figure 64).

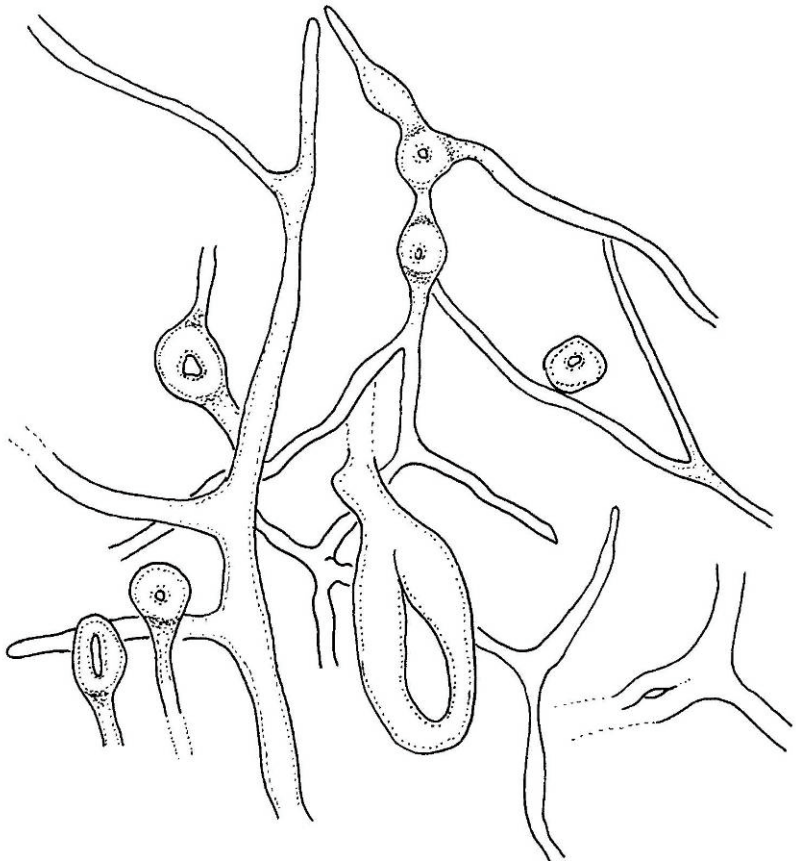


Figure 64 : *Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse ; SW 28. Vésicules retrouvées au niveau du dissépiment (1 Bar = 10 µm) (S. Welti det.).

DISCUSSION : *G. gibbosum*, au groupe duquel notre espèce nouvelle appartient, est un taxon asiatique cité de Java (*princeps*), de Chine (Zhao *et al.*, 1983), du Viet-Nam (Parmasto, 1986) et peut-être d'Australie (Saccardo, 1888). *G. neogibbosum* en est un parent antillais, d'après les analyses phylogénétiques préliminaires.

g) *Ganoderma* ***parvigibbosum*** **Welti & Courtecuisse*, nom. prov.***

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Case-Pilote, Morne Rose. Sur racine enterrée, en forêt hygrophile. 15 août 2007. *SW 22* (LIP) – séquence MCU 49455-I ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Prêcheur, Anse Lévrier. Sur *Cocos nucifera* étêté, en forêt mésophile secondaire âgée. 2 septembre 2007. *SW 35* (LIP) – séquence MCU 49473 ; Leg. C. Lécuru. Det. C. Decock. **Martinique**, Trinité, lieu-dit Tartane, Bois de Pointe Rouge. Sur grosse

souche, en forêt méso-xérophile. 26 août 2008. *SW* 54 (LIP) – séquence MCU 51564 ; Leg. S. Welti & R. Courtecuisse. Det. C. Decock.

DESCRIPTION (*SW 22*, *SW 35*) :

Chapeau sessile et largement attaché au support (sur 4-5 cm, par exemple) ou stipité latéralement (*SW 22*), réniforme à base lobée, de taille variable, par exemple 15 cm de diamètre, 12 cm de projection, 2,7 cm d'épaisseur en périphérie et 4 cm à la base. Consistance ligneuse, ni flexible ni compressible, le revêtement cédant difficilement à la pression du doigt. Surface lisse et plane à bosselée, mate, légèrement strié à plissée radialement et parfois assez profondément vers le point d'attache, zonée concentriquement par de larges bosses de faible amplitude, concentriques (environ 2 mm de large), mais marqué d'un sillon concentrique en périphérie ou portant quelques bosses concentriques plus larges, par exemple la première vers 6 cm du point d'attache, la seconde vers 7 cm (double), chacune mesurant 0,5 cm de large, précédant des bosses marginales de moindre amplitude (vers 0,3 cm de large). Couleur alternant le brun café ou chocolat au brun-noir de manière concentrique sur des cernes plus ou moins étroits, ce qui accentue l'impression de zonation. Marge obtuse et recouvrant l'hyménophore sur 0,2 cm, parfois tronquée perpendiculairement aux surfaces piléique et porée, stratifiée sur 2,5 cm. **Stipe** greffé par le dessus sur le chapeau, d'insertion latérale, cylindrique, 2,5 x 1,8 cm, coriace. **Chair** subéreuse, brun chocolat de manière homogène mais parfois avec un fin liseré terre de Sienne sous le revêtement, marquée de zébrures résineuses longitudinales organisées en deux bandes parallèles, pointillées à discontinues, partant de la chair profonde du stipe vers la périphérie, d'épaisseur variable, 0,3-1,4 cm. **Hyménophore** crème, taché de brun, brunissant au toucher (prenant l'empreinte digitale) et jaunie ou grisâtre en séchant. Tubes non stratifiés, d'insertion légèrement oblique par rapport à la chair, longs de 0,5-0,9 à 2,4-2,7 cm, de couleur brun Van Dyck, avec des marbrures blanches, de consistance subéreuse à presque ligneuse.

Les observations microscopiques effectuées sur deux spécimens n'ont pas révélé de différences significatives avec le précédent taxon *Ganoderma australe* 1. Les spores ainsi que le revêtement sont identiques.

DISCUSSION : dans l'état actuel des recherches, ce taxon semble se trouver aussi bien sur *Pinus caribaea* aux Grandes Antilles (Cuba, C. Decock, *comm pers.*) que sur divers substrat

aux Petites Antilles, dont des *Arecaceae* (palmiers) pour ce qui a pu être identifié. L'inféodation aux substrats, en particulier les résineux, semble assez forte, d'après les études qui établissent les corrélations entre données moléculaires et écologiques (en particulier Hong & Jung, 2004) et il peut sembler surprenant que ce groupe fasse exception. Il est possible que de nouvelles récoltes soient nécessaires pour préciser des groupes d'affinité, qui amèneront peut-être à la reconnaissance d'autres taxons distincts dans ce groupe.

h) *Ganoderma pulverulentum* Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 121 [LECTOTYPE: La grenade, Les Antilles, "W.E. Broadway, 4 sept., 1905 (NY), sur manchineel séché]

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Trinité, lieu-dit Tartane, Bois de Pointe Rouge. Sur tronc mort couché de *Inga laurina*, en forêt sempervirente saisonnière tropicale secondaire dans son sous-type d'horizon inférieur. 12 août 2007. *SW 12* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock.

LECTOTYPE: La grenade, Les Antilles, "W.E. Broadway, 4 sept., 1905 (NY), sur manchineel séché

DESCRIPTION (*SW 12*) :

Figure 66 : *G. pulverulentum* Murrill ; (*SW12*).Aspect morphologique des basidiomes (C. Lécuru)

Chapeau lobé étoilé à la base, d'insertion latérale, stipité plus ou moins longuement, souvent bossu ou déprimé au point d'insertion, de taille variable : 5-24 cm de long, 7-25 cm de large, 1,2-2,5 cm d'épaisseur à la base et 0,5-1 cm vers la marge. Consistance flexible et compressible, à revêtement cédant à la pression du doigt. Surface brillante, vernissée mais très mate lorsqu'il y a accumulation de spores à la surface, et laissant apparaître, au grattage, une couche sous-jacente jaune safran ; glabre, plane à bosselée et souvent marquée par la présence de bosses concentriques et de nombreux plis, voire excroissances radiales qui lui donnent un aspect buriné, voire boursouflé. Couleur rouge brique à rouge-brun le plus souvent, devenant ocre rouge à ocre en périphérie sur une faible largeur puis blanc au niveau de la marge. Lorsque le chapeau est recouvert de spores, sa couleur est brun-rouge. Parfois le centre du chapeau est recouvert d'un givre bleu métallique, du à l'excès de résine. Marge flexueuse, lobée-imbriquée, aiguë ou avec un léger bourrelet dans la jeunesse (figure 66). **Stipe** court, parfois presque nul, en forme de cep de vigne, cylindracé tortueux, flexueux, élargi au sommet, de taille variable : 0,3-0,8 x 0,5-3cm concolore au chapeau, coriace, vernissé. **Chair** subéreuse, molle à l'état frais, puis durcie en séchant, zonée concentriquement, brun chocolat mais ocre-jaune dans le tiers supérieur et surlignée d'un fin liseré jaune safran sous la surface piléique, d'épaisseur variable : 0,8-1,8 cm à la base et 0,3-0,5 cm vers la marge, parcourue de zébrures fibreuses radiales ou ponctuée de substances mélanoïdes partant de la chair du stipe et prolongées sur la moitié de la longueur du chapeau. **Hyménophore** légèrement convexe et bosselé, inexistant par endroits, ce qui lui confère une coloration blanc argile ponctuée de spots brun foncé, brunissant au toucher, puis jauni en séchant. Tubes non stratifiés, 0,5-1,2 cm de long vers l'insertion du chapeau et 0,3-0,4 cm vers la marge, brun chocolat avec des marbrures blanches, de texture subéreuse à l'état frais puis ligneuse au sec. Pores circulaires à alvéolés, fins (4-5/mm).

Spores (figure 67) 11-[11,26]-12 x 6-[6,76]-8 µm, ovoïdes oblongues, tronquées, guttulées, de couleur brun doré, avec l'endospore et le myxosporium opaques et le sporothécium hyalin peu apparent ; apex gardant sa convexité. Aspect de la surface semi-rugueux, avec des échinules longues, semi-épaisses et relativement espacées, parfois allongées en forme de crête courte ou en forme de serpentin. **Revêtement piléique** (figure 67) à hyphes terminales palissadiques, amyloïdes, cylindriques ou de forme conique mais clavées ou élargies au niveau de l'apex, dorées et hyalines, parfois élargies au sommet et gorgées de cire ; longueur

de la partie clavée : 35-40 µm, diamètre de la partie sphérique au niveau apicale : environ 10 µm. **Hyphes squelettiques** (figure 67) rectilignes dans la chair, lâchement ramifiées, brunes au KOH 5%, mêlées d'hyphes hyalines, très ramifiées, présentant des septa secondaires ou traces d'ancien septa, ce qui correspondrait, selon Corner, à des hyphes ligatives de types *Bovista*. Dans la trame, la partie apicale des hyphes est arboriforme, alors que la partie basale reste rectiligne. L'extrémité des ramifications est souvent tordue, noueuse, enchevêtrée, parfois hyaline avec présence de septum secondaire. On note la présence de nombreux brins d'hyphes, court, hyalins, ramifiés et torsadés, mais l'absence d'hyphes génératrices ne permet pas de savoir s'il s'agit d'extrémités apicales d'hyphes squelettiques de type aboriforme, ou s'il s'agit d'hyphes ligatives. L'absence d'hyphes génératrices ne permet pas de faire la distinction, lorsque des brins isolés sont court, hyalins et ramifiés, entre la partie apicale des hyphes squelettiques de type arboriforme et les hyphes ligatives de type *Bovista*.

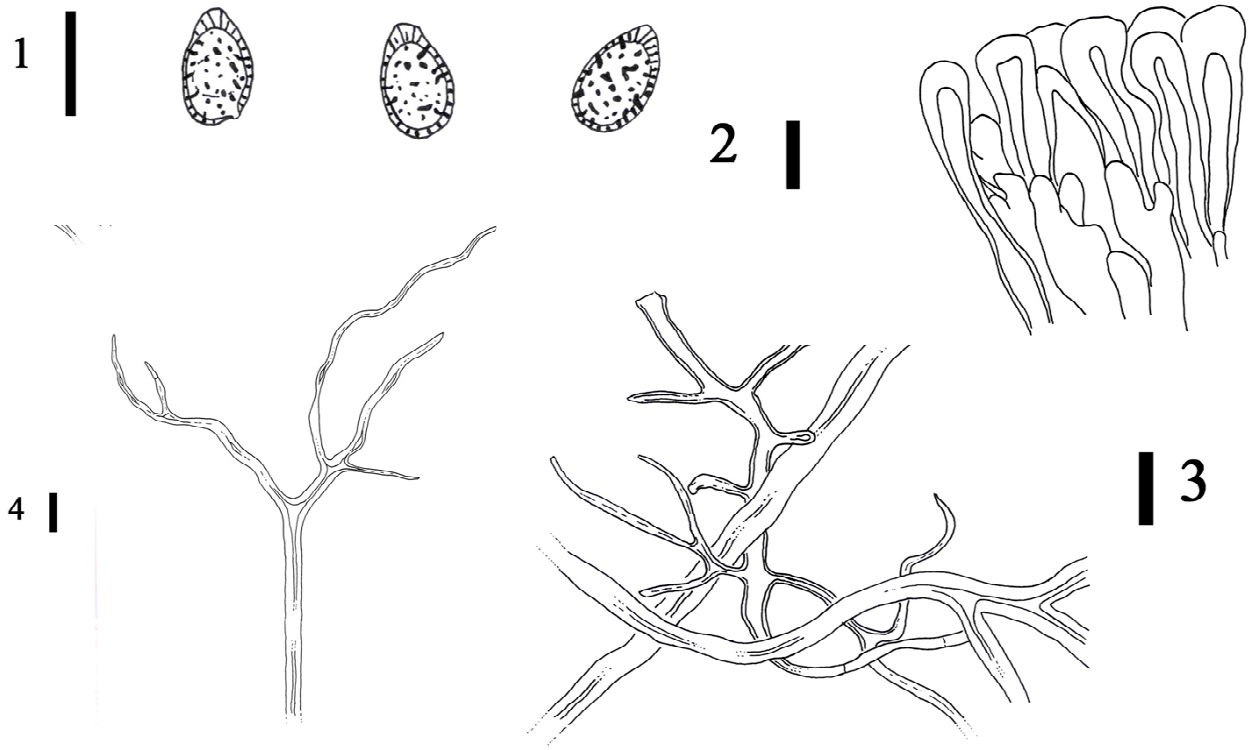


Figure 67 : *Ganoderma pulverulentum* Murrill ; SW 12. 1 = spores ; 2 = revêtement hyménodermique, piléocystides ; 3 = hyphes squelettiques du contexte ; 4 = extémité apicale des hyphes du dissépiment (voir texte). (1 bar = 10 µm) (S. Welti det.).

DISCUSSION : L'amyloïdie ainsi que l'aspect globalement cylindrique des piléocystides de l'hyménoderme sont des éléments de diagnostic qui permettrait de classer l'espèce *G. pulverulentum* à proximité des clades *resinaceum* et *lucidum*. Cette espèce se distingue ainsi

de *G. tuberculosum* pour lequel les piléocystides sont strictement clavées et non amyloïdes. Elle se distingue également du *Ganoderma martinicense* situé dans le clade *tropicum* 2 (SW 55) pour lequel aucune amyloïdie n'a été décelée. L'observation du type de *G. pulverulantum* (NY) nous permet d'affirmer que les spécimens de SW12 appartiennent à cette espèce : sur les deux spécimens nous retrouvons d'une part, des spores qui conservent leur convexité au niveau de l'apex et qui possèdent à leur surface de courtes crêtes légèrement sinueuses, et d'autres part des piléocystides courtes (30-35 µm) de forme globalement cylindrique possédant des excroissances au niveau latéral de l'apex et légèrement amyloïdes. L'amyloïdie des spores du type est légèrement plus accentuée chez SW12. L'aspect macroscopique est aussi relativement identique avec son chapeau non zoné, irrégulièrement bossu, pulvérulent en surface, ses pores et la structure de sa chair contenant des zones très pâles. De plus, le fait que le type ait été décrit des Caraïbes est un point supplémenaire permettant de confirmer l'identité de SW12 bien que les substrats soient différents (*Hippomane mancinella*, *Euphorbiaceae* pour le type). Plusieurs auteurs considèrent ce taxon comme étant synonyme de *G. resinaceum* (Bazzalo & Wright, 1982; Ryvarden, 1985, 2000 ; Moncalvo & Ryvarden, 1997) bien que les particularités de *G. pulverulentum* décrites ci-dessus ne correspondent pas et que notre expérience sur ce taxon européen, acquise sur des spécimens de nos collections, ne permettent pas d'admettre cette hypothèse. Malheureusement le séquençage de nos spécimens n'a pas fonctionné.

– *Ganoderma sp.*

Citations dans la littérature :

* Minter *et al.* (2001) p. 249, 750 [Guadeloupe, Basse-Terre] [!].

DISCUSSION : cette mention issue de la compilation de Minter *et al.* (*l.c.*) ne peut être interprétée, faute de description.

i) *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 122

BASIONYME. : *Fomes stipitatum* Murrill, 1903, *Bull. Torrey Bot. Cl.* 30, p. 229 [LECTOTYPE : Nicaragua, sur bois mort, « Smith s.n. » (NY)]

= *Ganoderma parvulum* Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 123

= *Ganoderma bibadiostriatum* Steyaert, 1962, *Bull. J. bot. Belg.* 31, p. 99.

Citations dans la littérature :

* Ryvarden (2000) p. 189 [Guadeloupe, Basse-Terre ; F. Lurel, 05.1997] [!].

SPECIMENS EXAMINES : aucun spécimen des Antilles.

Guyane française: Sinnamaray, parcelle de terrain expérimentale du CIRAD à Paracou. Sur tronc mort couché. Le 26 Février. *RC/GUY07.029*; Leg. R. Courtecuisse; Sinnamaray, même endroit. 30 Avril 2008. *RC/GUY08.021*; Leg. R. Courtecuisse. Les deux spécimens ont été determinés (det. Welti) comme *G. subfornicatum*. (LIP).

Honduras britanique: *Ganoderma stipitatum* (det. W.A. Murrill), M.E. Peck (NY) [identifié comme *G. lucidum* par Ryvarden (1995) et comme *G. stipitatum* par Torres Torres (2008].

?USA (Virginie): *Ganoderma stipitatum* (det. W.A. Murrill), Mountain forests of Annandale, W.E. Broadway, Fevrier et Mars, 1906 (NY) [identifié comme *G. lucidum* by Ryvarden (1995) et comme *G. stipitatum* by Torres Torres (2008].

LECTOTYPE de *Fomes stipitatus* Murrill : Nicaragua, sur arbre mort, “Smith s.n.” (NY)

LECTOTYPE de *Ganoderma subfornicatum* Murrill : Belize, sur abre mort, “M.E. Peck, 1906” (NY).

Pour une description, voir Ryvarden (2000, p. 189).

DISCUSSION : Décrit du Nicaragua (Murrill) et connu du Honduras britannique (Murrill, 1908), du Brésil (type de *G. bibadiostriatum* et Rajchenberg & de Meijer, 1990 – *s.n. G. parvulum*), du Pérou du Vénézuéla (*s.n. G. bibadiostriatum*, Steyaert, 1980), du Costa Rica, du Surinam et de Bolivie (Steyaert, 1980 – *s.n. G. stipitatum*). Seul Murrill (1908) signale ce taxon dans la Caraïbe, à Grenada. Les spécimens examinés comportent une collection supposée provenir des Etats Unis, mais la localité Annandale pourrait se situer ailleurs. La synonymie proposée par Ryvarden (2000, p. 189) peut vraisemblablement être discutée entre les trois taxons. Bazzalo & Wright (1982) donnent des différences (densité des pores et couleur du contexte) entre *G. parvulum and G. bibadiostriatum* et Steyaert (1980) inscrit les 3 espèces dans le complexe *parvulum.* Par conséquent, dans le cas où les trois taxa ne seraient pas conspécifiques, il est impossible, sans une révision des collections impliquées, de savoir laquelle de ces 3 espèces se trouve effectivement en Guadeloupe. Plusieurs spécimens identifiés comme *G. stipitatum* ont été reçus de New York. Ils ont été révisés par Torres Torres et leur nom a été confirmé, bien que Ryvarden ait conclu qu’ils pouvaient être identifiés comme *G. resinaceum* (Ryvarden, 2000, p. 188). Ceci est un argument supplémentaire pour être prudent au sujet de la présence de ce taxon en Guadeloupe. Les

spécimens récoltés par Régis Courtecuisse en Guyane française, identifiés en premier lieu comme appartenant à l'espèce *G. stipitatum,* ont été redésignés par la suite comme appartenant ou étant proche de l'espèce *G. subfornicatum.* L'examen du type a permis de montrer de nombreuses similitudes morphologiques (macro et microscopique) entre le type et les spécimens de Guyane. Dans ce cas de figure, cette espèce serait nouvelle dans cette localité.

j) *Ganoderma subamboinense* (Henn.) Bazzalo & Wright, *in* Moncalvo & Ryvarden, 1997, *Synopsis Fungorum* 11, p. 83 [!]

BASIONYME. : *Fomes subamboinensis* Henn, 1904, *Hedwigia* 43, p. 175 [LECTOTYPE : Brazil, "Ule 2748" BR, S]

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre, sentier de la cascade de la rivière Couleuvre. Sur *Artocarpus altilis*, en forêt mésophile secondaire âgée. 13 août 2007. *SW 17* (LIP) – séquence MCU C494531 ; Leg. J.-P. Fiard. Det. C. Decock. **Martinique**, Rivière-Pilote, Morne Aca. Sur tronc couché mort, en forêt méso-xérophile. 14 août 2007. *SW 19* (LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti.

DESCRIPTION (*SW17, SW19)*

Chapeau semi-circulaire, dimidié, jusqu'à 14 cm de diamètre et 8 cm en projection, l'épaisseur variant de 2 cm à la base à 0,8 cm vers la marge. Face supérieure légèrement bombée au point d'insertion, portant des stries radiales sur la moitié basale et non zonée, bien que portant plusieurs bourrelets concentriques recouverts de légers sillons également concentriques répartis sur tout le diamètre. Surface lisse, glabre, brillante (vernissée), de couleur brun-rouge, nacrée sur un tiers de la surface par un dépôt de résine d'un bleu métallique. Marge obtuse, légèrement incurvée et non blanche pour ce spécimen (figure 68). **Chair** bicolore, de consistance liégeuse, épaisse de 0,9 cm à la base et amincie jusqu'à 0,3 cm vers la marge, crème sur la moitié supérieure et brun chocolat vers les tubes, parcourue par un fin liseré continu de la base vers la périphérie, constitué probablement de substances mélanoïdes. **Hyménophore** légèrement concave, à surface porée jaune beige, brunissant au

toucher, marquée par des crevasses ou par des spots d'aspect identique au revêtement supérieur (brun-rouge, vernissé). Tubes de longueur constante, assez longs par rapport à l'épaisseur de la chair, vers 0,7-0,8 cm. **Odeur** discrète.

Figure 68 : *Ganoderma subamboinense* (P. Henn.) Bazzalo & J.E. Wright; SW 17 (colonne de gauche) and SW 19 (colonne de droite). Aspect morphologique des basidiomes (R. Courtecuisse, S. Welti).

Spores 8-[8,75]-9 x 6-[6,7]-7µm (Q = 1,30), brunes au KOH 5%, subsphériques, faiblement tronquées, grossièrement ponctuées et peu rugueuses, à échinules fines. Myxosporium et endospore opaques. Sporothécium hyalin et peu visible. **Revêtement** hyméniforme, constitué de piléocystides lisses, cylindriques sur 50µm environ, x 7 µm en moyenne, bien rangées en palissade, fortement amyloïdes, à parois très épaisses et à lumen réduit. **Chlamydospores** (figure 69) (6,5)8-9(-10) x 11-12(-15) µm, de forme elliptique à sphérique, le plus souvent subsphérique, parois paisses (0,5 µm), lisses, rarement guttulée. Elles prennent maissance à l'extrémité des hyphes génératrices. Selon la terminologie de Bazzalo & Wright, ces spores correspondent à des gastérospores, tandis que les chlamydospores se trouvent au niveau des cultures.

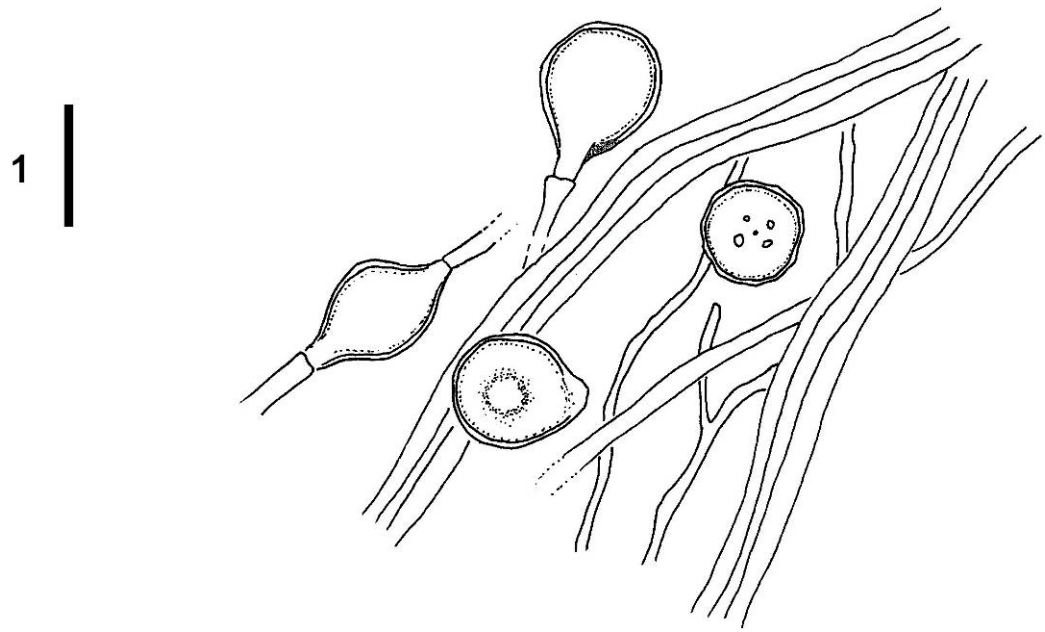


Figure 69 : *Ganoderma subamboinense* (Henn.) Bazzalo & Wright; SW 17. 1 = chlamydospores. (1 bar 10 µm) (S. Welti det.).

DISCUSSION : Cette espèce est nouvelle aux Antilles. Elle a été décrite au Brésil (type) et en Argentine (var.*laevisporum*) Bazzalo & Wright, (1982), Mycotaxon 16(2), p.302 (plusieurs collections). Nos spécimens *(SW17* et *SW19)*, remarquablement similaires au niveau de leur morphologie (figure 68) correspondent à la dernière variété. Malheureusement un problème de nomenclature se pose. En effet, à partir du moment où la combinaison (*G. subamboinense)* a été validée en 1997, la variété *laevisporum* proposée sous cette combinaison binomiale en 1982 (et invalide à cette époque) est invalide. Ainsi, nous nous abstenons pour le moment de valider cette variété dès lors que, à l'heure actuelle, les gastérospores ornementés n'ont été décrites que pour le spécimen correspondant au type *G. subamboinense.* Ce caractère morphologique pourrait être ré-évalué sous la lumière des résultats de séquençage à venir. Ryvarden (2000) situe *G. subamboinense*, au niveau taxonomique, à proximité de *G. multiplicatum,* dont le type n'a pas été vu pour le moment.

Quoiqu'il en soit, la forme longue et cylindrique des piléocystides, ainsi que leur amyloïdie, place clairement cette espèce dans le clade *resinaceum / lucidum.* De plus, le contexte est double comme pour certains taxons en particulier ceux situés dans le sous-clade *lucidum (G. tsugae* par exemple, d'après notre expérience sur cette espèce à partir de nos collections nord-américaines).

k) *Ganoderma tuberculosum* Murrill, 1908, *N. Amer. Fl.* 9, p. 123

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Trinité, Pointe Bateau. Forêt mésophile d'horizon inférieur, à éléments rélictuels du climax : *Sideroxylon foetidissimum* et *Hymenaea courbaril*. 3 décembre 2006. *SW* 6 (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Martinique**, Trinité, lieu-dit Tartane, bois de Pointe Rouge. Forêt sempervirente saisonnière tropicale d'horizon inférieur. 12 août 2007. *SW 14*(LIP) ; Leg. S. Welti. Det. S. Welti. **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre, en direction de l'Anse Lévrier. Forêt mésophile secondaire âgée. 2 septembre 2007. *SW 34*(LIP) – séquence MCU 49475 ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Le Robert, Bois Pothau. Sur tronc couché mort, en forêt méso-xérophile. 24 août 2008. *SW 45* (LIP) – séquence MCU GSP45gano ; Leg. C. Lechat. Det. C. Decock. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 46*(LIP) – séquence MCU GSP46pseudo ; Leg. C. Lechat. Det. C. Decock. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 47*(LIP) – séquence MCU GSP47Ipseudo ; Leg. C. Lechat. Det. C. Decock. **Martinique**, même lieu et même date. *SW 48* (LIP) – séquence MCU GSP48pseudo ; Leg. C. Lechat. Det. C. Decock. Lectotype de *G. tuberculosum* Murrill : British Honduras, Coll. M.E. Peck, 1906 (NY).

DESCRIPTION : *(SW6, SW34, SW45)*

Le chapeau est hémi-circulaire, parfois circulaire pour les jeunes spécimens, sessile et largement adhérent, en console ou plus ou moins résupiné réfléchi (un spécimen a le chapeau réfléchi sur 4 cm), parfois imbriqué, de taille variable, 6-23 cm de diamètre, se projettant sur 5,5-13 cm, 3-6,5 cm d'épaisseur. La texture est peu flexible, et le revêtement cède sous la pression des doigts. La surface est lisse, vernissée (la croute résineuse fond sous la flamme) et plus ou moins brillante (les spores forment parfois un dépôt superficiel et mat sur la surface supérieure du chapeau), glabre, parfois plane mais le plus souvent irrégulière, bombée au point d'insertion (1 à 4 cm) avec des bosses concentriques de faibles amplitudes et distantes les unes des autres. Celles-ci sont parfois plus serrées vers la marge sur les derniers cm. Des crêtes radiales parfois discrètes (seulement 2-5 mm de haut) mais le plus souvent se développant en bosses radiales ou de manière irrégulière en tubercules (plus de 0,8 cm de hauteur). Les couleurs sont disposées en zones concentriques qui se succèdent de manière graduelle en passant du centre vers la marge : de la couleur rouge hépatique (gris plombé à

peine bleuté sur un tiers de la surface pour un spécimen) au rouge ocre, puis du brun caramel au jaune ocre. Ces couleurs sont parfois partiellement interverties avec une zone jaune ocracé à mi rayon et une zone étroite de couleur rouge ocre vers la marge (figure 70). **La marge** est obtuse à épaisse (jusqu'à 1cm), un peu sinuée ou semi-circulaire arrondie, blanche chez les jeunes spécimens puis orange ocre. **Stipe** absent, mais un jeune spécimen presque circulaire a montré un pseudo-stipe difforme de 40 x 17 mm et de couleur brun orangé. Le contexte est orange cannelle mais parfois de couleur brun tabac et brun chocolat à proximité des tubes. La texture est douce et subéreuse et l'épaisseur varie de 0,5 à 4,5 cm. Une bande noire et épaisse de résine surgit de la partie résupinée et se prolonge en deux minces lignes, souvent discontinues, près de la base des tubes, jusqu'au 2/3 de la largeur de chapeau ou de la zone périphérique. **L'hyménophore** est plan, légèrement décurrent, de couleur blanc craie ou beige très pâle à jaunâtre ou cannelle pâle par endroit. Une légère torsion du carpophore lui donne des tonalités bleu d'encre par endroit. **Les tubes** ne sont pas stratifiés et sont de couleur brun-noir à violet, avec des zones blanchâtres. Les tubes ont la texture du liège et mesurent entre 0,4 et 2 cm de long. Les pores sont fins (3-4/mm) exceptés au niveau des bosses où ils sont plus ouverts, et possèdent un dissépiment plutôt large. L'odeur rappelle celle de la brioche chocolatée.

Figure 70 : *Ganoderma tuberculosum* Murrill ; SW 34 (gauche) et SW 45 (droite). Aspect morphologique des basidiomes (S. Welti).

Spores (figure 71) 10,5-[10,8]-11 x 7,5-[7,9]-9µm ; (Q = 1,36)**.** Elles sont de formes ovoïdes, subglobuleuses avec des échinules épaisses et longues, parfois allongées en forme de petites crêtes sinueuses. Les spores sont rugueuses, brunes au KOH 5% avec un myxosporium et un endospore opaque tandis que le sporothécium est hyalin. Les spores sont tronquées, guttulées. **Les extrémités hyphales** (figure 71) formant les cellules du revêtement sont de type hyméniforme, non amyloïdes, clavées sur environ 20 à 25 µm, la longueur de la partie apparente des piléocystides est de 30 à 40 µm. (diamètre de la zone élargie compris entre 7 et 12 µm avec une moyenne de 8,5 µm) parfois pyriformes, rarement diverticulées ou lobulées au niveau basal, à paroi épaisse d'aspect pluristratifié (plusieurs couches de résine superposées), à lumen relativement étroit, présentant au niveau de l'apex des excroissances de forme sphéropédonculée semblables à des bourgeonnements. Leur couleur est jaune doré au Melzer. **Les Hyphes squelettiques** (figure 71) sont rectilignes, lâchement ramifiées dans le contexte, brunes au KOH 5%, parfois flexueuses, de diamètre x 3-[4,25]-5,5 µm, plus épaisses au point de ramification. L'épaisseur des parois est d'environ 1,5 µm. Dans la trame, la partie apicale des hyphes est arboriforme alors que la partie basale reste rectiligne. L'extrémité des ramifications est souvent tordue, noueuse, enchevêtrée, parfois hyaline. La présence de faux septums a été retrouvée. Les hyphes ligatives de couleur brune ou hyaline correspondraient certainement à des branches issues d'hyphes squelettiques arboriformes qui se seraient désolidarisées, lors des examens microscopiques, de la partie basale.

DISCUSSION : La révision du type de Murrill (NY) a révélé de nombreuses ressemblances au niveau de la micromorphologie avec les spécimens SW45 et SW6. (Spores subsphériques avec des échinules épaisses et distantes, parfois allongées en forme de courte crête sinueuse, piléocystides strictement clavées, dénuées de toute forme cylindrique, non amyloïdes- contrairement aux observations de Gottlieb & Wright 1999a, p.669 - avec parfois la présence d'excroissances de forme sphéro-pédonculée situées au sommet de l'apex des éléments constituants l'hyménoderme). L'aspect macroscopique du spécimen type est toutefois légèrement divergent surtout au niveau de sa surface porée qui est jaune, bien que les autres caractéristiques morphologiques, tels le contexte ou l'aspect irrégulier de la surface supérieure du chapeau soient similaires. L'absence de résultats moléculaires explique la raison pour laquelle nous conservons le 'cf' au niveau du titre de cette partie. La présence de cette espèce, *G. tuberculosum*, dans notre aire de récolte serait tout à fait plausible, et serait nouvelle dans

les Antilles françaises. Ryvarden (2000) place cette espèce en synonymie avec *G. oerstedii,* espèce pour laquelle nous n'avons pas de spécimen pour le moment.

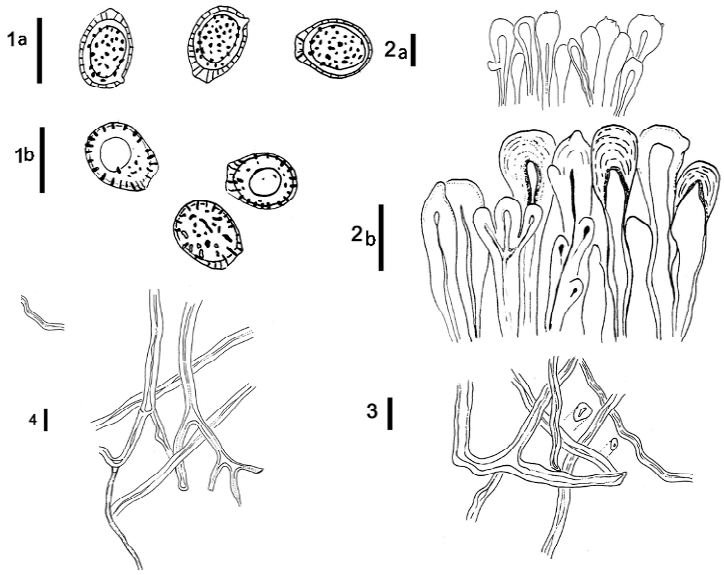


Figure 71 : *Ganoderma tuberculosum* Murrill; 1 = spores (a: SW6; b: SW45); 2 = piléocystides du revêtement hyménodermique (a: SW6; b: SW45); 3 = hyphes du contexte; 4 = hyphe du dissépiment (voir texte). (1 bar = 10 µm) (S. Welti del.).

3) Genre *HUMPHREYA* Steyaert, 1972, *Persoonia* 7(1), p. 98

Remarque : L'attribution générique des deux espèces citées sous ce nom est toujours en discussion dès lors que le genre *Humphreya* (*H. lloydii* (Pat. & Har.) Steyaert) est africain et ne fait pas un clade monophylétique avec les deux espèces neotropicales (*comm. pers*. Cony Decock) Il est donc possible que le genre *Humphreya* puisse être, dans une certaine mesure, reconsidéré dans un sens plus large qu'il n'est actuellement ; à l'opposé une nouvelle entité générique devrait être nécessaire pour les deux espèces mentionnées ci-dessous. Actuellement, faute d'informations supplémentaires, il est encore beaucoup trop tôt pour statuer sur ces hypothèses. C'est la raison pour laquelle nous maintenons cette disposition générique pour le *H. coffeatum* de de sorte que l'arrangement traditionnel ne soit pas prématurément changé.

***a) Humphreya coffeata* (Berk.) Steyaert**, 1972, *Persoonia* 7(1), p. 102 (‘*coffeatum*’)

BASIONYME : *Polyporus coffeatus* Berk., 1839, *Ann. Mag.Nat. Hist.* 3, p. 385 [LECTOTYPE : Saint-Vincent, Petites-Antilles, « Guilding » (K)] ≡ *Amauroderma coffeatum* (Berk.) Murrill, 1905, *Bul. Torrey Bot. Cl.* 32, p. 367 ≡ *Ganoderma coffeatum* (Berk.) Furtado, 1967, *Persoonia* 4(4), p. 383

F

Figure 74 : *Humphreya coffeatum* (Berk.) Steyaert; Aspect morphologique du basidiome Morphological aspect of basidiomata. En haut à gauche: SW 18 (S. Welti), en haut à droite SW 30 (section du sporophore), en dessous, SW 15 (R. Courtecuisse).

Citations dans la littérature :

* David & Rajchenberg (1985) p. 287 [Martinique ; forêt de La Charles, 10.1976] [!].

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Prêcheur, Anse Couleuvre, vers la cascade de la rivière Couleuvre. Sur tronc mort couché en forêt mésophile secondaire âgée. 13 août 2007. *SW 15* (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Martinique**, même lieu et même date. Sur arbre mort couché. 13 août 2007. *SW 18* (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Martinique**, sans précision. *SW 24* (LIP) – séquence MCU C49456-I ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. **Martinique**, Sainte-Marie, Pointe La Philippe. Sur souche de *Swietenia macrophylla* (mahogany grande-feuilles), en forêt méso-xérophile. 19 août 2007. *SW 25* (LIP) – séquence MCU C49457-I ; Leg. P.-A. Moreau. Det. C. Decock. **Martinique**, Prêcheur, Anse des Galets. Sur arbre mort en forêt sempervirente saisonnière tropicale secondaire, valicole. 30 août 2007. *SW30* (LIP) – séquence MCU 49471 ; Leg. S. Welti. Det. C. Decock. Spécimens en LIP

DESCRIPTION :

Chapeau (figure 74) réniforme ou semi-circulaire, dimidié ou stipité latéralement, à base lobée ; les lobes latéraux peuvent se rejoindre à maturité et le chapeau paraît alors d'insertion excentrée. Taille variable, 4-10 cm de long, 6-16 cm de large, 0,5-2 cm d'épaisseur. Consistance flexible, compressible, à revêtement cédant à la pression du doigt, ou au contraire rigide et non compressible. Face supérieure convexe, parfois déprimée à l'insertion, légèrement bosselée concentriquement, chaque cerne distant de 0,5-1 cm puis ondulée radialement à maturité, parfois de manière assez dense, ce qui peut lui donner un aspect plissé ou froissé. Surface brillante à l'état frais chez les plus jeunes spécimens puis mate à maturité ou au séchage. Revêtement piléique doux au toucher mais non velouté. Couleur variable : vers l'insertion et sur environ ½ rayon, gris violacé, parfois avec des tonalités vert kaki et souvent muni de zones concentriques plus claires, vers la périphérie, rouge carmin à rouge brique avec des zones étroites concentriques gris violacé assez claires à noires. A maturité, le chapeau perd son éclat brillant et ses couleurs rougeâtres pour prendre une coloration café au lait assez mate ou terne, avec des zones concentriques brun foncé de plus en plus étroites à mesure qu'on s'approche de la marge ; toutefois, chez les adultes, la périphérie peut conserver des reflets violacés. Marge régulière, aiguë ou obtuse, voire en bourrelet, recouvrante ou non à maturité, blanche, plus ou moins importante selon le stade de développement, précédée d'une zone jaune orangé et parfois d'un liseré noir. **Stipe** latéral ou excentré, parfois subnul, 3,5-5 x 1,5-2,5 cm, quasiment cylindrique mais évasé à l'insertion sur le support, parfois tortueux, gris-brun, coriace, cortiqué, à chair fibreuse. **Chair** spongieuse à subéreuse au sec, zonée concentriquement, crème, assez fugacement rosée au moment de la coupe et jaunissant

lentement ensuite, d'épaisseur variable, 0,4-1,9 cm à la base et 0,2-0,4 cm vers la marge, avec une zone fibreuse partant du stipe et se prolongeant radialement vers la périphérie en fin liseré, jusqu'au deux-tiers du chapeau. **Hyménophore** concave ou convexe, à surface blanc crème, rosissant ou brunissant légèrement au toucher, prenant l'empreinte digitale, lisse. Tubes d'un blanc à éclat translucide ou crème, concolores à la chair ou teintés de rose ou d'orangé, rosissant de manière assez distincte après la coupe, de longueur variable, 0,4-0,9 cm à la base et 0,1-0,5 cm en périphérie. Pores circulaires, denses (5-7 / mm).

Spores (figure 75 et 76) tronquées, largement elliptiques, à double paroi, parfois dextrinoïdes. Endospore et myxosporium épais, opaques et jaune pâle au KOH 5%. Exospore hyalin, légèrement cyanophile. Ornementations en forme de crêtes, disposées longitudinalement et parallèles au grand axe, libres ou anastomosées, cyanophiles. Dimension : 10,5-[11,23]-12 x 7-[8,45]-10 µm. **Hyphes de la chair** réparties en deux populations : 1 – hyphes végétatives de type squelettique, rectilignes, non ou très peu ramifiées, à paroi épaisse, hyaline, x 4-6 µm ; 2 – hyphes plus sinueuses, parfois ramifiées, hyalines, sans boucles ni septa, x 1-1,5 µm. Les **hyphes du dissépiment** (figure 76) sont également de deux sortes : 1 – hyphes squelettiques de type arboriforme, ramifiées sur la partie distale, hyalines et aux extrémités fines, pointues et enchevêtrées, x 2-6 µm ; 2 – hyphes hyalines à paroi épaisse, très ramifiées, formant parfois un réseau perpendiculaire, pouvant correspondre à des hyphes ligatives intercalées entre les hyphes squelettiques, ou alors à des extrémités d'hyphes squelettiques de type arboriformes, ayant été sectionnées pendant la manipulation. **Revêtement piléique** (figure 76) de type trichodermique, c'est-à-dire que les extrémités hyphales sont situées au dessus du dépôt de cire. Ces extrémités sont arrondies, x 2-5 µm, certaines à paroi épaisse, hyalines sur 15 µm environ, non clavées, parfois capitées ; au dessous, sur environ 100µm, les hyphes sont immergées dans une cire épaisse, de couleur brun orangé et dorée.

DISCUSSION : David & Rajchenberg (*l.c.*) incluent *Amauroderma flaviporum* dans le concept de cette espèce mais nos récoltes permettent de distinguer ces deux taxons au rang spécifique, de même que les travaux phylogénétiques de C. Decock en cours (C. Decock, *comm. pers.*). Voir ci-dessous. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus (remarque générale sur le genre *Humphreya*), ce nom générique nécessitera probablement une révision prochainement.

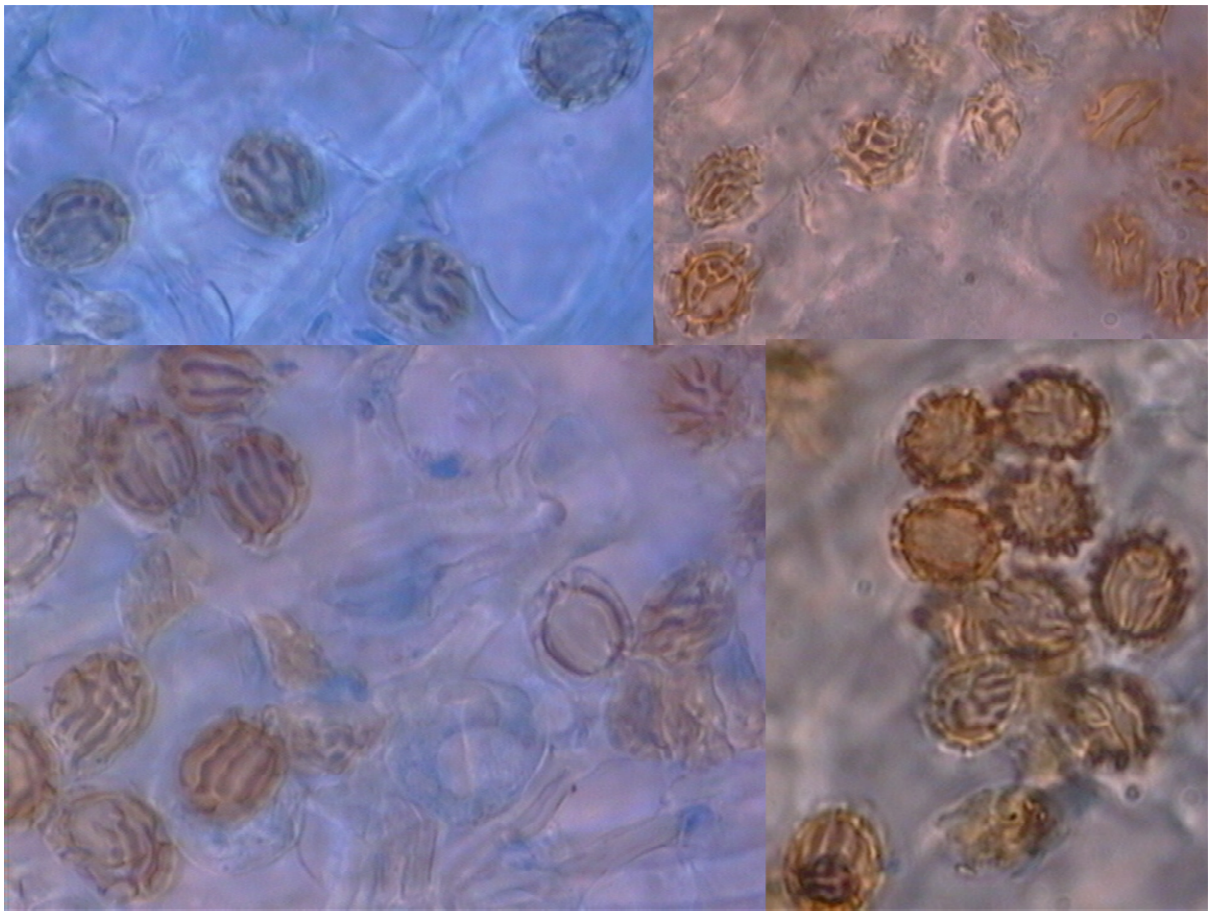


Figure 75 : *Humphreya coffeatum* (Berk.) Steyaert; SW 15, spores vues au microscope.

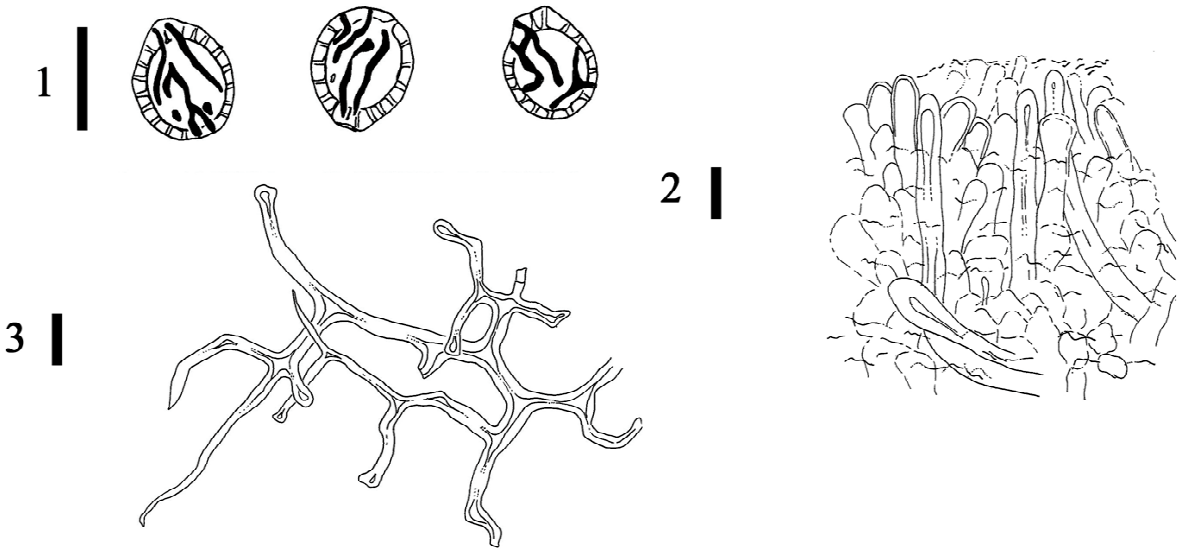


Figure 76 : *Humphreya coffeatum* (Berk.) Steyaert; SW 15, 1 = spores; 2 = cellules du revêtement, 3 = hyphes du dissépiment (1 Bar = 10 µm) (S. Welti del.).

b) *Ganoderma flaviporum* (Murrill) Saccardo & Trotter, *in* Saccardo, 1912, *Syll. Fung.*, 21, p. 304 [!]

BASIONYME : *Amauroderma flaviporum* Murrill, 1908, *N. Am. Fl.* 9(2), p. 116 [LECTOTYPE : Jamaïque (F.S. Earle), sur *Melicocca bijuga*] ≡ *Ganoderma flaviporum* (Murrill) Saccardo & Trotter, *in* Saccardo, 1912, *Syll. Fung.*, 21, p. 304 [!].

SPECIMENS EXAMINES : **Martinique**, Case-Pilote, Morne Venté. Au sol, au milieu du chemin d'accès, en forêt méso-xérophile. 16 août 2007. *SW 23* (LIP) ; Leg. R. Courtecuisse. Det. S. Welti. **Martinique**, Trinité, Pointe Bateau. Forêt mésophile, un an après le passage du cyclone Dean, sur bois mort enterré. 26 août 2008. *CL/Mart08.081* (LIP) ; Leg. S. Bessard & C. Lécuru. Det. S. Welti.

DESCRIPTION (*SW23)*

Chapeau (figure 77) semi-circulaire à réniforme, 1-1,5 cm de diamètre et 0,9-1,3 cm de projection, convexe, à surface rugueuse au toucher, à marge légèrement sinueuse. Couleur brun café au lait, avec des zones concentriques de 0,1 cm de large brun cacao (3 zones), débutant sur le sommet du stipe jusque la base du chapeau, puis réparties sur la surface piléique jusqu'à la marge qui est ocracée ; la partie non zonée s'étend sur 0,5cm. **Stipe** inséré latéralement, coriace, 1,7-2,7 cm de long et 0,2-0,3 cm d'épaisseur, couleur café au lait, droit, racorni à la base. **Chair** de couleur crème, épaisse de 0,1-0,2 cm, de consistance spongieuse. **Hyménophore** à surface porée de couleur jaune soufre ; pores plus ou moins quadrangulaires, très petits (7 à 8 /mm) ; tubes sans stratification et n'adhérant pas au stipe, de couleur beige rosé, de longueur variant de 0,1 cm à la marge à 0,25 cm au centre.

Figure 77 : *'Ganoderma' flaviporum* (Murrill) Sacc. & Trotter; SW 23. Aspect morphologique du basidiome (R. Courtecuisse).

Spores (figure 78) 11-[11.45]-12 x 7-[7.95]-9 µm, Largement elliptiques, tronqués, à double paroi *double* paroi. L'endospore et le myxosporium sont épais, opaques et jaune pâle au KOH 5%, parfois dextrinoïdes. Le sporothécium est hyalin, et les ornementations sont semblables à des crêtes discontinues, longitudinales et parfois anastomosées.

DISCUSSION : L'autonomie spécifique de '*Ganoderma*' *flaviporum* ne fait pas de doute, par rapport à l'espèce précédente, de même que sa position générique est évidente et que la combinaison sous *Humphreya* pourrait être proposée. Malgré tout, l'état actuel de reconstruction phylogénique des *Ganodermataceae* ne confirme pas le statut systématique des *Humphreya* (C. Decock, *pers. comm.*). Nous signalons donc cette affinité, sans en formaliser la combinaison. Une décision définitive sur ce groupe sera prise ultérieurement.

Figure 78 : '*Ganoderma flaviporum*' (Murrill) Sacc. & Trotter; SW 23, 1 = spores (1 bar = 10 µm) (S. Welti del.).

4) Remarques générales et conclusion

D'après nos investigations, il semble crucial, pour se faire une idée fiable de la structure systématique et de la définition des taxons au sein des *Ganodermataceae*, de confronter les résultats d'analyses morphologiques traditionnelles et d'une approche moléculaire. En effet, dans l'état actuel des recherches, la pertinence des caractères morphologiques semble remise en cause, pour la définition de taxons de rang hiérarchique supra-spécifique.

A ce niveau, les parentés génétiques apportent une information beaucoup plus pertinente, alors que les différences d'organisation macro- ou microscopique conservent toute leur importance pour la distinction des taxons.

Par ailleurs, les filiations évolutives entre taxons de différents continents semblent encore connues de manière très imparfaite, des vides très importants étant mis en évidence dans les aires de répartition de taxons phylogénétiquement proches. Cependant, une des hypothèses plausibles, dans le cas de champignons tels que les ganodermes, saprotrophes ou parasites de supports ligneux, est que les migrations aient pu être causées, de manière accidentelle et sur de très grandes distances, par l'introduction de plantes d'origines variées dans des régions très lointaines. On pourrait ainsi expliquer la présence aux Antilles de parents de *G. multipileum* et de *G. gibbosum* (sinon de ces espèces elles-mêmes). Mais cette hypothèse est très difficile à vérifier, en l'absence de citation précise des supports pour les récoltes les plus anciennes des espèces de ce genre (et on connaît la difficulté d'identification des troncs morts ou souches, en particulier en forêt tropicale).

Onze espèces de *Ganodermataceae* étaient connues aux Antilles françaises, d'après les données de la littérature. Nos campagnes de récolte et les travaux d'identification (connexes à une approche pharmacochimique) ont permis, en tenant compte des suppressions de taxons

douteux ou manifestement absents de la région, d'augmenter ce chiffre ; la diversité de cette famille, dans ces îles, atteint aujourd'hui 15 espèces. D'autres récoltes, intégrées aux programmes de reconstruction phylogénique, sont en attente de détermination plus précise et nous ne les présentons pas pour le moment. L'examen de quelques types décrits des régions néotropicales est encore nécessaire pour conclure certaines déterminations et les travaux de reconstruction phylogénique de la famille en cours et auxquels nous collaborons (travaux menés par C. Decock, Louvain-la-Neuve, Belgique) permettront encore d'avancer dans la reconnaissance de synonymies, d'indépendances taxinomiques et d'attribution de noms corrects.

C) Criblage des extraits fongiques issus des spécimens récoltés possédant une bioactivité de type antitumoral

1) Espèces sélectionnées

Certains spécimens récoltés aux petites Antilles françaises ont fait l'objet d'un criblage pharmacologique. Nos recherches ont essentiellement porté sur les *Ganodermataceae*, mais également sur d'autres polypores

Treize Ganodermes ou apparentés (*Humphreya)* (tableau 1) ainsi que 10 autres polypores (tableau 2) ont, ainsi, fait l'objet d'un premier screening sur cellules cancéreuses humaines cultivées *in vitro.* Leur activité a été comparée à celles des spécimens de référence, désignés sous le nom de *G. lucidum* d'origine européenne ou asiatique.

Spécimen	Taxon	Localité	Substrat
SW6	*Ganoderma tuberculosum* Murr.	La Trinité, Pointe Bateau. Martinique (F) 3 Décembre 2006	Tronc couché
SW9	*Ganoderma* aff. *subfornicatum* Murr.	Sinnamary, CIRAD de Paracou. Guyane (F) 27 Février 2007	Tronc couché
SW12	*Ganoderma pulverulantum* Murr.	La Trinité, Bois de Pointe-Rouge. Martinique (F) 12 Août 2007	Tronc couché mort (*Inga laurina*)
SW15	*Humphreya coffeatum* Murr.	Prêcheur, Anse Couleuvre, vers la cascade de la rivière Couleuvre. Martinique (F) 13 Août 2007	Tronc couché mort
SW16	*Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse	Prêcheur, Anse Couleuvre. Martinique (F) 13 Août 2007	Tronc couché mort
SW28	*Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse	Prêcheur, Anse Couleuvre en direction de l'Anse Lévrier. Martinique (F) 16 Août 2007	*Artocarpus altilis*
SW30	*Humphreya coffeatum* Murr.	Prêcheur, Anse des Galets. Martinique (F) 30 Août 2007	Arbre mort
SW37	*Ganoderma neogibbosum* Welti & Courtecuisse	Prêcheur, Anse Couleuvre. Martinique (F) 3 Septembre 2007	Tronc couché mort
SW45	*Ganoderma tuberculosum* Murr .	Le Robert, Bois-Pothau. Martinique (F) 24 Août 2008	Tronc couché mort
SW55	*Ganoderma martinicense* Welti & Courtecuisse	La Trinité, Bois de Pointe-Rouge. Martinique (F) 28 Août 2008	
SW61	*Ganoderma* sp. (non identifié)	Le Robert, Bois-Pothau. Martinique (F) 30 Août 2008	Arbre mort
Espèce de référence *Ganoderma lucidum* européen 1	*Ganoderma lucidum* (W.Curt. :Fr.) P. Karst	La Roche-sur-Yon. Vendée (F) (Leg René Pacaud) 10 Octobre 2008	
Espèce de référence *Ganoderma lucidum* européen 2[a]	*Ganoderma lucidum* (W.Curt. :Fr.) P. Karst	Dordogne, région de Sarlat (F), (Leg. Cony Decock) 2009	Sur chêne
Espèce de référence *Ganoderma lucidum* asiatique 1	*Ganoderma* « *lucidum* » (Asie)	Chine (Leg. Cony Decock) 2009	Marché chinois
Espèce de réference *Ganoderma lucidum* asiatique 2[a]	*Ganoderma* « *lucidum* » (Asie)	Chine (Leg. Ines Devred) 2008	Marché chinois

Tableau 1 : liste des *Ganodermataceae* testées et leur origine.[a] Ces spécimens n'ont pas fait l'objet du screening sur cellules cancéreuses, mais ont été étudiés pour leur profil chromatographique

Polypores	**Localité**	**Substrat**
Pycnoporus sanguineus SW/Mart08	Bois Pothau, Commune Le Robert, Forêt mésoxérophile. Martinique (F), le 24 Août 2008.	Bois mort
Laetiporus cf *sulphureus SW/Guad 08*	Commune de Saint Rose rivière Janikeste. Guadeloupe (F), le 15 Août 2008	Sur angiosperme vivant
Laetiporus sulphureus européen CLF 02. 664	Wingles 62, base de loisirs, le 11 Septembre 2002	Sur *Betula* mort
Stereum cf ostrea SW/Guad08	Commune de Saint Rose rivière Janikeste. Guadeloupe (F), le 15 Août 2008	sur tronc couché
Lenzites sp. SW/Mart08	Commune de Sainte Luce Forêt de Montravail. Martinique (F), le 23 Août 2008	Sur Bois mort
Microporellus cf dealbatus SW/Mart 07 GSP20 (voir annexe 2)	Case Pilote, Morne rose, forêt hygrophile. Martinique (F), le 14 Août 2007	Au sol sur racine de *Inga laurina* ou *Daphnopsis americana*
Trametes cf *villosa. SW/Mar07*	L'Anse Couleuvre, forêt mésophile secondaire agée en direction de l'Anse Lévrier. Martinique (F), le 27 Août 2008	Sur tronc couché pourri
Glaziella aurantiaca	Vieux-Fort. Ravine Blondeau, forêt méso-xérophile. Guadeloupe (F), le 22 novembre 2006	Au sol.
Rigidiporus cf *ulmarius.* SW/Mart 06-035	Pointe Bateau, Commune de la Trinité, forêt mésophile d'horizon inférieur à éléments relictuels du climax : *Sideroxylon foetidissimum, Hymenea courbaril*	Sur souche
Phellinus cf *fastuosus SW/Mart 06-037*	Le grand Macabou, Commune de Vauclin, Forêt sempervirente saisonnière sur sable. Martinique (F), le 1er Décembre 2006 .	Sur *Coccoloba uvifera*

Tableau 2 : liste des polypores testées et leur origine

2) Choix des lignées cellulaires pour le criblage des extraits bioactifs

Pour la sélection des extraits d'intérêt thérapeutique, 3 lignées cellulaires ont été utilisées :

La première correspond à des cellules prostatiques humaines hormono-indépendantes et issues de métastases osseuses **PC-3.**

La deuxième correspond à des cellules humaines provenant d'un adénocarcinome mammaire pour les cellules **MCF-7**.

La dernière correspond à des cellules humaines provenant d'un adénocarcinome colorectal de grade II **HT29.**

Les cellules cancéreuses mentionnées ci-dessus sont representatives des principaux cancers rencontrés en Europe pour lesquelles une forte morbidité et mortalité est associée. De plus, elles ont été utilisées comme modèle dans de nombreux travaux effectués à l'ICPAL.

a) Méthode

La première étape a consisté à broyer, puis à extraire au méthanol les spécimens choisis. Les extraits méthanoliques ont été lyophilisés de manière à faciliter le stockage, à homogénéiser les composés contenus dans les extraits et pour faciliter le dosage ainsi que la dilution des lyophilisats, soit dans le DMSO pour les tests MTT (test permettant d'évaluer le pouvoir antiproliferatif d'un extrait ou d'une substance : voir partie expérimentale), soit dans le méthanol pour la chromatographie de masse.

Le criblage des extraits a été effectué dans un premier temps sur des cellules cancéreuses humaines de type PC-3 à une concentration maximale de 50 $\mu g.ml^{-1}$ puis ajusté à 250 $\mu g.ml^{-1}$ de manière à obtenir une valeur de concentration inhibant 50% de la prolifération cellulaire (CI_{50}). Pour cela 50 mg de lyophilisats ont été dissous dans 1 ml de DMSO. Les solutions concentrées obtenues ont été filtrées, sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'un filtre à 0,22 µm puis diluées à différentes concentrations dans le milieu de culture des cellules tumorales. Celles-ci ont été mises en contact avec les extraits dilués pendant 72 h (Tomasi *et al*., 2005). La croissance cellulaire a ensuite été estimée par le test MTT. L'activité des extraits, en contact avec les cellules, a été donnée soit par un pourcentage d'inhibition de prolifération à une concentration donnée, soit par une valeur de concentration inhibant de moitié la prolifération cellulaire (CI_{50}). Les spécimens pour lesquels nous avons obtenu une CI_{50} > 250$\mu g.ml^{-1}$ sur PC-3 n'ont pas été testés sur MCF-7 et HT29 excepté le spécimen *Laetiporus sulphureus* européen dont l'activité a été comparée à celle du *Laetiporus* cf *sulphureus* récolté en Guadeloupe (tableau 2).

b) Résultats

Polypores	***Poids de l'extrait à partir de 100 mg de matière sèche***	***% d'inhibition à 50 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur MCF-7***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur HT-29***
Pycnoporus sanguineus	***2,46***	***n.d***	***30 µg.mL^{-1}***	***57 µg.mL^{-1}***	***22 µg.mL^{-1}***
Laetiporus* cf *sulphureus	***6,96***	***n.d***	***137 µg.mL^{-1}***	***43%***	***37%***
Laetiporus sulphureus européen	*4.02*	*n.d*	*0*	*0*	*0*
Stereum cf *ostrea*	*3,58*	*n.d*	*46%*	*n.d*	*n.d*
***Lenzites* sp**	***2,5***	***n.d***	***193 µg.mL^{-1}***	***34%***	***104 µg.mL^{-1}***
Microporellus cf *dealbatus*	*3,9*	*4%*	*n.d*	*n.d*	*n.d*
Trametes cf *villosa*	*1,15*	*0%*	*n.d*	*n.d*	*n.d*
Glaziella aurantiaca	*5,1*	*8%*	*1%*	*n.d.*	*n.d*
Rigidiporus cf *ulmarius*	*2,4*	*0%*	*n.d*	*n.d*	*n.d*
Phellinus cf *fastuosus*	*1,15*	*5%*	*n.d*	*n.d*	*n.d*

Tableau 3 : Inhibition de prolifération des extraits bruts de polypores Antillais sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines

Ganodermataceae à revêtement différencié	***Poids de l'extrait à partir de 100 mg de matière sèche***	***% d'inhibition à 50 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur MCF-7***	***CI$_{50}$ ou % 'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur HT-29***
SW6 Ganoderma tuberculosum	*3.50*	*28%*	*97 µg.mL^{-1}*	*171 µg.mL^{-1}*	*31 µg.mL^{-1}*
SW45 Ganoderma tuberculosum	*2.62*	*n.d*	*68 µg.mL^{-1}*	*171 µg.mL^{-1}*	*29 µg.mL^{-1}*
SW61 Ganoderma sp. Non identifié	*7.30*	*n.d*	*146 µg.mL^{-1}*	*130 µg.mL^{-1}*	*0%*
SW55 Ganoderma martinicense	*3.26*	*n.d*	*45%*	*n.d*	*n.d.*
SW9 Ganoderma aff. subfornicatum	*4.50*	*9%*	*21%*	*n.d.*	*n.d.*
SW12 Ganoderma pulverulantum Murr	*2.50*	*6%*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Espèce de référence Ganoderma lucidum européen 1	*9.60*	*20%*	*157 µg.mL^{-1}*	*137 µg.mL^{-1}*	*33 µg.mL^{-1}*
Espèce de référence lucidum asiatique 1	*3.1*	*n.d*	*128 µg.mL^{-1}*	*136 µg.mL^{-1}*	*0%*
Ganodermes ou apparentés à revêtement indifférencié	***Poids de l'extrait à partir de 100 mg de matière sèche***	***% d'inhibition à 50 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur PC-3***	***CI$_{50}$ ou % d'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur MCF-7***	***CI$_{50}$ ou % 'inhibition à 250 µg.mL^{-1} sur HT-29***
SW30 and SW15 Humphreya coffeatum	*2.75-9*	*7%*	*9%-n.d*	*n.d.*	*n.d.*
SW16 Ganoderma neogibbosum	*2.15*	*6%*	*n.d.*	*n.d*	*n.d.*
SW37 and SW28 Ganoderma neogibbosum	*4.55-2.80*	*10%*	*0-3%*	*n.d*	*n.d*

Tableau 4 : Inhibition de prolifération des extraits bruts de plusieurs *Ganodermataceae* sur 3 lignées de cellules humains cancéreuses.

Résultats (tableau 3)

Tout d'abord, sur les 10 polypores testés, 3 espèces ont présentées une activité inhibitrice intéressante : *Pycnoporus sanguineus*, *Laetiporus* cf *sulphureus* et un spécimen appartenant au genre *Lenzites sp* non identifié. Les meilleurs résultats d'inhibition de prolifération sur PC-3, MCF-7 et HT29 parmi tous les spécimens testés (y compris les *Ganodermataceae*) ont été obtenus à partir de l'extrait méthanolique de *Pycnoporus sanguineus* (CI_{50} = 30, 57 et 22 µg.ml^{-1} respectivement).

Discussion

Pycnoporus sanguineus :

A partir de l'extraction de *Pycnoporus cinnabarinus*, plusieurs composés de la famille des phénoxazones (pycnoporine, tramesanguine, acide cinnabarinique et cinnabarine) ont été isolés (Dias *et al.*, 2009). La cinnabarine, par exemple, est un composé de type phénoxazonique, de couleur rouge orangé, possédant une activité antivirale, antibiotique et antiparasitaire (leishmanicide), retrouvée également chez le *Pycnoporus sanguineus* (Smânia *et al.*, 2003 et Correa *et al.*, 2006). Les phénoxazones (figure 79) sont aussi présents chez les insectes en tant que pigments naturels ommochromes ou synthétisés par certains Actinomycètes (Welti, 1998 et Umezawa, 1948) : c'est le cas de l'actinomycine D, utilisée dans le traitement de tumeurs spécifiques chez l'enfant. La cinnabarine se différencie, par rapport à ce dernier composé, par l'absence de chaînes peptidiques sur le C_1 et C_9 du noyau phénoxazone (figure 80). Il a été montré précédemment par Dias & Urban (2009) que la cinnabarine possédait également une activité antitumorale significative, ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus sur nos 3 lignées.

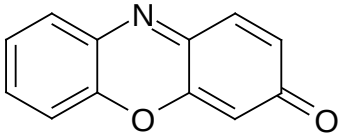
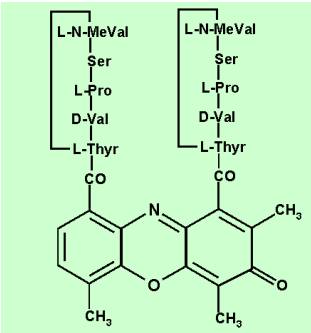
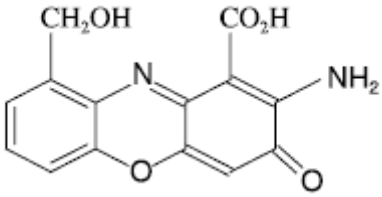


Fig 79 : Phénoxazone



Actinomycine D



Cinnabarine

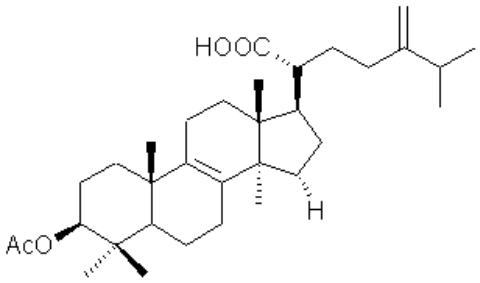
Figure 80 : Actinomycine D
http://oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp07.html, et Cinnabarine (Smânia *et al.*,, 2003)

Laetiporus sulphureus :

A partir de cette espèce, plusieurs triterpènes de type lanostane ont été identifiés. Certains d'entre eux ont montré précédemment une activité cytotoxique sur cellules leucémiques promyélocytaires de type HL-60 par induction de l'apoptose. C'est le cas de l'acide acétyl éburicoique (figure 81) qui agit par induction de la caspase-3 (Leòn *et al*, 2008).

Pourtant, sur nos 3 lignées cancéreuses, l'activité antiproliférative n'a été constatée que pour le vicariant antillais alors que le *Laetiporus sulphureus* européen, utilisé ici à titre de comparaison, n'a présenté aucune activité.

Or, le spécimen, appelé '*Laetiporus sulphureus'*, utilisé pour l'extraction des triterpènes antiprolifératifs mentionnés ci dessus, a été récolté dans la région de Tequendama en Colombie. Il n'est donc pas exclu que l'espèce réputée active puisse correspondre à celle que nous avons récoltée, étant donné la proximité géographique de la Colombie avec les petites Antilles françaises. De plus, il est peu probable qu'une espèce européenne puisse être retrouvée en milieu néotropical. Ainsi, l'espèce mentionnée précédemment par Leòn *et al*, 2008, serait un vicariant du spécimen européen désigné sous le nom *Laetiporus sulphureus* au même titre que notre espèce récoltée.



acide acétyl éburicoique

En ce qui concerne les *Ganodermataceae*, nous avons séparé les résultats d'inhibition de prolifération des espèces possèdant un revêtement indifférencié de type anamixodermique ou trichodermique (genre *Humphreya* et sous-genre *Elfvingia*), des espèces possèdant un revêtement différencié d'aspect luisant de type hyménodermique, possédant sur la surface du chapeau des piléocystides clavées et rangées en palissade (correspondant au sous-genre *Ganoderma*). Nous avons constaté, ainsi, que l'activité antiproliférative est plus importante pour les espèces laquées que pour celle des espèces aux revêtements mats (tableau 4).

Les 3 spécimens (SW6, SW45 et SW61) ont montré la plus forte activité antiproliférative sur cellules PC-3 et MCF-7 (valeurs respectives des CI_{50} sur PC-3 : 97, 68 et 146 µg.ml^{-1} ; sur MCF-7 : 171, 171, et 130 µg.ml^{-1}). Pour SW6 et SW45 les résultats sur PC-3 sont presque 2 fois supérieurs à ceux obtenus pour les spécimens de référence : le *G. lucidum* européen (CI_{50} = 157 µg.ml^{-1}) et le *G. lucidum* asiatique (CI_{50} = 128µg.ml^{-1}). Ces 4 espèces ont montré des valeurs identiques sur MCF-7 comprises entre 130 et 170 µg.ml^{-1}.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur cellules HT29, l'espèce SW61 ainsi que le *G. lucidum* asiatique n'ont pas montré d'activité (0% d'inhibition de prolifération), tandis que SW6, SW45 et le *G. lucidum* européen ont donné respectivement une CI_{50} de 31, 29 et de 33 µg.ml^{-1}.

Aux concentrations testées, aucune autre activité antiproliférative significative n'a pu être montrée pour les espèces autres que celles décrites ci-dessus.

Enfin, nous avons constaté que pour une même espèce, les résultats d'inhibition de prolifération sont similaires. C'est le cas pour *Humphreya coffeatum* (SW15 et SW30) et pour le clade *G.neogibbosum* (SW37 et SW28) dont les spécimens testés n'ont pas montré d'activité significative. De même, pour *G. tuberculosum*, les spécimens SW6 et SW45 ont montré des résultats d'inhibition de prolifération similaires.

Par contre, le *G. lucidum* asiatique et le *G. lucidum* européen ont présenté des résultats différents sur HT29 (CI_{50} respective de 0% à 250 µg.mL^{-1} et 33 µg.ml^{-1}), ce qui est corrélation avec les conclusions de taxonomistes qui les considèrent comme deux taxons différents (Moncalvo, 1995).

Ainsi parmi les *Ganodermataceae* testées, *G. tuberculosum* (SW6 et SW45) a été considérée comme l'espèce la plus intéressante pour la recherche de composés bioactifs.

D) Comparaison et analyse des profils chromatographiques des spécimens actifs SW45 *vs* SW6 et *G. lucidum* asiatique vs *G. lucidum* européen

1) SW6 *vs* SW45 par CCM

Plusieurs CCM des extraits méthanoliques de SW6 et SW45 (*G. tuberculosum)* ont été réalisés ; différents éluants ont été testés : Hexane-Acétone (95 :5) ; Hexane-Acétone (9 :1) ; Chloroforme-Acétate d'éthyle (9 :1) ; Chloroforme-Méthanol (17 :2). En terme de résultats, le dernier mélange est celui qui a été le plus efficace pour la révélation des triterpènes.

Après migration sur CCM, les profils chromatographiques ont été observés aux longueurs d'ondes suivantes : 254 et 366 nm, puis révélées à l'anisaldéhyde sulfurique (chauffé à 100°C) pour la révélation des triterpènes. La recherche d'alcaloïdes a, quand à elle, été effectuée par la pulvérisation du réactif de Draggendorf. Le β-sistostérol (20 µl à 0,5 mg/ml soit 10 µg déposés sur la CCM), l'acide ganodérique A et l'acide ganodérique DM (20 µl à 1 mg/ml soit 20 µg déposés) ont servi de témoin. Pour chaque extrait, l'équivalent de 15 mg de matière sèche a été déposé sur les plaques CCM (voir partie expérimentale).

Résultats

Tout d'abord, la recherche d'alcaloïdes sur CCM a été infructueuse pour SW6 et SW45. En revanche, après pulvérisation d'anisaldéhyde sulfurique, le même profil de migration a été obtenu pour SW6 et SW45 (figure 82). La majorité des composés ont présenté soit une coloration bleu-violet ou bien une coloration rouge orangé. Ainsi, deux zones de migration majoritaire ont retenu notre attention :

- la première de couleur noir violet, peu visible à 254 nm et de R_f identique au témoin égale à 0,61

- la deuxième de Rf 0,38 de coloration rouge orangé très vive après chauffage (100°C-3 min).

Discussion

La présence d'alcaloïdes dans les 2 extraits n'a pas été démontrée ici, contrairement au *Ganoderma capense* pour lequel les composés '*Ganoderma'* alkaloides A et B ont été révélés (Yang JJ & Yu, 1990),

En revanche, la vaporisation d'anisaldéhyde a permis de révéler que :

- le premier composé, pourrait correspondre à l'ergostérol. En effet, la structure de ce composé est proche du β sistostérol (témoin) et donc le profil de migration de ces deux composés ainsi que leur coloration sur CCM devraient être relativement similaire. De plus, il a été démontré récemment que l'ergostérol total (libre et estérifié) représentait 0,8 à 1,6 ‰ du poids sec total du *Ganoderma lucidum* (Yuan *et al.*, 2007). Si l'on reporte ces proportions à la quantité équivalente de matière sèche déposée sur la plaque CCM (15mg, voir partie expériementale), la quantité totale d'ergostérol déposée pour chaque extrait serait comprise entre 12 et 24 µg. Ces quantités sont relativement proches de celles utilisées pour le témoin, ce qui expliqueraient l'intensité de coloration similaire obtenue pour la substance de référence (β sistérol : 10 µg) et le composé majoritaire (ergostérol, composé supposé ici) de R_f =0,61.

- le deuxième composé majoritaire, retrouvé sur les deux espèces actives (SW6 et SW45), correspondrait probablement à un acide ganodérique puisque la teinte rouge orangé obtenue après vaporisation d'anisaldéhyde sulphurique est caractéristique de ces triterpènes, en particulier de l'acide ganodérique B et C (Kohda *et al*., 1985). De plus, nous observons que les acides ganodériques (GA) DM et surtout GA A, de R_f proche du deuxième composé majoritaire, ont tendance à prendre également cette coloration (figure 82).

Avant même l'obtention des résultats de séquençage, les similarités constatées entre SW6 et SW45 concernant leur profil CCM, leurs caractéristiques micro-morphologiques ainsi que leur résultats sur cellules cancéreuses, laissaient présumer l'éventualité que les deux spécimens puissent appartenir à la même espèce. SW6, récolté en décembre 2006, fut le premier spécimen pour lequel nous avons obtenu une inhibition de prolifération intéressante. De ce fait, un de nos objectifs lors de la récolte effectuée en août 2008 fût de retrouver cette espèce en plus grande quantité de manière à pouvoir suivre nos recherches. SW45, récoltés en août 2008 présentait au niveau morphologique, plusieurs traits communs avec SW6 ; puis le séquençage de ces deux spécimens a permis de conclure qu'il s'agissait bien de la même espèce. Ainsi, les caractéristiques macromorphologiques sont des éléments importants pour la détermination des espèces.

2) *G. lucidum* asiatique vs *G. lucidum* européen par CCM

Résultats

Pour le même éluant [Chloroforme-Méthanol (17 :2)], et à quantité égale déposée (environ 15 mg), nous avons constaté, tout d'abord, que les profils chromatographiques des deux *G. lucidum* sont différents. Celui du *G. lucidum* européen semble plus concentré que le *G. lucidum* asiatique en composés colorés, la plupart absorbant à 254 nm (les zones de migration absorbant à cette longueur d'onde sont délimitées à droite par un trait de crayon).

Tous deux possèdent en tête de migration une zone de coloration bleu-violet intense de R_f similaire au témoin (R_f 0,6). Néanmoins, ce composé majoritaire semble se scinder en 2 spots distincts pour l'espèce européenne : celui de R_f plus élévé absorbe à 254 nm tandis que le suivant n'absorbe pas ou faiblement de la même façon que le β-sistérol.

Contrairement à SW6 et SW45, les spécimens désignés sous le nom de *G. lucidum*, n'ont pas mis en évidence de composé majoritaire de couleur rouge orangé et de Rf 0,38-0,4. Toutefois, l'espèce asiatique a présenté, de manière non reproductible, ce genre de spot mais à des R_f différents. De plus, pour ce dernier, nous avons constaté, à plusieurs reprises, une zone intense de migration absorbant à 254 nm, de R_f identique à GA A (0,5), mais peu apparente après vaporisation de substances chromogènes (anisaldéhyde sulfurique).

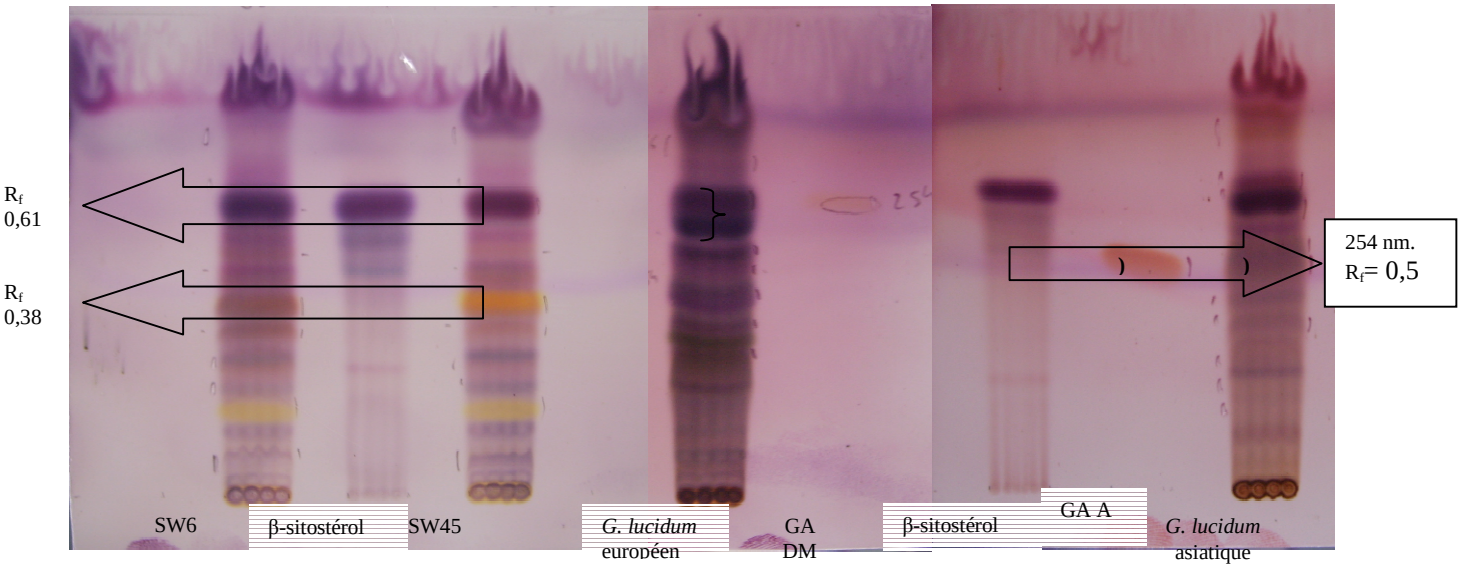


Figure 82 : CCM comparative de SW6, SW45, *G. lucidum* asiatique, *G. lucidum* européen, GA A, GA DM et β-sitostérol.

Discussion

Cette première comparaison des profils chromatographiques sur CCM est rudimentaire, mais a permis de révéler que les deux extraits sont qualitativement différents. Ce résultat est donc en corrélation avec les conclusions des taxinomistes qui considèrent que l'espèce asiatique est différente de l'espèce européenne (Moncalvo, 1995). De même, la similitude des profils chromatographiques de SW6 et SW45 est en corrélation avec les résultats de séquençage.

Ainsi, bien que toutes les possibilités offertes par les tests CCM n'aient pas été explorées ici, nous avons pu constater :

- que les profils chromatographiques du *G. lucidum* européen et du *G. lucidum* asiatique étaient différents.

- que l'analyse par CCM permettait d'obtenir un profil caractéristique d'une espèce (SW6 et SW45)

- la présence éventuelle d'acide(s) ganodérique(s) pour *G. tuberculosum* (SW6 et SW45) et pour l'espèce asiatique

- une présence probable d'ergostérol en tant que composé majoritaire pour les 4 spécimens.

3) SW6 et SW45 par LC-MS

Les deux spécimens SW6 et SW45, dont les profils chromatographiques et les résultats d'inhibition de prolifération sont similaires, ont été analysés par LC-MS. Leur chromatogramme UV, leur chromatogramme de masse ainsi que leur spectre de masse ont été comparés. Les témoins GA A et GA DM et GA F ont été réalisés à la concentration de 1 $mg.ml^{-1}$.

Résultats

Entre les temps de rétention compris entre 12 et 22 min, les deux profils chromatographiques sont superposables (figure 83). Chaque pic en commun correspond à un même composé de temps de rétention et de poids moléculaires identiques (tableau 5). Le plus important d'entre eux est caractérisé par une masse moléculaire de 532 $g.mol^{-1}$, λ_{max} = 254 nm, et un temps de rétention t_R = 15,15 min pour SW45 et 15,17 min pour SW6.

Selon la littérature et les témoins utilisés, les temps de rétention ainsi que les spectres de masse obtenus pour ces 5 pics chromatographiques possèdent certaines caractéristiques des triterpènes du *Ganoderma lucidum*. De plus, en ESI-MS, la perte de H_2O, retrouvée pour les pics 2 et 3 et pour GA A, est fréquente chez les acides ganodériques. (Yang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008 ; Fu *et al.*, 2008)

Enfin, à partir des 2 chromatogrammes de masse, nous avons procédé à l'extraction des ions de *m/z* 517, 571 et 469. Les temps de rétention obtenus ont été différents de ceux des témoins (GA A , GA DM et GA F).

Discussion

En LC-ESI-MS l'approche chromatographique des extraits SW6 et SW45, nous a permis de dresser un profil chromatographique caractéristique de l'espèce *G. tuberculosum*. De plus, cette technique nous a apporté une information sur la masse moléculaire des composés. Celle-ci semble correspondre aux masses rencontrées pour certains acides ganodériques (Yang, 2007). Ainsi, le pic 3, malgré des temps de rétention différents de celui du témoin (17,29 min pour GA A *vs* 15,93 et 15,97 min), mais dont le spectre de masse présente des ions de *m/z* similaires (*m/z* 499, 517 et 1033), pourrait correspondre à un isomère de l'acide ganodérique A. Enfin, les acides ganodériques A, F et DM n'ont pas été retrouvés pour cette espèce.

Peaks	t_R (min) SW6	t_R (min) SW45	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$ et $[2M+H]^+$
1	14,52	14,58		531
2	15,17	15,15	515	533, 1065
3	15,97	15,93	499	517, 1033
4	17,90	17,89		532
5	21,80	21,77		475, 949
GA-A	17,29		499	517, 1033
GA-F	18,93			571, 1141
GA-DM	32,67			469, 937

Tableau 5 Temps de rétention de chaque pic et ions majoritaires obtenus en LC-ESI-MS pour SW6 et SW45

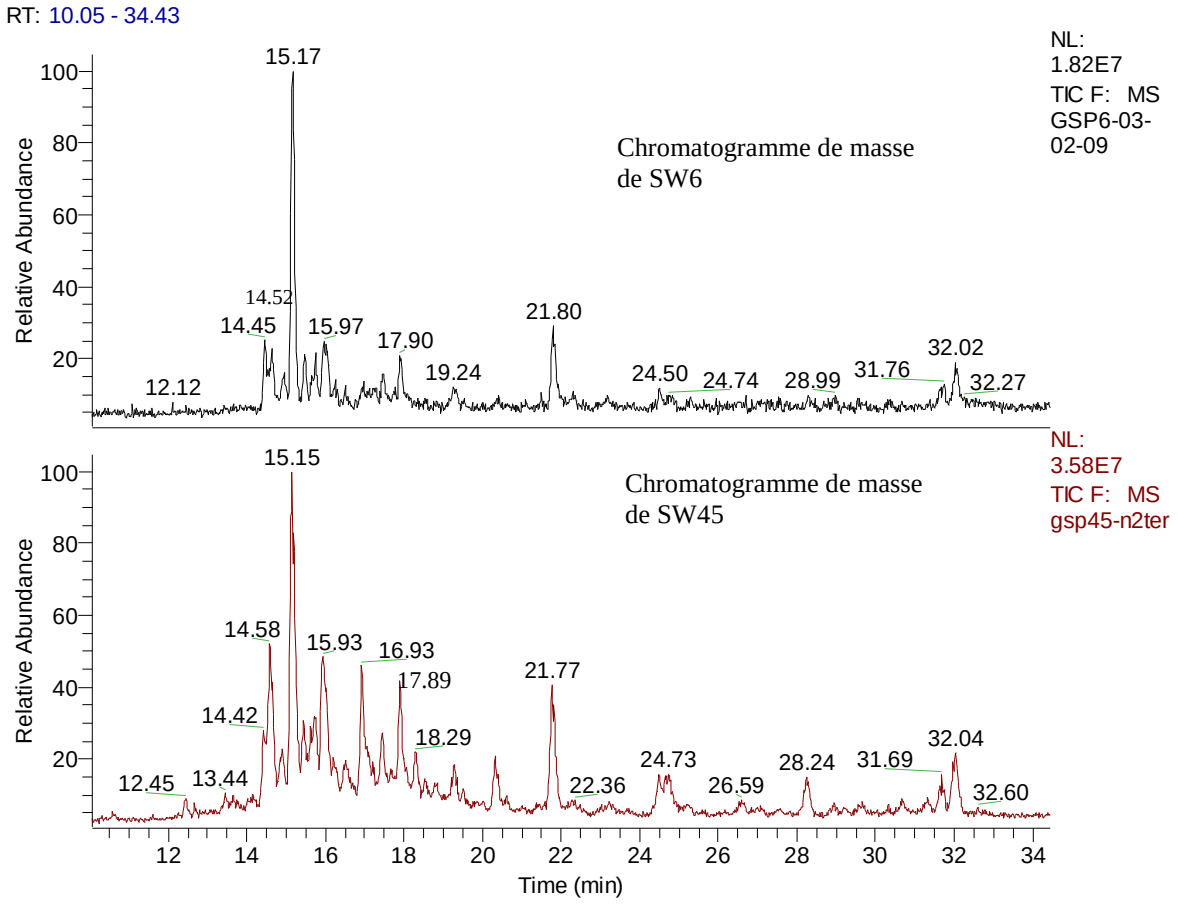


Figure 83 : comparaison des chromatographies de masse de SW6 et SW45.

4) Analyse du pic majoritaire de *Ganoderma tuberculosum* par spectrométrie de Masse Tandem (ou MS/MS) en mode négatif

Dès lors que les critères taxinomiques et chimiques se rejoignent, SW6 et SW45 seront désigné sous le même nom de *G. tuberculosum.*

D'après Yang *et al.* (2007), les voies de fragmentation des acides ganodériques en ESI-MS et ESI-MS^2 sont principalement la perte de H_2O et de CO_2 (soit une perte respective de 18 et de 44 Da). Toutefois, la clef permettant de distinguer les acides ganodériques entre eux réside dans l'analyse des masses obtenues après le clivage des noyaux C et D (figure 84)

Selon les différents types de substitution sur C-7, 12 et 15, le nombre total d'atomes de carbone (C_{27} ou C_{30}) et la présence ou l'absence de double liaison $\Delta_{20\text{-}22}$, 5 types d'acides ganodériques peuvent être ainsi caractérisés.

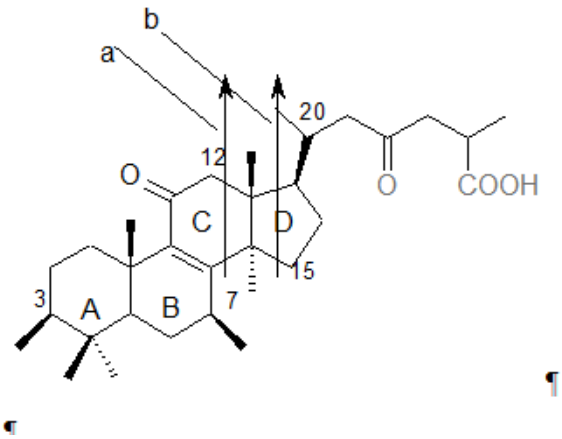


Figure 84 : voies de fragmentation clef pour la détermination des acides ganodériques

L'analyse du composé témoin GA A par ESI-MS^2 en mode négatif (système quadripole), donne les ions $[M-H]^-$; $[M-H_2O-H]^-$; $[M-2H_2O-H]^-$; $[M-2H_2O-CO_2-H]^-$ de masse respective *m/z* 515, 497, 479, 435 ainsi que les ions b, b-1, b-2, b-16 de masse respective *m*/z 301, 300, 299, 285. Ces ions obtenus par fragmentation de l'acide ganodérique A sont identiques à ceux obtenus par ESI-MS^n mode négatif (système à trappe d'ion) (Yang *et al.*, 2007). Ainsi, l'utilisation du système quadripole paraît être aussi efficace pour la détermination totale ou partielle des acides ganodériques connus ou inconnus (figure 85)

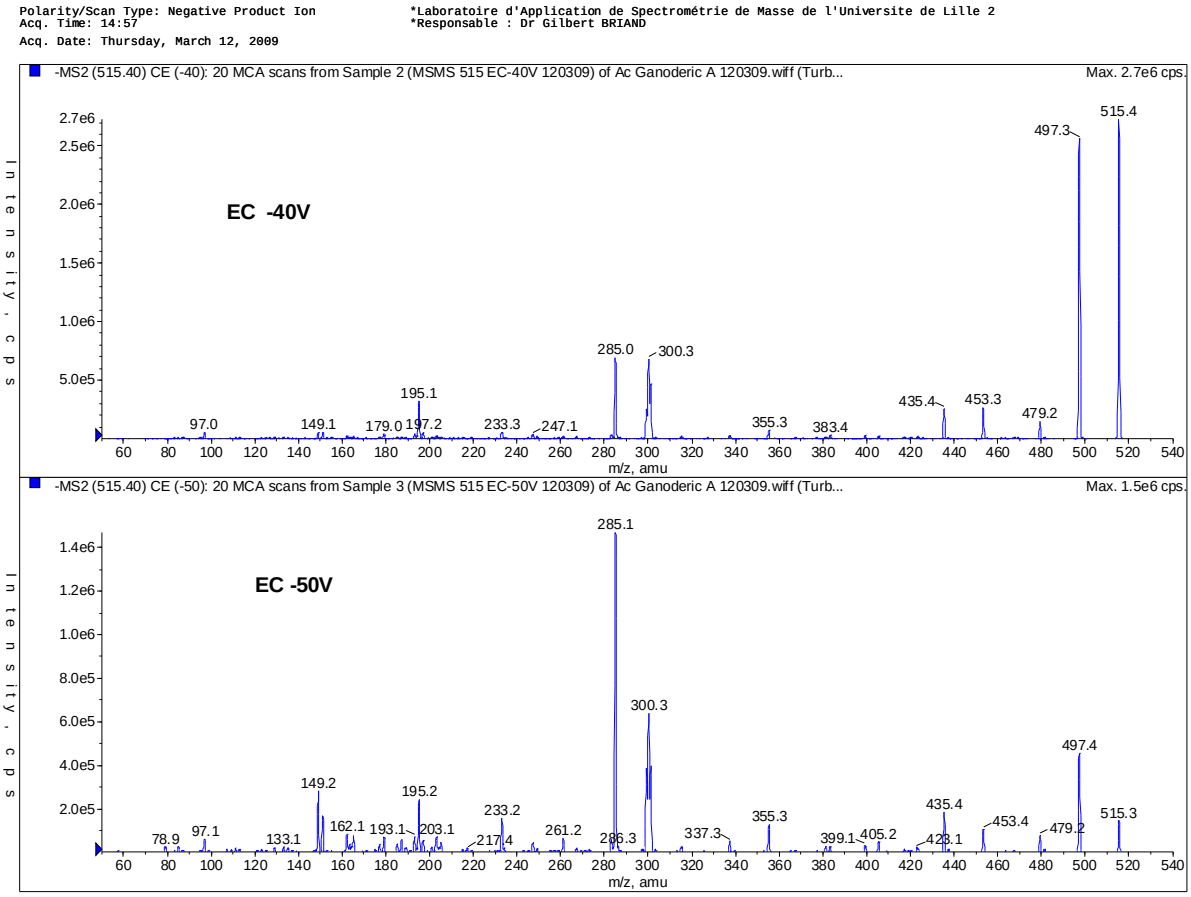


Figure 85 : Masses des ions obtenues après fragmentation par ESI-MS^2 de GA A

Le courant total d'ionisation (TIC) des extraits méthanoliques obtenu par LC-ESI-MS en mode négatif permet d'obtenir un pic majeur à t_R = 14,99 min. Le signal dominant obtenu sur le spectre de masse en ESI-MS simple, à ce temps de rétention, est l'ion à *m/z* 531 et les signaux minoritaires sont par ordre d'importance les ions *m/z* 1063 et 513. Les spectres ESI-MS^2 des ions à *m/z* 531 et 513 présentent les mêmes fragments (figure 86), ce qui permet de les considérer respectivement comme étant $[M-H]^-$, $[M-H-H_2O]^-$, *m/z* 1063 devant correspondre à $[2M-H]^-$. La présence du triterpène dominant (MW= 532 g.mol^{-1}) mentionné à t_R 15,15 min pour SW6 et 15,17 min pour SW45 en LC-MS mode positif est donc confirmé ici.

Ce composé dominant en ESI-MS^2 est entièrement fragmenté et n'apparait pas sur le spectre de masse (figure 86). Quatre ions, issus de la fragmentation du noyau C et D : a, a+14, b et b-16 de *m/z* respectif 249, 263, 303, 287, sont retrouvés. Ces fragments sont caractéristiques des acides ganodériques de catégorie III du *Ganoderma lucidum* (Yang *et al*., 2007). Cette

catégorie se distingue par un groupement hydroxyle en C-7 et une fonction cétone en C-15. Elle comporte, de plus, les molécules suivantes : GA B, GnB, GA G, GA K, GnK (figure 13) de masse molaire respective 516, 514, 532, 574 et 572 $g.mol^{-1}$. Parmi elles, GA B et GnB ont des masses différentes et plus légères de 16 et 18 Da que celle de notre composé majoritaire. Ces composés sont donc exclus de nos hypothèses de structure. Toutefois, cette différence de masse devrait correspondre à la substitution d'un atome d'hydrogène de GA B par un groupement OH.

Ainsi, GA G de masse 532 $g.mol^{-1}$ qui possède un groupement OH situé sur le C-12 du noyau C, représente un candidat potentiel à nos hypothèses de structure. Toutefois, en ESI-MS^n la fragmentation du cycle C et D de ce composé donne respectivement les ions **a** à *m/z* 265 et **b** à *m/z* 319 au lieu des ions **a** à *m/z* 249 et **b** à *m/z* 303 attendus (différence de masse égale à 16 Da correspondant à la substitution d'un atome H par un groupement OH sur le cycle cyclopentanophénantrénique).

Par conséquent, le groupement OH devrait plutôt se situer sur la chaîne latérale fixée sur le C-17 du composé. Cette hypothèse paraît confirmée par la présence des ions à *m/z* 531, 513, 469 [identifiés comme (1) $[M-H]^-$ (2) $[M-H_2O-H]^-$ (3) $[M-H_20-CO_2-H]^-$] (figure 86) à la place des fragments à *m/z* 515, 497 et 451 caractéristiques de GA B.

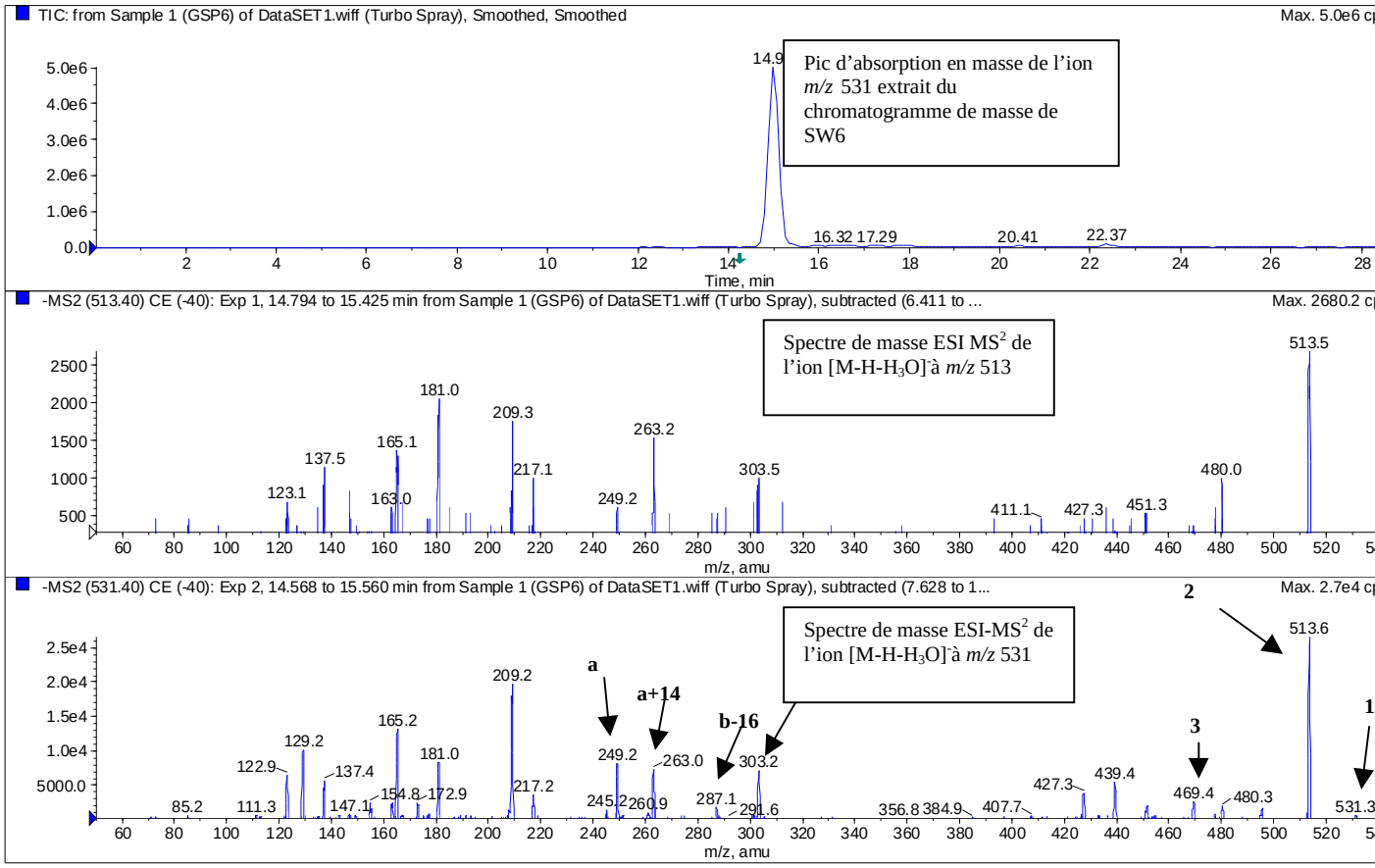
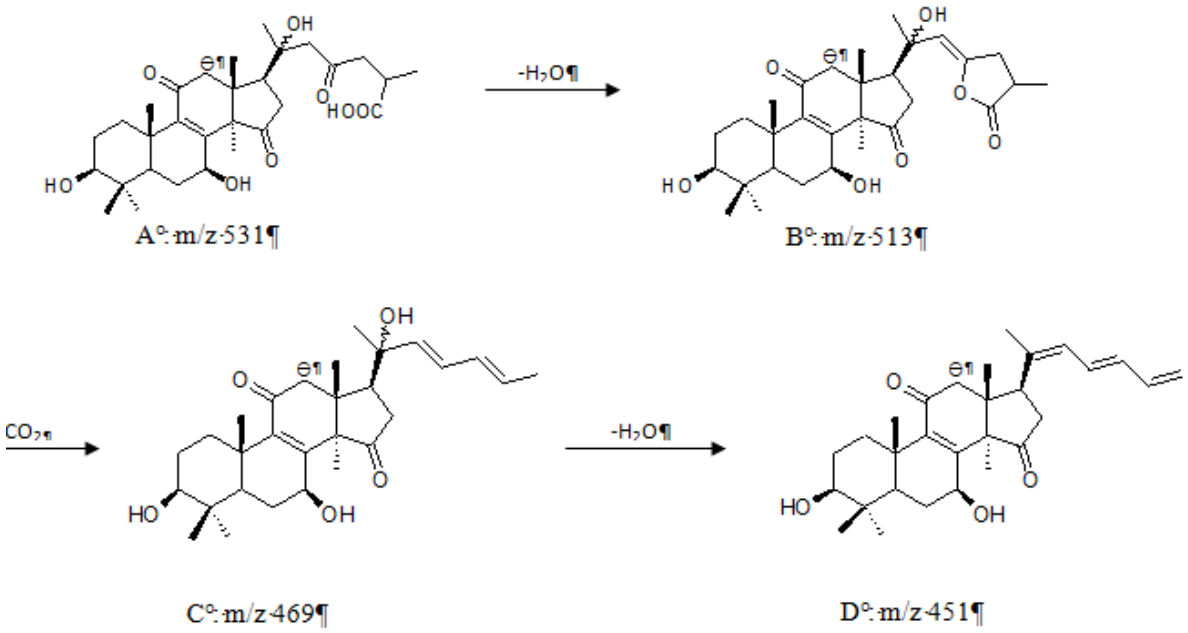


Figure 86 : spectre ESI-MS-MS et temps de retention du composé majoritaire de l'extrait *G. tuberculosum*

D'après la littérature, un seul composé correspondrait à l'acide ganodérique B hydroxylé sur sa chaîne latérale : il s'agit de l'acide ganodérique I (Kikuchi *et al.*, 1985).

Si l'on suit le modèle de fractionnement de GA B proposé par Yang *et al*. (2007) et selon notre hypothèse, cette molécule hydroxylée en C-20, devrait se fragmenter ainsi



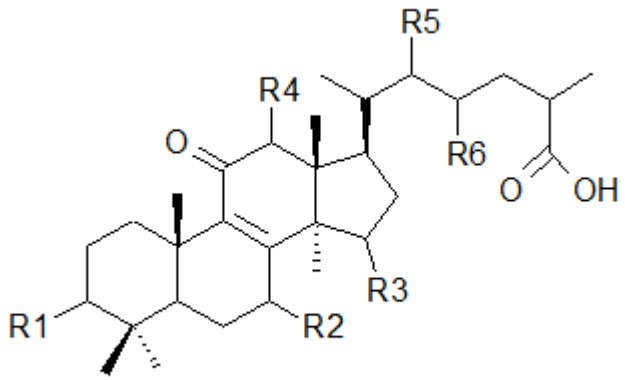
Ce modèle de fragmentation aboutit à la formation de l'ion à *m/z* 451 que l'on retrouve sur le spectre ESI-MS-MS du composé majoritaire de l'extrait *G. tuberculosum.*

5) Comparaison des profils chromatographiques de masse des *G. lucidum* asiatique et *G. lucidum* européen

Méthode

Avant de comparer les deux espèces, nous nous sommes assurés de la reproductibilité des profils chromatographiques pour une même espèce. Pour cela, nous avons d'abord effectué, pour chaque espèce, l'analyse en LC-MS de deux spécimens : *G. lucidum* asiatique 1 et 2 et

G. lucidum européen 1 et 2 (tableau 31). La recherche des témoins GA A, GA F et GA DM a été effectuée pour les deux espèces (figure 87).



Nom du composé	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Double liaison
Acide ganodérique A	=O	β-OH	α-OH	H	H	=O	
Acide ganodérique B	=O	=O	=O	β-OAc	H	=O	
Acide ganodérique DM	=O	=O	H	H	H	H	$\Delta_{24,25}$

Figure 87 : structure moléculaire des trois témoins

a) Résultats obtenus par comparaison des 2 spécimens nommés *G. lucidum* asiatique

Entre les temps de rétention compris entre 14 et 31 min, les deux profils chromatographiques sont superposables (figure 88 et 89). Chaque pic en commun correspond à un même composé de temps de rétention et de poids moléculaire similaire (tableau 6).

Durant cette période, la masse des composés, leur temps de rétention ainsi que la perte de H_2O obtenue pour certains ions mères $[M+H]^+$ de *m/z* 519, 533 et 515, sont conformes à ceux habituellement obtenus pour les acides ganodériques (Yang, 2007). De plus, la comparaison des masses et des t_R de chaque pic avec ceux des témoins permet d'affirmer que le composé correspondant au pic n° 5 est très probablement l'acide Ganodérique F (Boh *et al.*, 2000) également nommé 12-acetoxyganoderic acid F par Yang *et al.* (2007).

A partir des 2 chromatogrammes de masse, l'extraction des ions $[M+H]^+$ de *m/z* identique à celui de GA A (*m/z* 517) montre plusieurs pics d'absorption au t_R 18,11 ; 17,50 et 16,19 min (16,20 pour *G. lucidum* asiatique 2) . L'un des pics présente un temps de rétention identique à celui de GA A (18,11 *vs* 18,09 min pour GA A) (Figure 90 et 91), il est donc fort probable que ce composé soit présent dans les spécimens asiatiques.

L'extraction des ions à *m/z* 571 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de GA F confirme la présence de ce composé dans les deux extraits (figure 90 et 91)

En revanche, l'extraction des ions à *m/z* 469 correspondant à GA DM, donne un faible pic d'absorption à t_R 36,05 min (*Ganoderma lucidum* asiatique 1) et 36,11min (*Ganoderma lucidum* asiatique 2). Ces deux temps étant très proches de celui du témoin GA DM (36 min), il est probable que GA DM soit présent en faible quantité dans les 2 extraits.

Numéro des pics	**Temps de rétention (en min)**	***G. lucidum* asiatique 1 *m/z***				***G. lucidum* asiatique 2 *m/z***			
		$[M+NH_4]^+$	**$[M+H]^+$,**	**$[M-H_2O+H]^+$**	**$[2M+H]^+$**	**$[M+NH_4]^+$**	**$[M+H]^+$**	**$[M-H_2O+H]^+$**	**$[2M+H]^+$**
1	**16,40**	536	519	**501**	**1037**	536	519	501	**1037**
2	**17,31**	550	533	**515**	**1064,5**	550	533	515	
3	17,99	590	573	***abs***		590	573	***abs***	
4	19,33		515	**497**	**1029**		515	497	
5	**19,90 GA F**	**588**	**571**			**588**	**571**		
6	20,27	532	515	***abs***		532	515 (signal faible)	***abs***	
7	23,46	318	301			318	301		
8	30,21	322	305			322	305		

Témoins	**Temps de rétention (en min)**	**$[M+NH_4]^+$**	**$[M+H]^+$,**	**$[M-H_2O+H]^+$**	**$[2M+H]^+$**
GA A	18,09	534	517	499	1033
GA F	19,92	588	571		

GA DM	36	469	937

Tableau 6: Temps de rétention de chaque pic et ions majoritaires obtenus en LC-ESI-MS pour *G. lucidum* asiatique 1 et 2

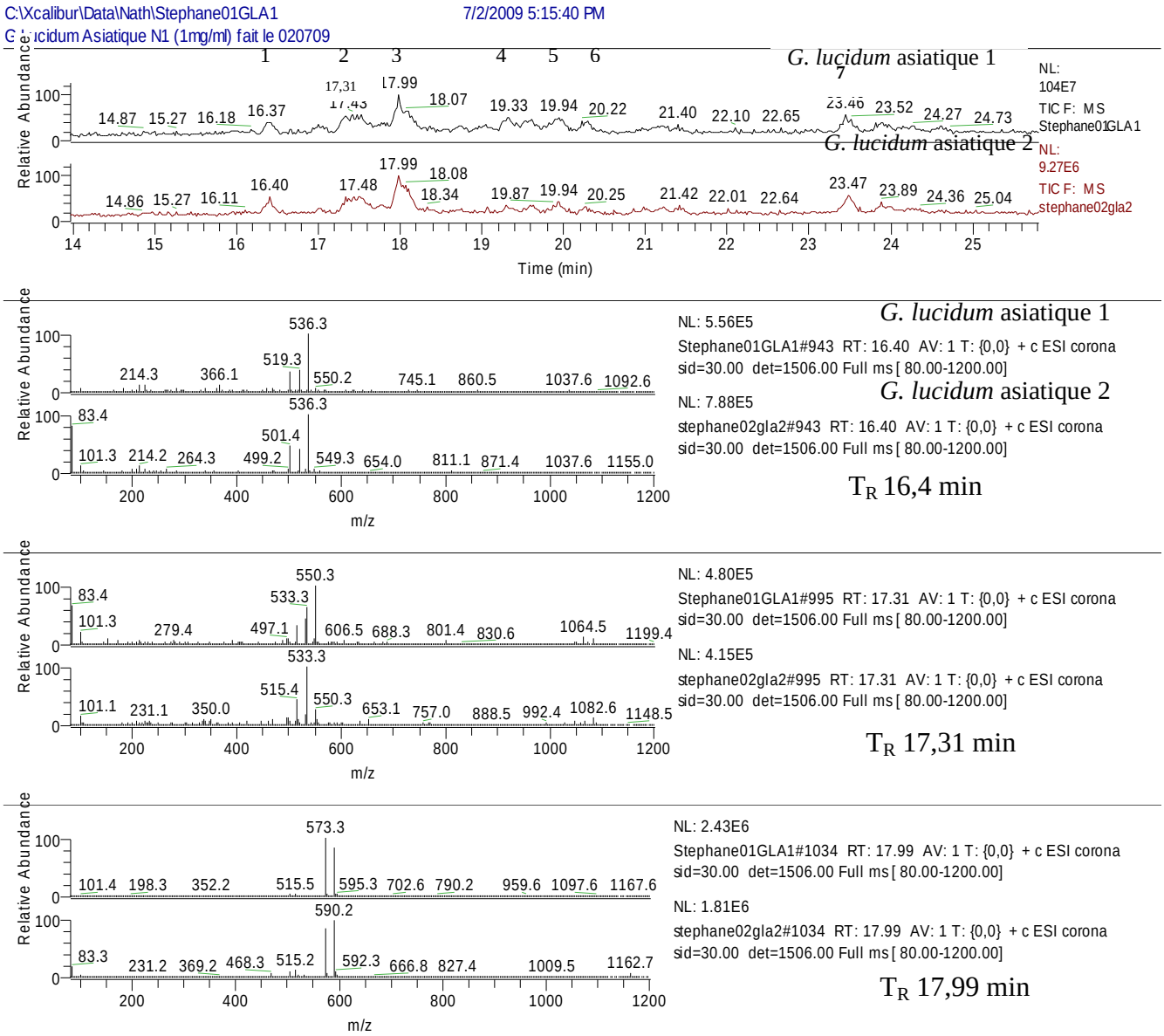


Figure 88 : comparaison des profils chromatographiques de masse et des spectres de masse des *G. lucidum* asiatique 1 et 2.

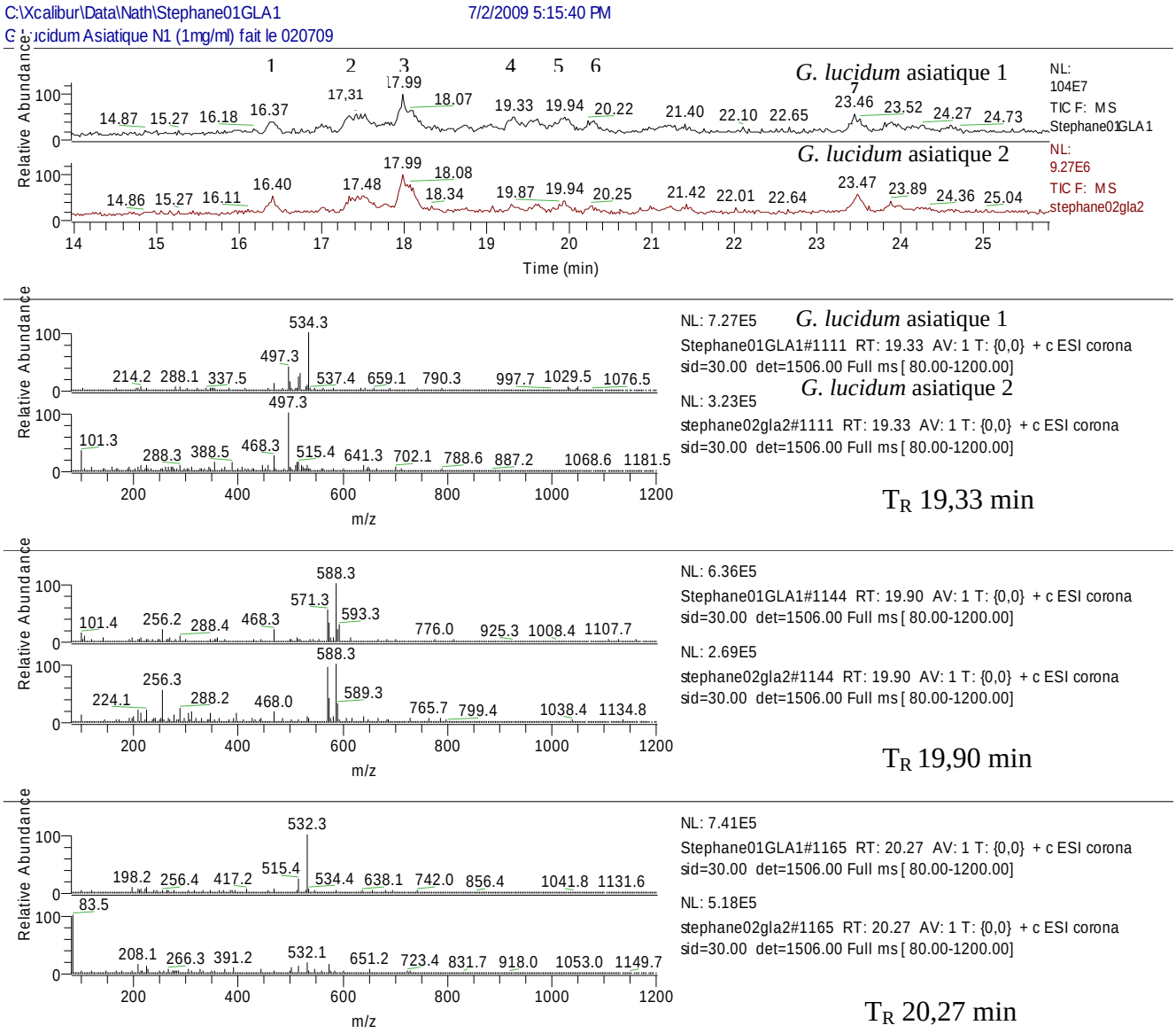


Figure 89 : comparaison des profils chromatographiques et des spectres de masse des *G. lucidum* asiatique 1 et 2.

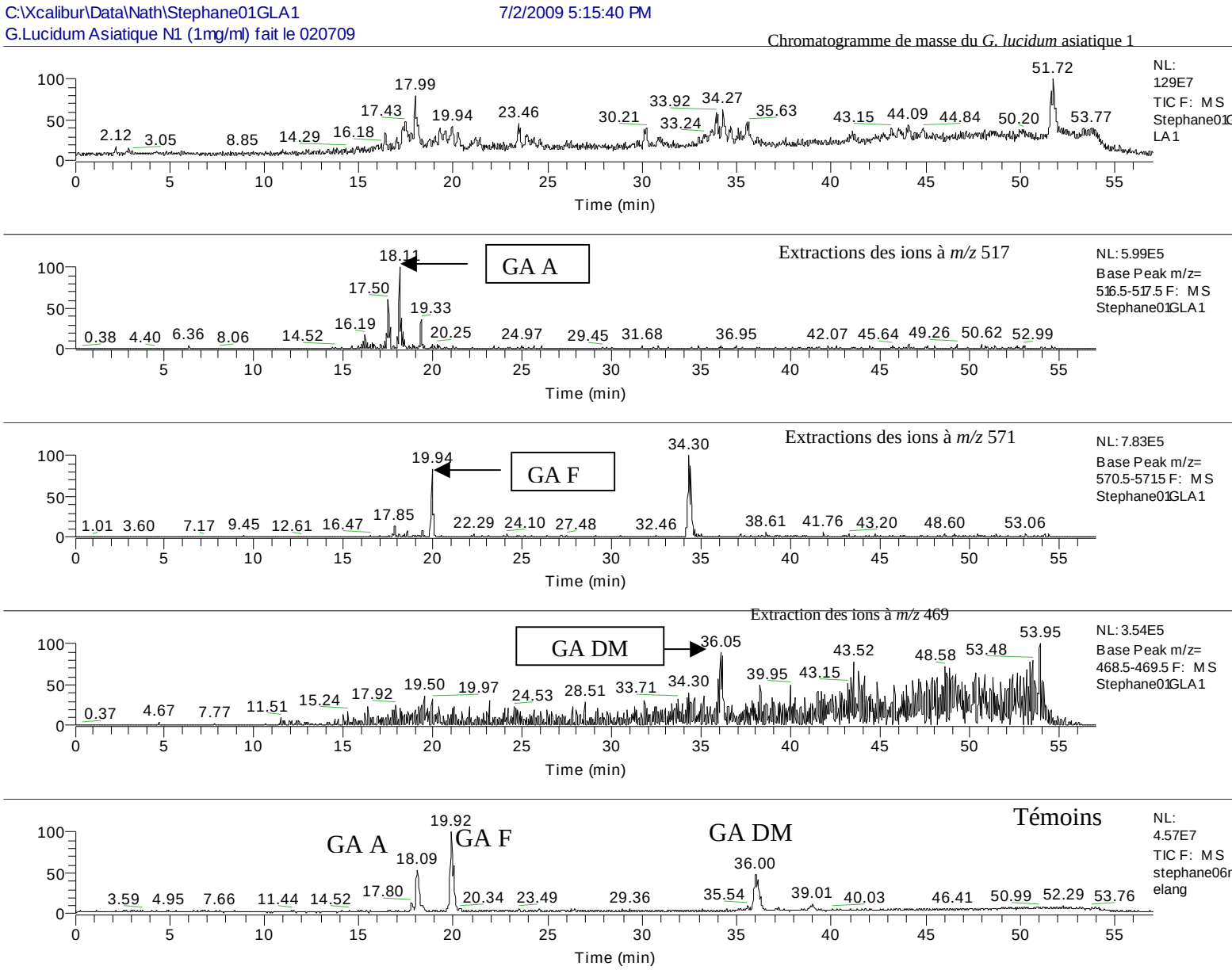


Figure 90 : filtration des ions de *m/z* identiques à ceux de GA A, GA F, et GA DM à partir du chromatogramme de masse du *G. lucidum* asiatique 1

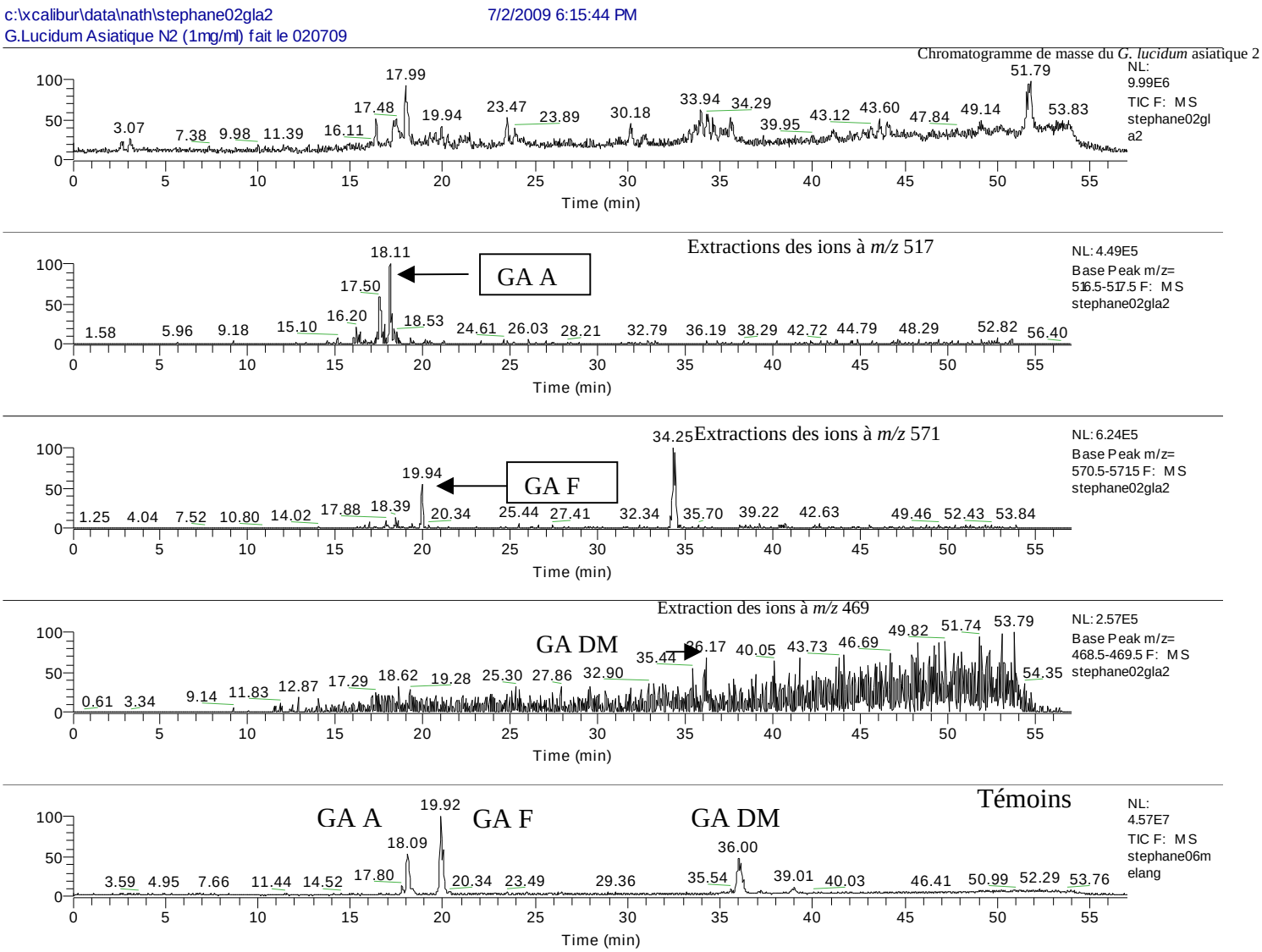


Figure 91: Extraction des ions de *m/z* identiques à ceux de GA A, GA F, et GA DM à partir du chromatogramme de masse du *G. lucidum* asiatique 2

Les deux spécimens asiatiques possèdent également, aux temps de rétention 23,46 et 30,21 min, deux autres composés en commun (pic 7 et 8) dont les *m/z* 301 $[M+H]^+$ et 305 $[M+H]^+$ ne coincident pas avec ceux des acides ganodériques.

Enfin, sur la partie peu résolutive du chromatogramme (t_R compris entre 51,46 et 51,93 min) le spectre de masse présente, pour les deux spécimens, un ion de forte intensité de *m/z* 282, suivi de trois autres ions d'intensité plus faible à *m/z* : 323, 468 et 563.

Discussion

A partir des observations morphologiques, les 2 spécimens appelés *G. lucidum* asiatique, ont été identifiés comme appartenant à la même espèce. Ainsi, sous réserve des résultats obtenus pour les spécimens européens, la superposition des profils chromatographiques de ces deux souches asiatiques, permettent de confirmer cette hypothèse.

b) Résultats obtenus par comparaison des 2 spécimens nommés *G. lucidum* européen

Les 2 extraits méthanoliques issus des *G. lucidum* européens ont été analysés sur la même période comprise entre 14 et 31 min et révèlent trois pics en commun (figure 92). Le premier à t_R 23,46 min, présente un ion à *m/z* 318 de forte intensité correspondant à $[M+NH_4]^+$ et un autre plus faible à 301 correspondant à $[M+H]^+$. Le deuxième pic à t_R 30,18 min, présente un ion de forte intensité à *m/z* 322 correspondant à $[M+NH_4]^+$ et deux autres d'intensité plus faible à *m/z* 327 et 305 correspondant respectivement à $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$. Ces deux composés de structure inconnue ont également été retrouvés chez le *G. lucidum* asiatique (figure 92 et 93). Enfin le 3ème pic à t_R 34,27 min révèle un seul et unique ion à *m/z* 570 correspondant à $[M+H]^+$. Les deux profils sont relativement similaires excepté la présence de trois pics pour le 1er spécimen aux t_R compris entre 17,85 et 18,25 min.

Discussion

En premier lieu, nous pouvons constater que les profils chromatographiques des deux spécimens européens sont relativement homogènes.

En second lieu, les deux extraits méthanoliques du *G. lucidum* européen présentent un profil chromatographique différent de ceux présentés par les spécimens asiatiques. Il semble, de plus, qu'ils soient moins riches en composés, contrairement à ce qui a été démontré en CCM.

Nous ajouterons que les masses obtenues aux temps de rétention sélectionnés (entre 14 et 31 min) ne correspondent pas à celles des acides ganodériques. De même, l'extraction des ions

de *m/z* 517, 571 et 469 n'a pas permis de révéler la présence des composés GA A, GA F et GA DM. Seul l'ion à *m/z* 570 et de t_R 34,27 min pourrait concorder avec ce type de composé.

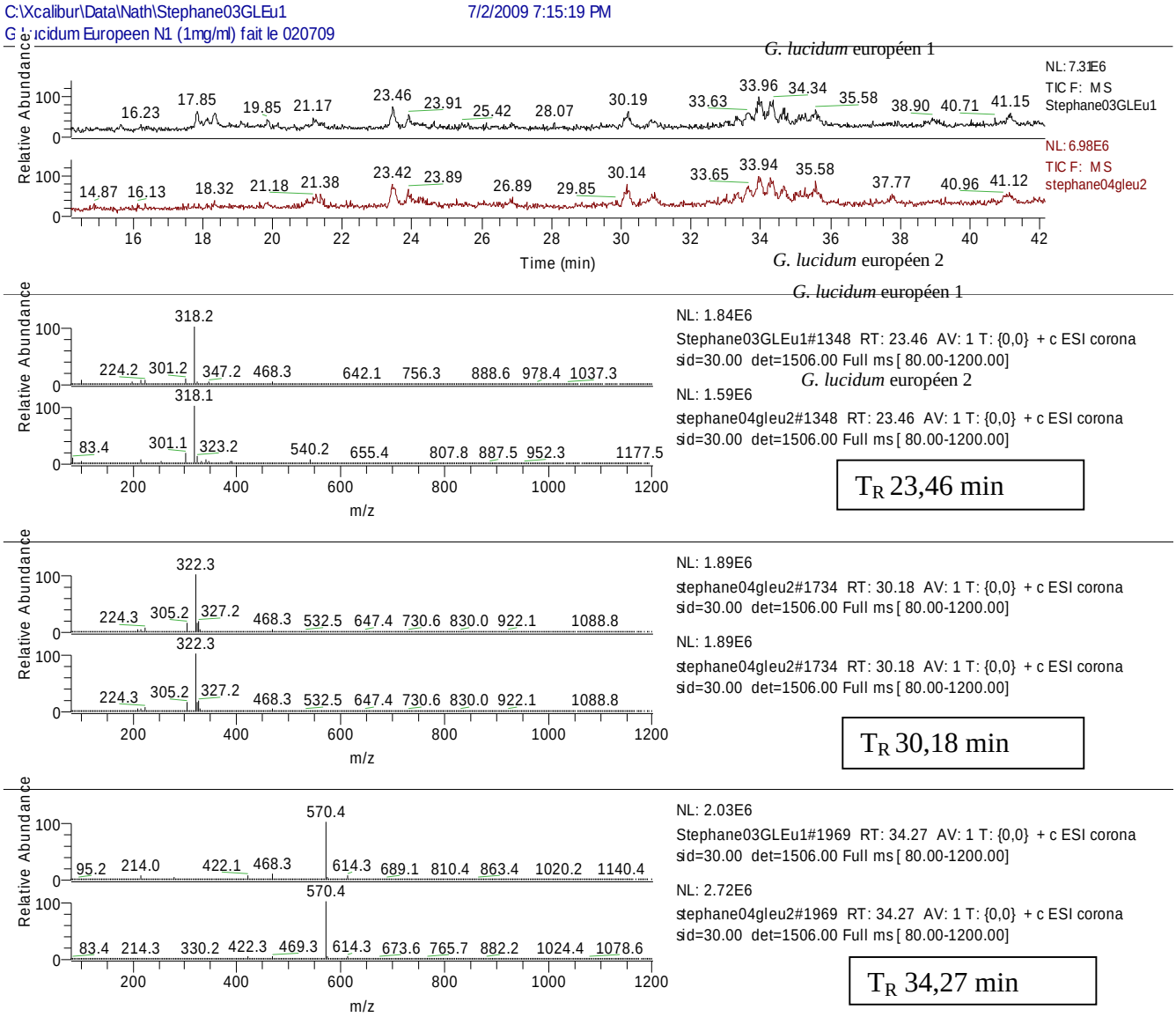


Figure 92 : spectre de masse de *G. lucidum* européen au temps de rétention 23,46 et 30,18 min

c) Comparaison des profils chromatographiques des *G. lucidum* asiatique, européen et du *G. tuberculosum*

c-1) Choix du mode opératoire

Le gradient d'élution utilisé dans ce travail est valide puisqu'il permet de distinguer aisément, sur les chromatogrammes, les composés sortant de la colonne, en particulier GA A et GA F, riches en fonction carbonyle ou hydroxyle.

c-2) Discussion

Tout d'abord, GA A, GA F et éventuellement GA DM n'ont été retrouvés que sur les extraits issus des deux *G. lucidum* asiatiques.

Concernant les spécimens correspondant au *G. lucidum sensu stricto,* aucun des témoins utilisés n'a été retrouvé. De plus, sur les chromatogrammes, nous n'obtenons qu'un seul pic d'absorption dont le spectre de masse pourrait éventuellement correspondre à un acide ganodérique.

Enfin, les espèces européennes et asiatiques présentent au temps de rétention 23,46 min et 30,21 min deux composés similaires de masse respective égale à 300 et 304 $g.mol^{-1}$. Toutefois, ces masses ne correspondent pas à celle des acides ganodériques (figure 93)

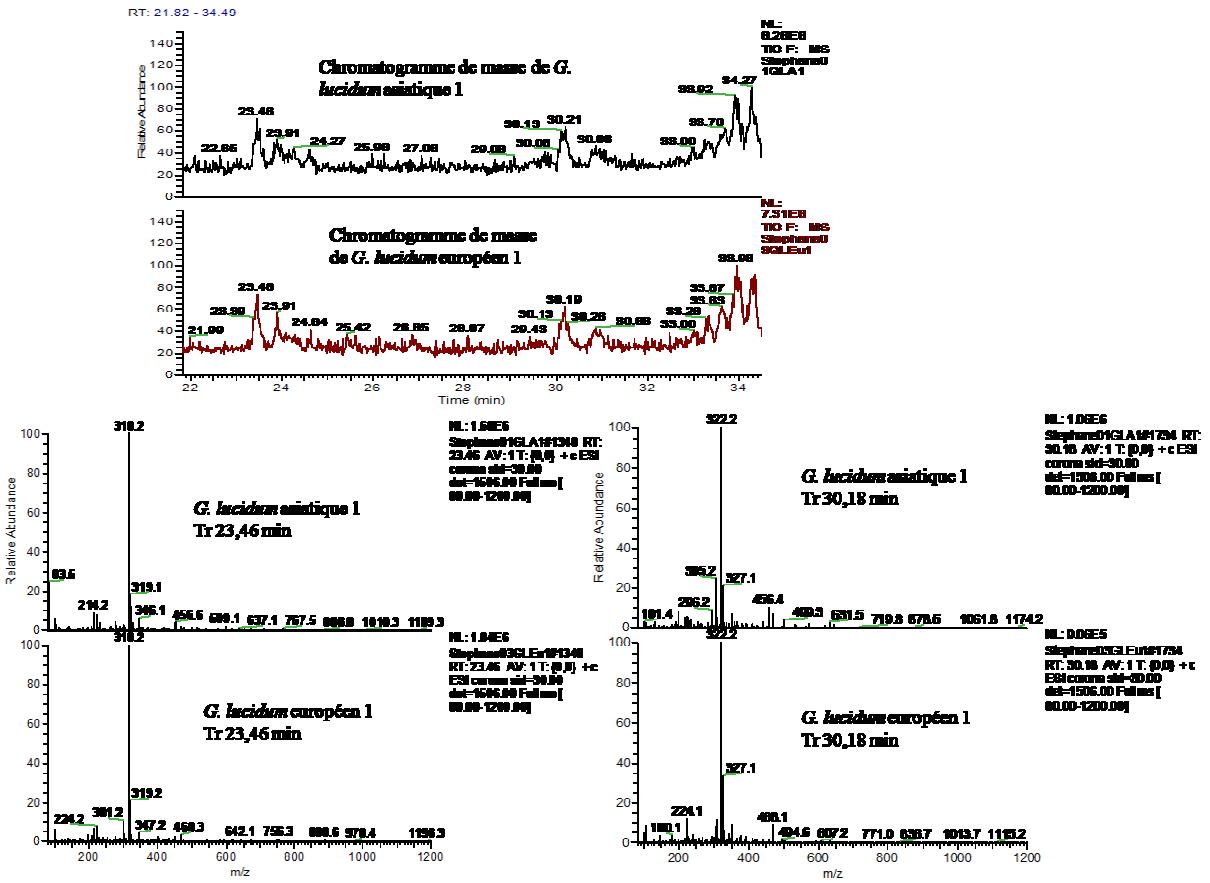


Figure 93 : Comparaison des spectres de masse de *G. lucidum* asiatique et européen au temps de t_R 23,46 et 30,18 min

Ainsi, l'espèce auquelle se réfèrent les nombreuses publications axées sur la recherche de substances bioactives, en particulier les acides ganodériques, correspondrait plutôt à nos spécimens *G. lucidum* asiatique 1 et 2 qu'aux spécimens *G. lucidum* européen 1 et 2

Ensuite, les profils chromatographiques obtenus par LC-MS sont relativement homogènes entre les spécimens d'une même espèce, mais complètement différents entre l'espèce asiatique et l'espèce européenne.

Nous pouvons donc conclure que l'analyse en LC-MS permet d'aboutir au même résultat obtenu par séquençage des ITS 1 et 2 selon lequelle les spécimens européen et asiatique désignés sous le nom de *G. lucidum* sont des espèces différentes (Moncalvo *et al.*, 1995 ; Hseu *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2009). Le fait que l'espèce européenne corresponde au *G.*

lucidum sensu stricto suggère que le nom *G. lucidum* employé pour désigner les spécimens utilisés traditionnellement en Asie est incorrect.

Enfin, nous avons constaté que l'espèce *G. tuberculosum*, d'une part ne contenait pas ou en faible quantité (et dans ce cas non décelable en LC-MS), les témoins GA A, GA F et GA DM, et d'autre part qu'elle possédait, en forte proportion, un autre acide ganodérique de masse moléculaire 532 $g.mol^{-1}$correspondant à GA B hydroxylé sur la chaîne latérale, non décelé dans les spécimens asiatiques [*l'ion à m/z 533 obtenu pour les deux G. lucidum asiatique possède un temps de rétention (17,31 min) différent de celui de l'acide ganodérique majeur retrouvé chez sur G. tuberculosum (15,16 min)*].

La première hypothèse serait donc qu'il existe au niveau des acides ganodériques, ou autres triterpènes de type lanostane, une différence qualitative entre les espèces du genre *Ganoderma.* Ainsi, ces composés constitueraient, dans ce travail et comme cela a déjà été démontré auparavent (Su *et al*., 2001 ; Wang *et al*., 2006 ; Chen *et al.*, 2008 ; Fu *et al.*, 2008), de bons indicateurs taxinomiques pour les *Ganodermataceae*.

6) Confrontation des résultats obtenus par LC-MS avec la bibliographie et les résultats de séquençage de l'UCL et de Moncalvo (1995)

Tout d'abord, le séquençage de plusieurs spécimens désignés sous le nom de *G. lucidum* a montré que ce complexe se scindait en deux clades bien distincts. Le premier comprend l'espèce européenne, le deuxième comporte au moins deux espèces différentes d'origine asiatique. Il a été démontré que la première espèce correspondait au *G. lucidum* indien, taïwanais et philippin, et que la deuxième espèce était le au *G. lucidum* chinois et japonais (Moncalvo *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2009) (figure 94).

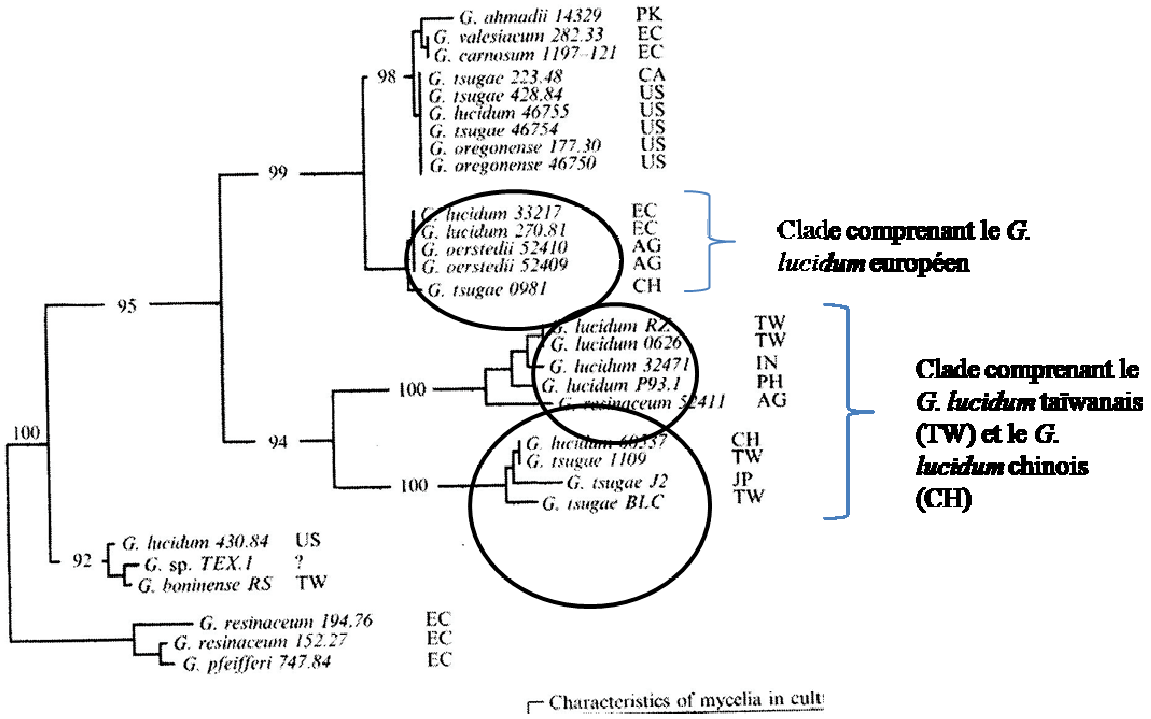


Figure 94 : Cladogramme de certaines espèces du genre *Ganoderma* (Moncalvo, 1995)

Après observations des caractères microscopiques des spécimens du premier groupe [piléocystides courtes (environ 20 µm), spores oblongues et finement échinulées], Wang *et al.* (2009) concluent que les *G. lucidum* indiens, taïwanais et philippins correspondent à l'holotype du *Ganoderma multipileum*.

Sur l'arbre phylogénique des Ganodermes de l'UCL (figure 95), nous constatons que *G. multipileum* (X87351, Smith & Sivasithamparan, 2000) est monophylétique avec les spécimens récoltés aux Antilles (SW55, SW44, SW49 et SW57) (figure 95, entouré en rouge).

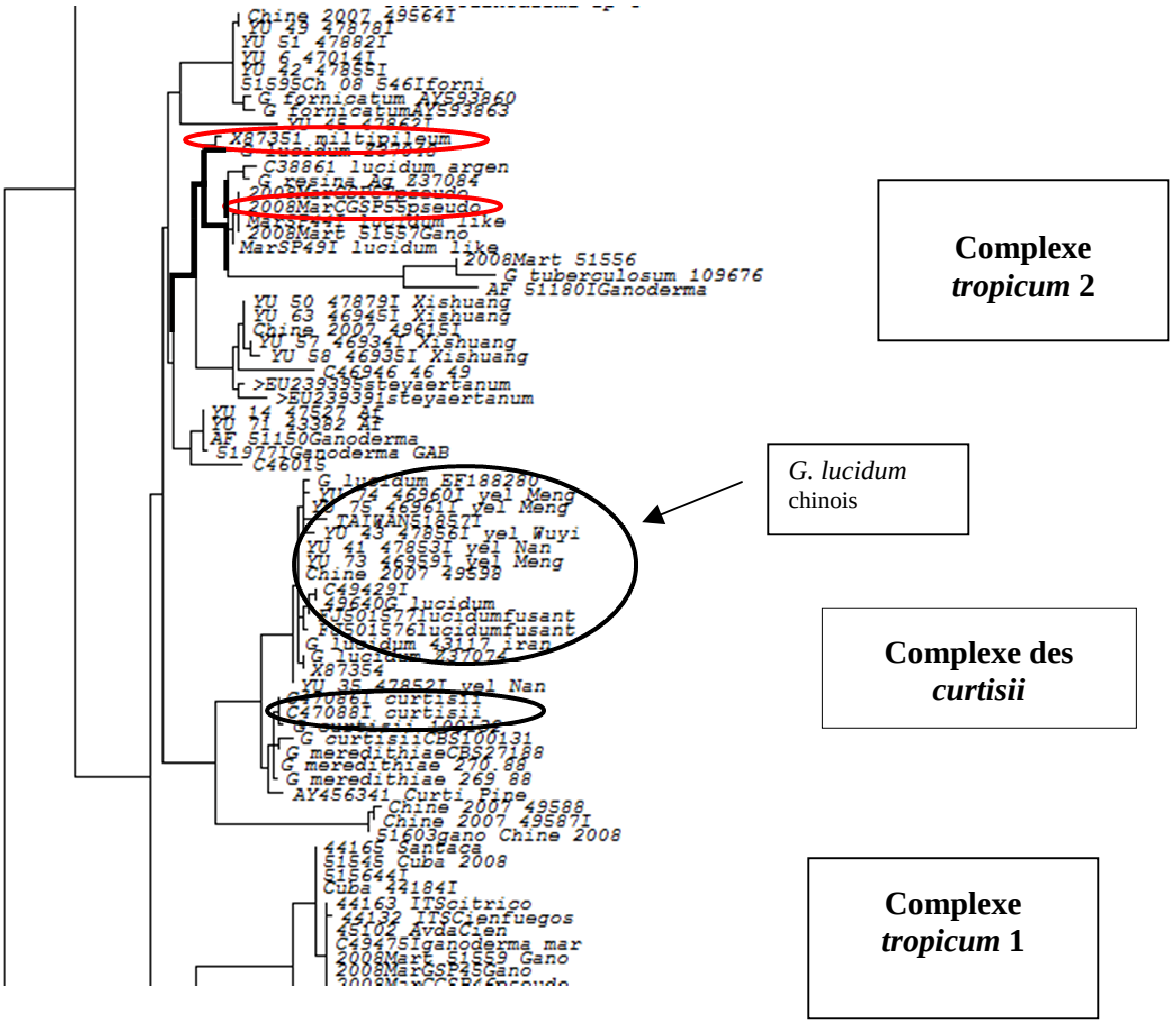


Figure 95 : une partie du cladogramme de différentes espèces du genre *Ganoderma* (Cony Decock, 2009)

De plus, si l'on compare la description de l'holotype correspondant à l'espèce *G. multipileum* faite par Wang *et al.*, (2009) avec celle de SW55, nous constatons également des analogies morphologiques entre les spécimens : spores oblongues, finement échinulées et cellules du revêtement courtes (figure 96 et 97).

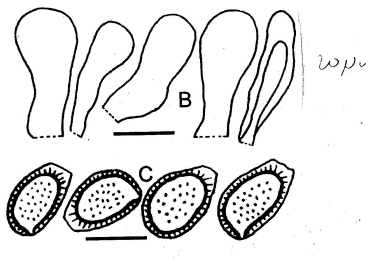


Figure 96 : basidiospores et piléocystides de *G. multipileum* (Wang *et al*., 2009)

1 Bar = 10 µm

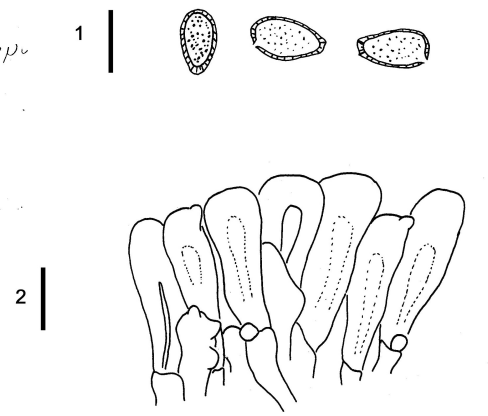


Figure 97 : Basidiospores et piléocystides de SW55 (*G. martinicense)*

1 Bar = 10 µm

Les traits morphologiques évoqués ci-dessus attestent donc d'une probable parenté entre les spécimens asiatiques correspondant au *G. multipileum* et les spécimens néotropicaux, ce qui est en corrélation avec leur position sur une même branche du cladogramme illustré.

Ensuite, les résultats de séquençage obtenus à l'UCL par Cony Decock (figure 95, entouré en noir) montrent que le deuxième groupe correspondant à l'espèce chinoise et japonaise est monophylétique avec le clade des *curtisii*. Wang *et al.* (2009) la distingue du *G. multipileum* par des spores dont les échinules sont plus épaisses et plus longues, un contexte plus pâle et par une surface porée jaunâtre (*comm. pers*. Cony Decock). Nos spécimens asiatiques, dont les caractéristiques morphologiques coïncident avec la description faite ci-dessus, correspondraient ainsi à cette espèce.

Les caractères morphologiques et génétiques attestent donc d'une dichotomie au sein du groupe des *G. lucidum* asiatiques. Toutefois, jusqu'à maintenant, aucun argument chimique n'a été utilisé pour distinguer ces deux espèces.

Or, nous savons, d'après la bibliographie et nos propres essais, que l'espèce chinoise contient majoritairement des acides ganodériques spécifiques non retrouvés chez le *G. lucidum*

européen et le *G. tuberculosum*. L'ensemble des articles étudiés, montre également la présence minoritaire d'acides lucidéniques au sein de cette espèce.

Poutant, il a été décrit récemment, sur une souche taïwanaise de *G. lucidum*, la présence d'acides lucidéniques en tant que composés majoritaires (LA A, LA B et LA C) (Weng *et al.*, 2007). De plus, Nishitoba *et al*. (1986) décrivent eux aussi une souche de forme ramifiée ('antlered'= forme d'andouillet ou stipe avec plusieurs chapeaux) contenant majoritairement les mêmes acides lucidéniques

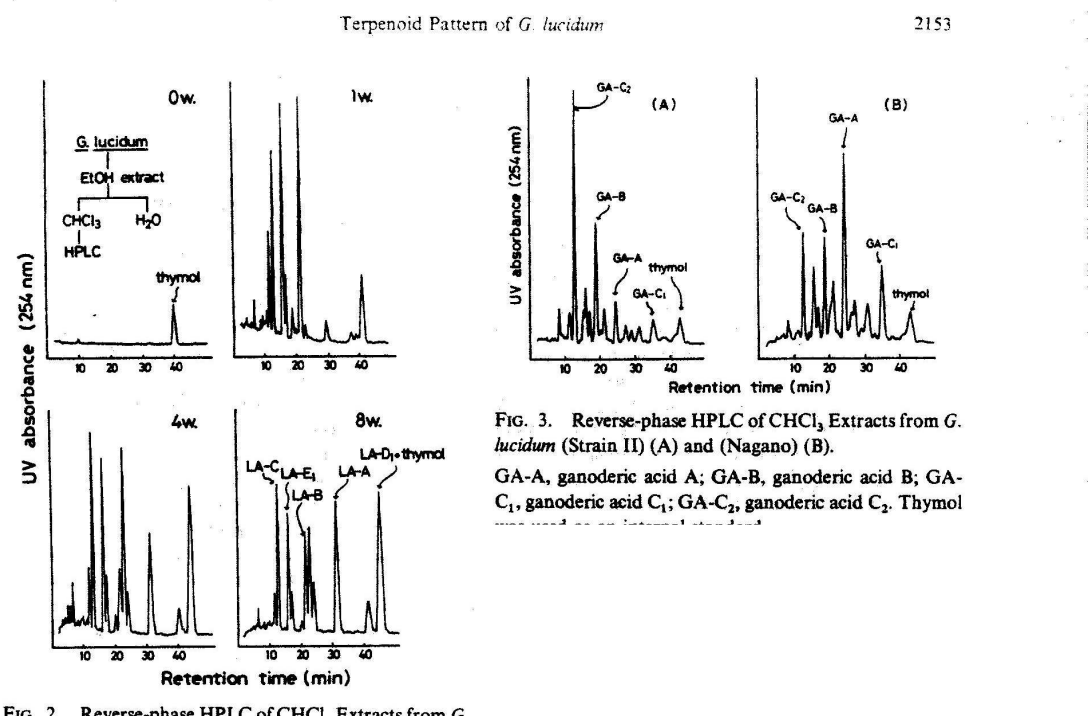


Figure 98 : Profil chromatographique des extraits chloroformiques des souches asiatiques I (à gauche) et II (à droite) désignées sous le nom de *G. lucidum* (Nishitoba, 1986). Le profil de gauche montre la présence majoritaire d'acides lucidéniques, tandis que celle de droite montre la présence majoritaire d'acides ganodériques.

Si nous suivons l'hypothèse selon laquelle les espèces du genre *Ganoderma* peuvent se différencier par la nature de leurs triterpènes, il est probable que l'espèce taïwanaise, indienne et des philippines correspondant à *G. multipileum* puisse correspondre à la souche produisant majoritairement des acides lucidéniques

Selon la même hypothèse, un autre spécimen taïwanais, désigné sous le nom de *G. tsugae* par Chen et Chen, (2002), devrait correspondre au *G. lucidum* chinois puisque celui-ci contient majoritairement les acides ganodériques A, B, C, D, E, C5, C6, G et D. De plus, les résultats de séquençage confirmeraient cette déduction puisque la souche chinoise (*G. lucidum*) et la souche taïwanaise (*G. tsugae*) se retrouvent sur la même branche de l'arbre phylogénique de Moncalvo *et al* (1995)

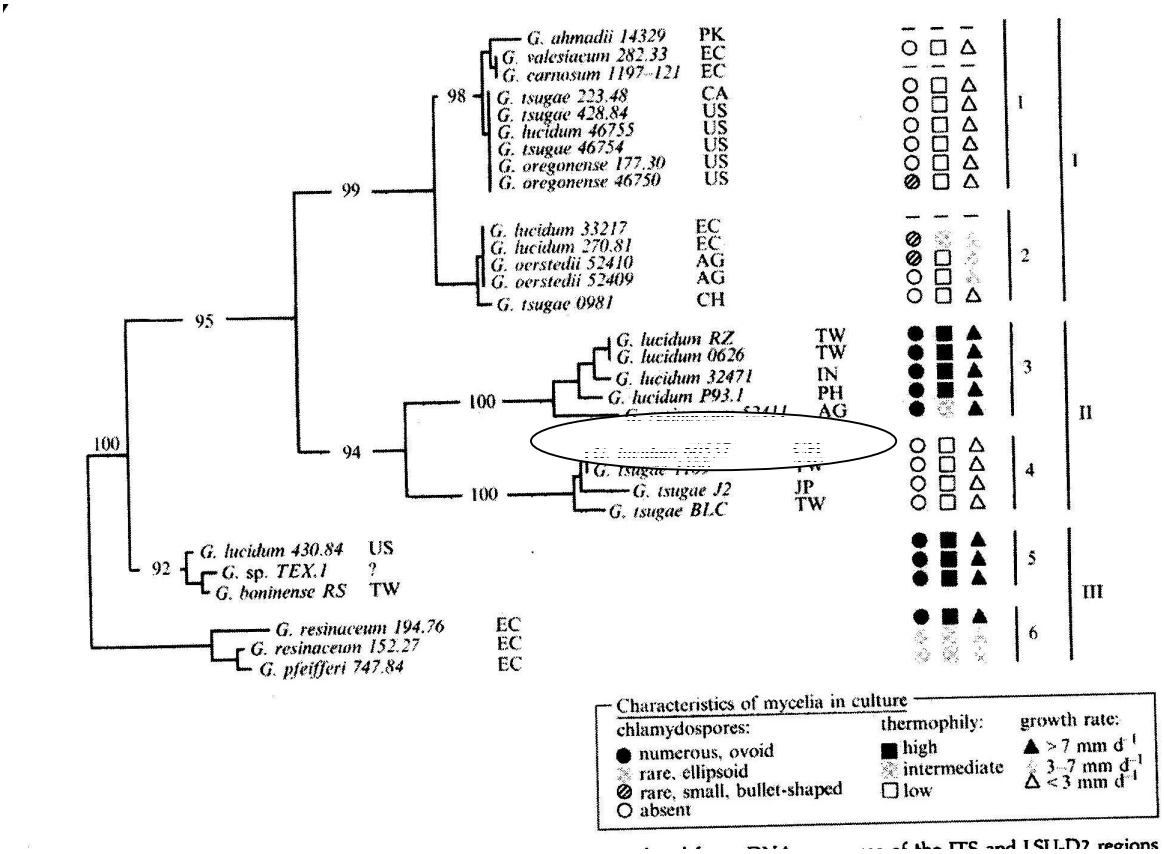


Figure 99 : Position des espèces désignées sous le nom de *G. lucidum* en Chine continental et sous le nom de G. tsugae sur l'île de Taïwan

Pour résumé, le *G. lucidum sensu stricto* est une espèce strictement européenne. Ce nom donné à certaines espèces asiatiques est donc mal appliqué. De plus, le *G. lucidum* européen contient très peu de triterpènes et *a priori* aucun acide ganodérique. *G. tsugae* est une espèce retrouvée uniquement dans l'hémisphère nord, dans les forêts de Pins ou de Sapins, et ne peut être retrouvée à Taïwan ou au Japon (Moncalvo *et al.*, 1995)

Le *G. lucidum* asiatique correspondrait à deux espèces différentes : celle de Chine, apparentée au *G.tsugae* de Taïwan, serait proche du groupe des *G. curtisii* et contient en majorité des acides ganodériques (Clade UCL et Moncalvo *et al.*, 1995 ; Moncalvo, 2000), celle de Taïwan

correspondrait à l'espèce *G.multipileum* et pourrait correspondre à la souche II décrite par Nishitoba (1985) produisant majoritairement des acides lucidéniques (Wang *et al.*, 2009).

7) Tentative d'identification des acides ganodériques de nos deux *G. lucidum* asiatiques.

En partant de l'hypothèse selon laquelle nos spécimens asiatiques correspondent au *G. lucidum* chinois et japonais (Moncalvo, 1995 ; Wang *et al.*, 2009), et que cette espèce possède majoritairement les acides ganodériques décrits dans la littérature, il suffit de comparer ou de superposer nos chromatogrammes avec ceux de la littérature, de manière à identifier nos composés.

Toutefois, lorque l'on consulte la bibliographie (Yang *et al.*, 2007 ; Fu *et al.*, 2008, Chen *et al.*,2008), les pics d'absorption, correspondant aux acides ganodériques, ont des temps de rétention plus élévés et plus espacés.

Ainsi, même si les solvants utilisés sont identiques aux notres (eau et acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique), le pouvoir éluant du gradient utilisé dans les travaux mentionnés ci dessus (30 à 32% d'acétonitrile en 40 minutes) est moins élévé que celui utlisé pour nos travaux (0 à 90 % d'acétonitrile en 45 min).

Nous avons, bien évidemment tenté, d'appliquer le même protocole d'élution préconisé par ces travaux antérieurs. Malheureusement, sur l'appareil utilisé, la diminution du pouvoir éluant du gradient à entraîner une perte d'intensité des pics et par conséquent une détection difficile.

Nous emettrons, alors, l'hypothèse que les concentrations croissantes d'ACN utilisées dans ce travail devraient permettre d'obtenir un ordre d'élution comparable à ceux des travaux antérieurs.

Dans ce contexte, nous avons tenté d'identifier et de déduire la structure de 6 composés correspondant aux 6 premiers pics des chromatogrammes de masse des spécimens asiatiques retrouvés entre les temps de rétention compris entre 14 et 21 mn :

- par l'analyse de leur spectre de masse en LC-MS,

- en comparant leur ordre d'élution ou de sortie de colonne C-18 RP (en mode gradient d'élution eau / ACN) par rapport à ceux de nos témoins et ceux obtenus dans la bibliographie.

Après ce laps de temps, les chromatogrammes de masse ne présentent que 2 pics d'absorption à 23,46 et 30,21 mn. Les composés correspondant à ces temps de rétention, de masse respective égale à 300 et 304 g.mol^{-1}, ne concordent pas avec les acides ganodériques. Au-delà de la 31ème mn, les pics observés n'étant pas suffisamment résolus, il est difficile de faire correspondre pour chaque pic, une masse significative. De plus, dans les travaux antérieurs, au gradient d'élution évoqué ci-dessus, GA F fait partie des acides ganodériques, carbonylé en C-15 et C-23, généralement élué en dernier sur une colonne de type RP-C18 (Yang, 2007 ; Weng, 2008).

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes uniquement concentrés sur la période 14 et 21 mn.

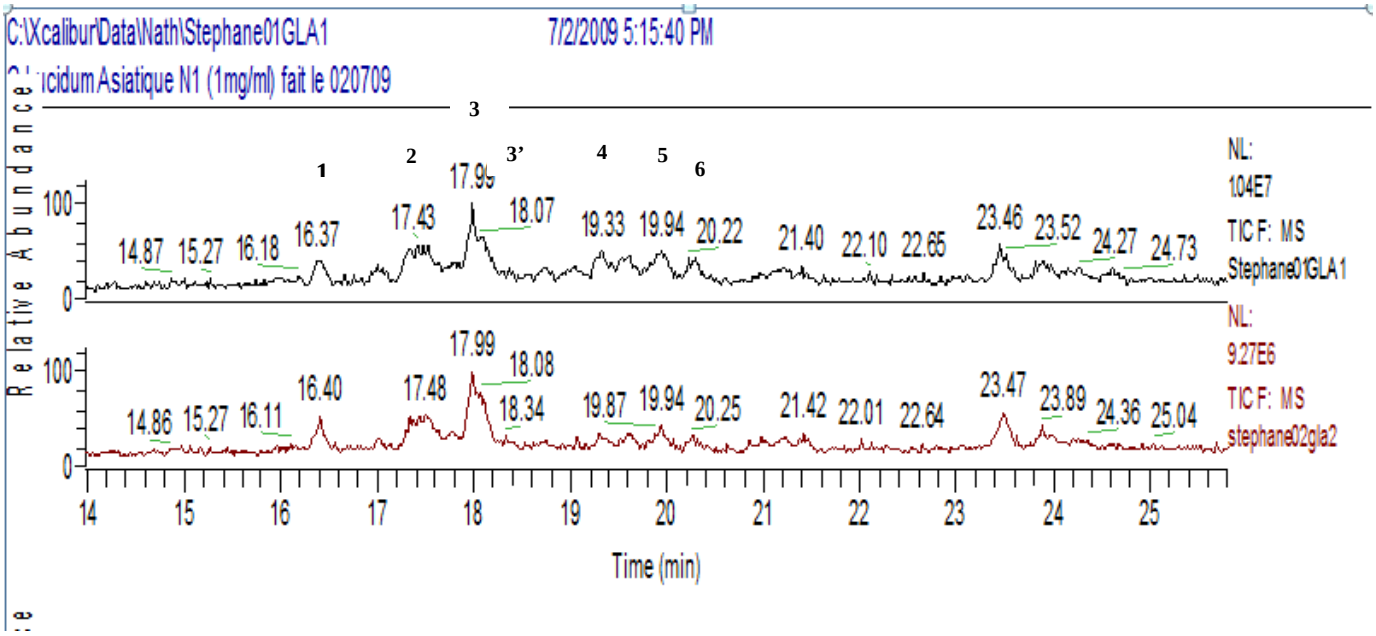


Figure 100 : Chromatogramme de masse des extraits des spécimens asiatiques désignés sous le nom de *G. lucidum*

Pic1 (tableau 7, figure 100) **:** entre les temps de rétention 14 et 21 min, le premier composé élué correspondrait vraisemblablement au GA C_2 (acide ganodérique de type I selon Yang *et al.*, 2007) par sa masse moléculaire 518 $g.mol^{-1}$ et la présence de l'ion $[M-H_2O+H]^+$. La perte d'une molécule d'eau en LC-ESI-MS mode négatif n'est pas caractéristique de ce type, toutefois notre témoin GA A, appartenant également au type I présente également sur le spectre de masse l'ion $[M-H_2O+H]^+$. De plus, ce composé est l'un des premiers acides ganodériques majoritaires à être élué dans les travaux de Yang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008.

Pic 2 (tableau 7, figure 100) : notre deuxième composé présente une masse égale à 532 $g.mol^{-1}$. Or, d'après la bibliographie, le seul acide ganodérique ayant une masse comparable et qui soit rapidement élué après GA C_2 est l'acide ganodérique G (acide ganodérique de type III) (Yang *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009). De plus, la perte d'une molécule d'eau est caractéristique des acides ganodériques appartenant à cette catégorie.

Pic 3 (tableau 7, figure 100) : le troisième composé, de masse égale à 572 $g.mol^{-1}$, est majoritaire et de temps de rétention proche de celui du témoin GA A. D'après la bibliographie (Yang *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2006), le composé majoritaire, de masse comparable, élué après GA C_2 et GA G, correspond à GA H. Sa structure est proche de GA F (témoin), et comme lui, GA H en ESI-MS mode positif ne perd pas de molécule d'eau. C'est la raison pour laquelle nous excluons l'acide ganodérénique K (type III ; MW = 572 $g.mol^{-1}$) pour lequel nous devrions obtenir de l'ion $[M-H_2O+H]^+$ à *m/z* 555. Sur les spectres UV et TIC de Yang *et al.* (2007), les pics correspondant à GA A et GA H ne sont pas résolus, tandis que sur les autres travaux cités ci-dessus, les temps de rétention entre ces deux composés sont très proches. Cette constatation constitue également un argument puisque sur notre chromatogramme **le pic 3'** correspondant à notre témoin GA A forme un épaulement avec le pic 3.

Le pic 4 (tableau 7, figure 100) correspondrait à l'acide ganodérique D, par sa masse (514 $g.mol^{-1}$), sa position sur le chromatogramme (élué après GA C_2, GA G, GA H et GA A ; Yang *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2006), et sa perte de H_2O (GA D de type III comme GA FWI). Une autre éventualité serait de considérer ce pic comme correspondant à l'acide lucidénique D. Toutefois, les acides lucidéniques en LC-ESI-MS se distinguent par l'absence de $[M-H_2O+H]^+$et par la perte de CH_3COOH, ce qui n'est pas le cas ici.

Le Pic 5 (tableau 7, figure 100) correspond à notre témoin GA F.

Le pic 6 (tableau 7, figure 100) correspondrait à l'acide ganodérique J, par sa masse (514 g.mol^{-1}), l'absence de l'ion $[M-H_2O+H]^+$caractéristique des acides ganodériques de type II (Yang *et al.*, 2007), et son élution situé après GA C_2, GA G, GA H et GA A, GA D; Wang *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ;).

Numéro des pics ou témoin	**Temps de rétention (en mn)**	***G. lucidum* asiatique *m/z***					
		Masse moléculaire	**$[M+NH_4]^+$**	**$[M+H]^+$,**	**$[M-H_2O+H]^+$**	**$[2M+H]^+$**	**identification**
1	**16,40**	**518**	**536**	**519**	**501**	**1037**	**GA C_2**
2	**17,31**	**532**	**550**	**533**	**515**	**1064,5**	**GA G**
3	**17,99**	**572**	**590**	**573**	***abs***		**GA H**
4	**19,33**	**514**		**515**	**497**	**1029**	**GA D**
5	**19,90**	**570**	**588**	**571**	***abs***		**GA F**
6	**20,27**	**514**	**532**	**515**	***abs***		**GA J**
GA A	**18,09**	**516**	**534**	**517**	**499**	**1033**	**témoin**
GA F	**19,92**	**570**	**588**	**571**	***abs***		**témoin**

Tableau 7 : Proposition de structure pour chaque pic retrouvé pour G. lucidum asiatique 1 et 2, au temps de rétention 14-21 mn.

E) Résultats obtenus par fractionnement de l'extrait *G. tuberculosum*

1) fractionnement de SW6

Dans un premier temps, nous avons fractionné l'extrait méthanolique SW6 en 5 parties différentes (voir partie expérimentale)

- **SW6.EP** : fraction théoriquement riche en composé fortement apolaire : ergostérol et acides gras saturé ou non

- **SW6.W, SW6.N** : fraction éventuellement riche en triterpènes neutre à légèrement basique

-**SW6.C**

- **SW6.A :** fraction théoriquement riche en acides ganodériques.

Après une CCM (Chloroforme-Méthanol 17:2) de ces différentes fractions, nous avons obtenu le résultat suivant (figure 100)

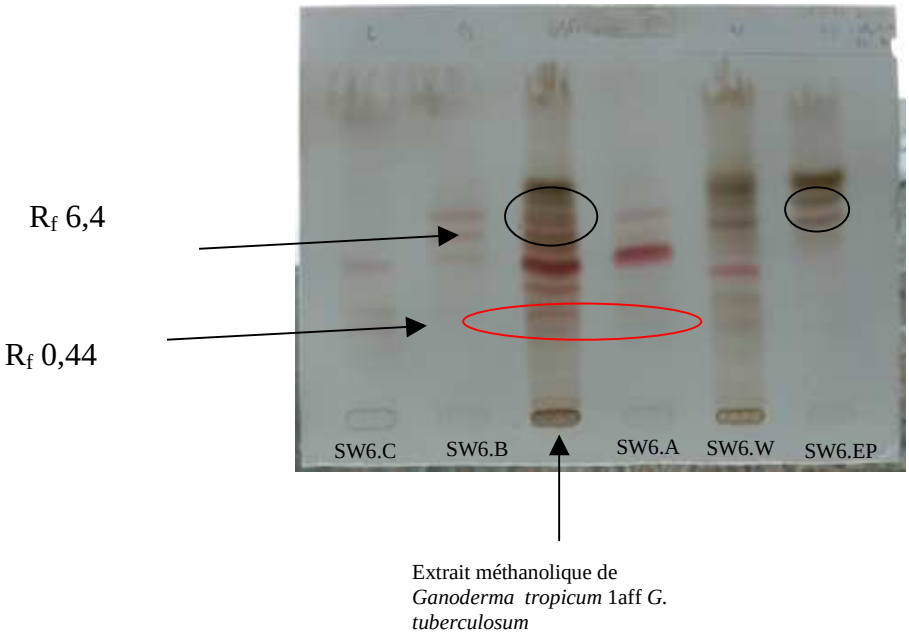


Figure 101 : Comparaison des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait SW6 correspondant à *G. tuberculosum* sur CCM

Nous constatons, tout d'abord, que les deux composés majoritaires de notre extrait brut ont été séparés. Nous retrouvons, effectivement, sur la fraction SW6.A, une zone colorée rouge orangé de R_f 0,44 (résultats obtenu précédemment pour SW6 : R_f 0,38-0,4 ; composé entouré en rouge (figure 101). Ce spot majoritaire devrait correspondre, de par le mode de fractionnement utilisé et de par sa coloration, à l'acide ganodérique B hydroxylé sur sa chaîne latérale fixée en C-17. Le deuxième composé majoritaire (de R_f 0,64) est retrouvé sur la fraction SW6.EP. Il correspondrait, d'après les CCM effectuées et la bibliographie, à l'ergostérol (Domínguez *et al.*, 1972 ; Kohda *et al.*, 1984 ; Yuan *et al.*, 2007).

Test des fractions sur PC3.

Fraction testée	Rendement en %	% d'inhibition à 50µg/ml
SW6.A	0,99	5
SW6.B	0,49	3
SW6.C	1,48	12
SW6.W	8,297	11
SW6.EP	0,36	**28**

Tableau 8 : résultats d'inhibition de prolifération sur PC-3 des différentes fractions issus de SW6

Il apparaît dans ce tableau (8) que le ou les éléments actifs de l'extrait *SW6 (G. tuberculosum)* se situeraient dans la fraction la plus apolaire avec un résultat d'inhibition égal à 28 % pour une concentration de 50µg.mL^{-1}

A ce moment précis de notre travail, la quantité restante du spécimen SW6 (20g de matière sèche) (récolté en Martinique, 12/06), ne nous a pas permis d'exploiter d'avantage cet extrait. SW45 récolté en grande quantié l'année d'après, a donné des résultats d'inhibition de prolifération sur PC-3 identique à SW6. De plus, les résultats de séquençage ont montré que ces deux spécimens appartenaient au même clade. Nous avons pu, ainsi, poursuivre nos recherches sur cette espèce.

2) Fractionnement de l'extrait méthanolique SW45 (*G. tuberculosum)*

Le procédé utilisé pour le fractionnement est similaire à celui utilisé pour SW6 et figure dans la partie expérimentale. Trois fractions importantes ont été ainsi obtenues : SW45.EP ; SW45.GAp et SW45.GA. Les 2 premières ont ensuite été refractionnées par chromatographie sur colonne de silice, tandis que la 3ème par CLHP semi-préparative.

a) Fractionnement de SW45.EP

La fraction SW45.EP a été obtenue dans les mêmes conditions que SW6.EP. Cette fraction a ensuite été refractionné par 'flash chromatographie' (voir partie expérimentale) en 7 partie : FI, FII , FIII, FIV, FV, FVI, FVII (figure 102)

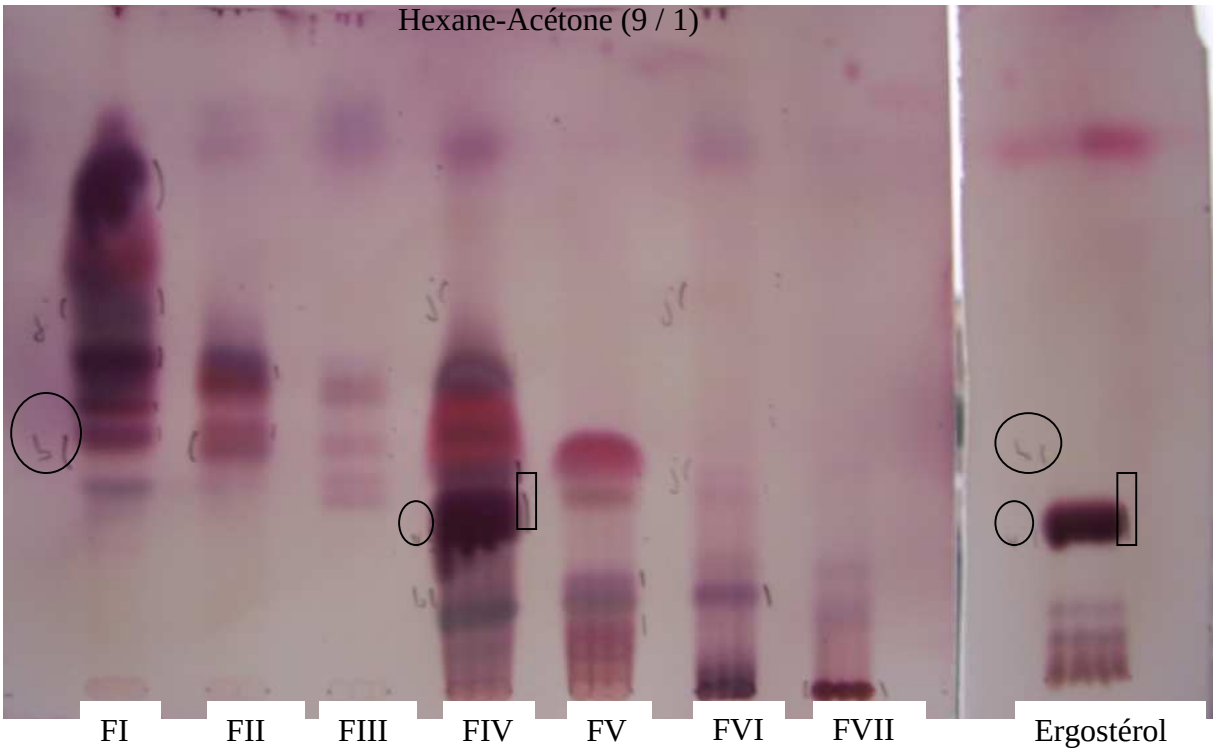


Figure 102 : profil CCM des différentes fractions issues de SW45.EP

Les cercles correspondent au zone de migration visible sous lampe UV à 366 nm, tandis que les rectangles, au zone de migration visible à 254 nm. FI et FIV sont les fractions pour lesquelles nous avons obtenu les masses les plus importantes (327 et 633 mg respectivement). La fraction IV possède une zone de migration visible à 254 nm qui se colore en brun vineux

après vaporisation d'anisaldéhydes sulfurique. Son R_f est compris entre 0,22-0,28. Elle semble correspondre avec celle de l'ergostérol (témoin). La fraction IV possède, de plus, une deuxième zone de migration de coloration violette à 366 nm et de R_f 0,19, que l'on retrouve également sur le profil chromatographique du témoin.

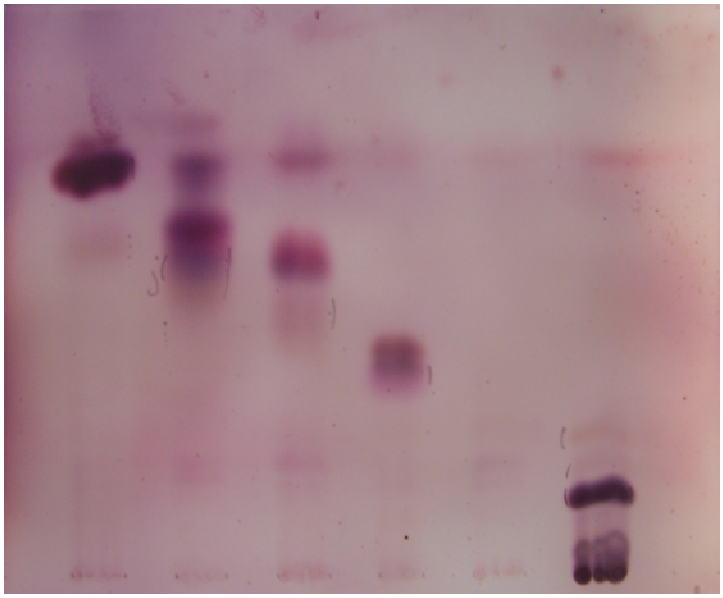
En ce qui concerne la fraction I, elle possède plusieurs zones de migration visible à 254 nm qui se colore en violet ou brun vineux après vaporisation d'anisaldéhydes sulphurique. Elle présente également une zone de migration visible à 366 nm (entouré en noir sur la figure 102) que l'on retrouve chez le témoin.

La présence d'ergostérol dans SW45.EP est confirmée ici. Les zones de fluorescence visible à 366 nm retrouvée dans les fractions FI et FIV et le témoin devraient correspondre à des composés de dégradation ou d'oxydation de l'ergostérol.

b) Fractionnement de FI' issus de SW45.EP (figure 103)

Les fractions FI et FII ont été réunis pour former FI'. La fraction **FrI'** a été fractionnée par chromatographie sur colonne de silice (30g) (voir partie expérimentale). Six fractions ont été obtenues (de **FrI'_A à FrI'_F**) de poids respectifs : 244, 23, 10, 15, 24, et 20 mg. La fraction FrI'_A a été fractionnée sur CCE par l'éluant Hexane-Acétone (9 : 1) pour donner 5 fractions (de **FrI'_{A-1} à FrI'_{A-5}**) de poids respectifs : 74, 116, 44, 10 et 0.1 mg.

Hexane-Acétone (9/1)



FrI'A1 FrI'A2 FrI'A3 FrI'A4 FrI'A5 ergostérol

Figure 103 : contrôle par CCM de la pureté des fractions FrI'$_{A-1}$ à FrI'$_{A-5}$

La fraction FrI'A-1 ne possède qu'une seule zone de migration. Son degré de pureté ainsi que le ou les poids moléculaires des composés présents ont été analysée en LC-MS. Le résultat obtenu sur le chromatogramme n'a révélé aucun composé significatif tant sur le plan de l'analyse UV que sur le plan du chromatogramme de masse. Les autres fractions n'ont rien données également.

La mauvaise solubilité des composés très apolaires dans le méthanol pourrait expliquer l'absence de signal significatif sur le chromatogramme. Il en résulterait une mauvaise ionisation des composés par l'électrospray et par conséquent une absence d'enregistrement par le lecteur de masse. Le même phénomène a été constaté avec l'ergostérol qui nous a servis ici de témoin.

c) Analyse de SW45GAp en LC-MS et Fractionnement (figure 104)

SW45GAp correspond au précipité obtenu après acidification de la solution alcaline contenant les acides ganodériques ionisés (voir partie expériementale). Cette fraction a été analysée en LC-MS et son spectre a été comparé avec celui de l'extrait.

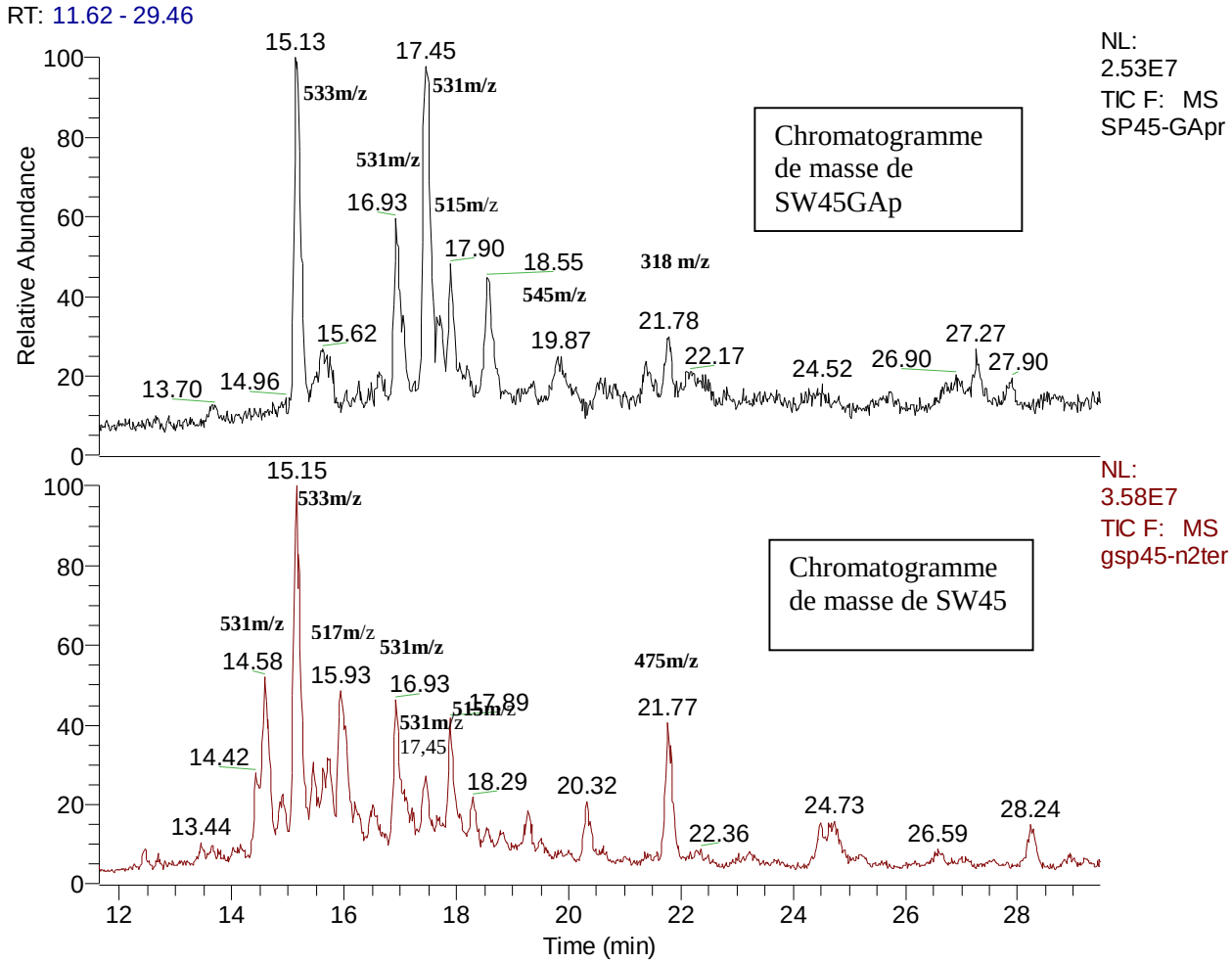


Figure 104 : Comparaison des profils chromatographiques de SW45 et SW45GAp

Pour les temps de rétention compris entre 12 et 22 min, les pics au t_R 14,58 min correspondant à $[M+H]^+$ *m/z* 531 et t_R 15,93 min correspondant à $[M+H]^+$ *m/z* 517 de SW45 ne sont pas retrouvés dans la fraction SW45GAp.

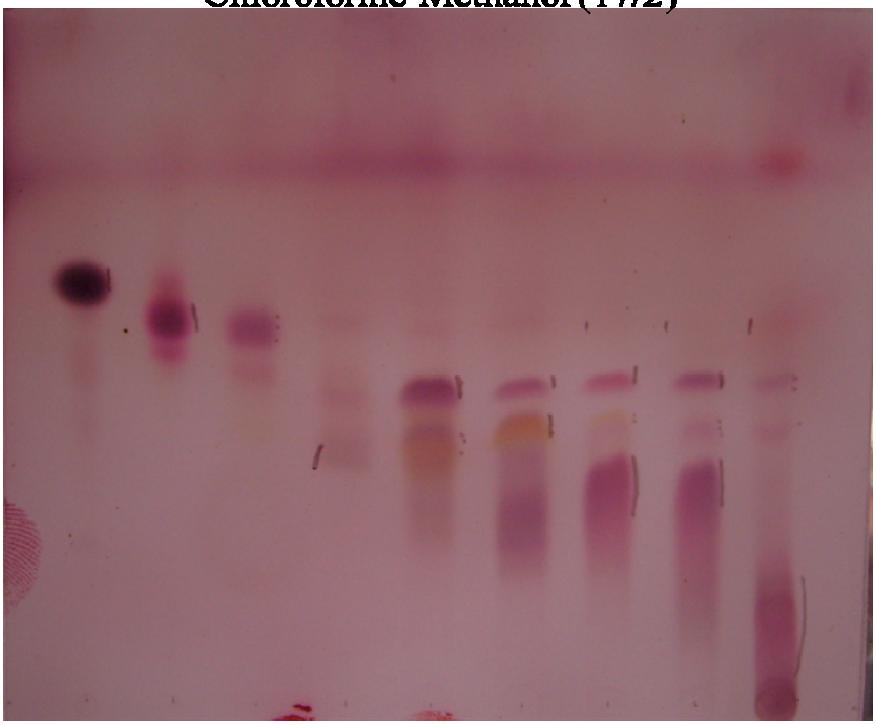
Le pic obtenu pour SW45 à t_R 21,77 min est fortement atténué pour SW45GAp (t_R 21,78 min). De plus, le spectre de masse correspondant au t_R 21,78 min ne correspond pas du tout à celui retrouvé pour l'extrait ($[M+H]^+$ *m/z* 475 *vs* 318 pour la fraction SW45GAp).

En revanche, le pic majoritaire correspondant à $[M+H]^+$ *m/z* 533 au t_R 15,15 min de l'extrait brut est retrouvé sur la fraction à t_R 15,13 min ainsi que les pics à t_R 16,93 et 17,89 min (correspondant à $[M+H]^+$de *m/z* respectifs 531 et 515). Le pic minoritaire de SW45 à t_R 17,45

min correspondant à $[M+H]^+$ *m/z* 531 devient majoritaire pour SW45GAp. Un nouveau pic, minoritaire, apparaît à 19,87 min à *m/z* 545

Ensuite, SW45GAp a été fractionnée par chromatographie sur colonne de silice (figure 105). Des mélanges de polarité croissante (Méthanol-Chloroforme) ont été utilisés pour l'élution des composés. (Voir partie expérimentale). 8 sous fractions ont ainsi été obtenues : GA_I ; GA_{II} ; GA_{III} ; GA_{IV} ; GA_V ; GA_{VI} ; GA_{VII} ; GA_{VIII}. Ces fractions ont été analysées par LC-ESI-MS.

Chloroforme-Methanol (17/2)



Ergostérol	GAI	GAII	GAIII	GAIV	GAV	GAVI	GAVII	GAVIII
Masse de la fraction	23 mg	13 mg	2 mg	23 mg	16 mg	25 mg	21 mg	75 mg
[M+H]+ retrouvés dans les	515 (17,52)			531 (17,00)	531 (17,00)	533 (15,15)		

Masse de la fraction en mg	**23**	**13**	**2**	**23**	**16**	**25**	**21**	**75**
[M+H]+retrouvés dans les fractions en m/z.(temps de rétention en min	**515 (17,52)**	**n.d**	**n.d**	**531 (17,05)**	**531 (17,05)**	**533 (15,15)**	**n.d**	**n.d**
	515 (17,95)	**n.d**	**n.d**	**531 (17,48)**	**531 (17,48)**		**n.d**	**n.d**
	545 (19,88)							

Figure 105 : sous fractions GA_I à GA_{VIII} sur CCM et leur principaux pics obtenus en LC-MS. Seul les pics majoritaires ont été inclus dans ce tableau. Les fractions GAII, III, VII et VIII n'ont pas été analysées en LC-MS

Les deux composés à *m/z* 515 $[M+H]^+$ de la fraction GA_I perdent facilement une molécule d'eau pour donner $[M-H_2O+H]^+$ à *m/z* 497, de la même manière que le composé majoritaire à *m/z* 533 de la fraction GA_{VI} et GA_{VII} et le composé à *m/z* 531 de t_R 17,48 min retrouvés dans les fractions GA_{IV} et GA_V. En revanche les composés à *m/z* 545 de GA_I et *m/z* 531 de t_R 17,05 min des fractions GA_{IV} et GA_V ne perdent pas de molécules d'eau sur les spectres.

Le composé majoritaire à *m/z* 533 est retrouvé sur les fractions GA_{VI} et GA_{VII}. Son Rf s'étale entre 0,32-0,37 ce qui correspond à la zone de migration majoritaire de couleur rouge orangé obtenu pour SW45.

Les fractions GA_{VI} et GA_{VII} ont été réunies afin d'augmenter les quantités d'extrait fractionner contenant le produit majoritaire. Une CCE de la fraction GA_{VI-VII} a été réalisée afin d'isoler le composé majoritaire de masse moléculaire 532 $g.mol^{-1}$. La fraction purifiée obtenue n'a malheureusement pu être exploitée d'avantage de part le faible poids obtenu et son manque de pureté (54%) analysée par LC-MS[4].

d) Analyse de SW45GA en LC-MS

Cette fraction provient de la solution alcaline, acidifiée à pH=3-4, et contient les composés acides n'ayant pas précipité (voir partie expérimentale). Les triterpènes acides résiduels ont été extraits par une séparation liquide-liquide avec du chloroforme dans une ampoule à décanter. Le poids obtenu de la fraction sèche est de 392 mg.

La fraction a été analysée par LC-MS en mode positif. Celle-ci a montré qu'elle contenait en très gande majorité un composé dont le temps de rétention ainsi que le poids moléculaire sont similaires à ceux obtenu pour le composé majoritaire de SW45 (figure 106)

La longueur d'absorption λ est de 256 nm et la pureté de ce composé obtenu en LC-MS est de 64%.

---

[4] La méthode de purification par CCE par le solvant Chloroforme-Méthanol (17 :2) n'a pas été convaincante du fait d'une mauvaise séparartion des composés en mode préparatif

Plusieurs précipitations successives à l'éther de pétrole de cette fraction, préalablement solubilisée dans un minimum de dichlorométhane, a permis d'augmenter sa pureté jusqu'à 70%.

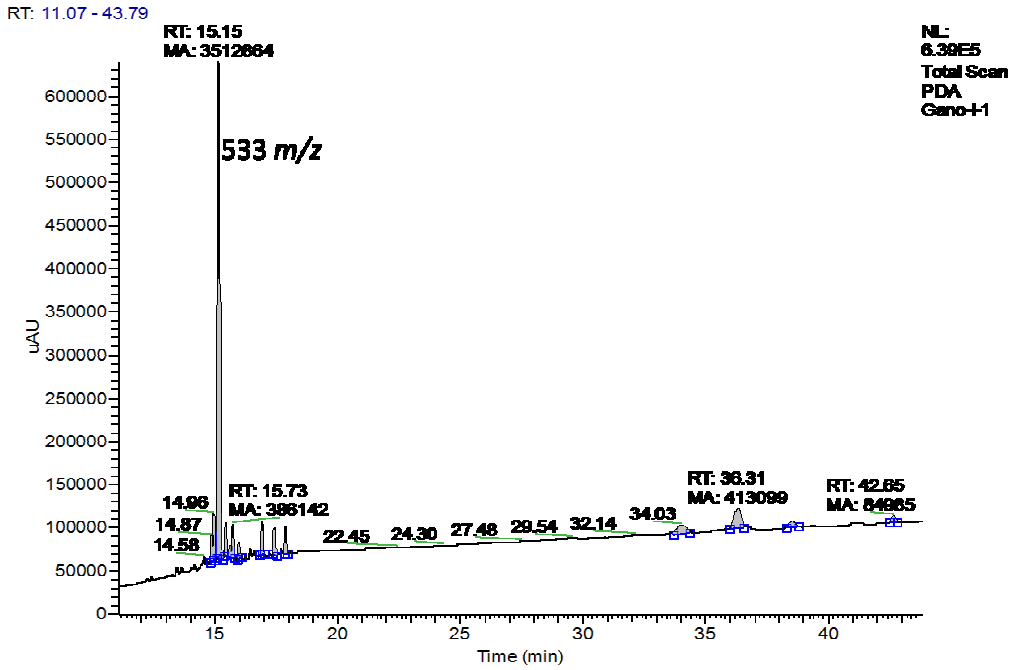


Figure 106 : Chromatogramme de masse de la fraction SW45GA

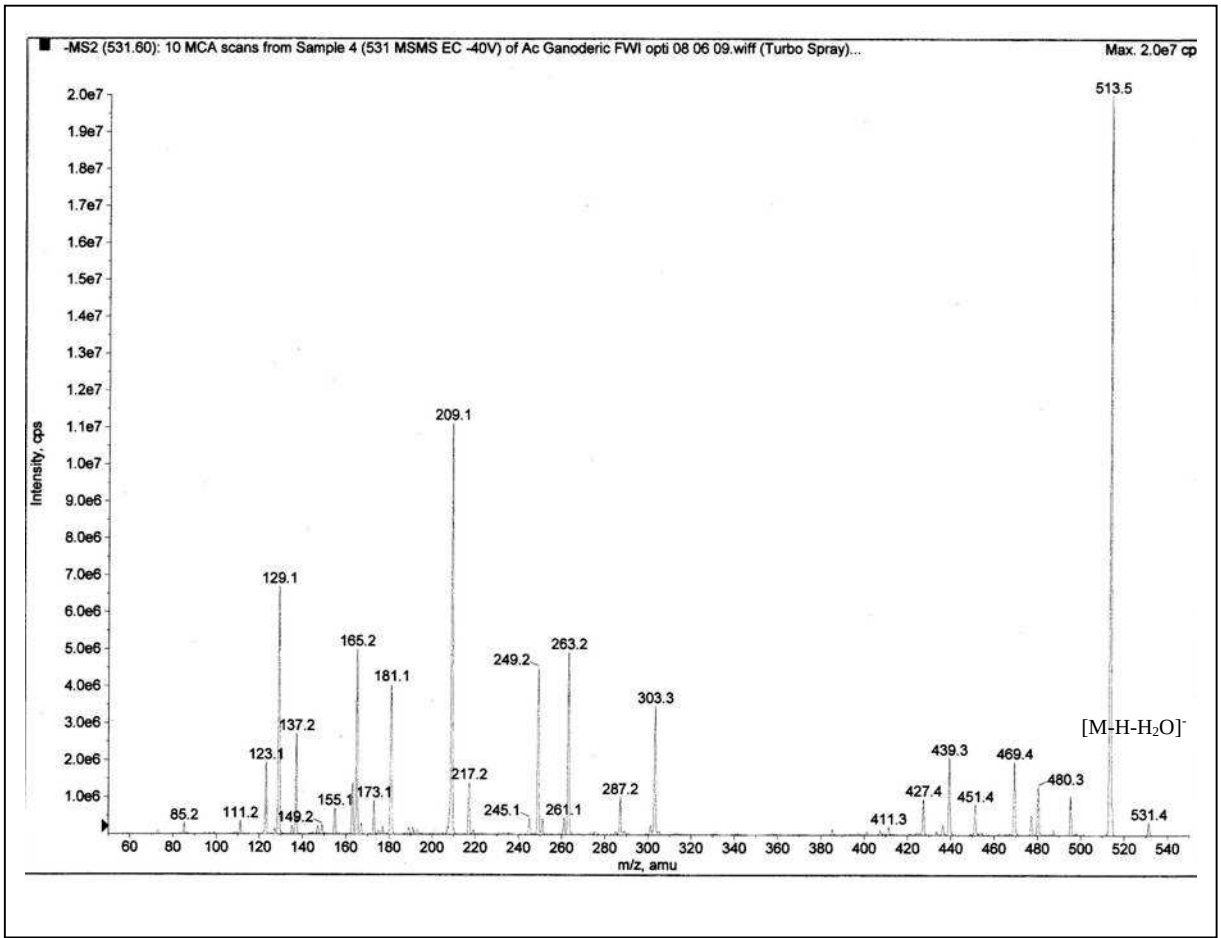


Figure 107 : ESI-MS-MS de l'ion à *m/z* 531 correspondant au composé majoritaire de SW45GA ; EC -40V

4) Analyse de la fraction SW45GA en RMN ^{1}H et ^{13}C (partie concernant le composé majoritaire GA FWI

A partir du spectre carbone DEPT, on détermine que la molécule contient 30 carbones : 7 méthyles (-CH_3), 6 méthylènes (-CH_2-), 7 méthines (=CH-) et 10 carbones quaternaires (C) qui inclus 4 carbonyles (C=O). (δ 180,2 ; 198 ; 211,4 et 218 ppm).

Les déplacements chimiques du spectre RMN ^{1}H et ^{13}C, ainsi que les spectres de corrélations scalaires ^{1}H-^{1}H (COSY) et ^{1}H-^{13}C (HSQC et HMBC) indiquent que ce composé possède 4 cycles cyclohexaniques A, B, C, D de type lanostane dont les radicaux en C-3, C-7 ; C-15, C-13 sont identiques aux acides ganodériques de type III (Yang *et al*., 2007) en particulier l'acide ganodérique B et I (Kikuchi *et al*., 1985).

En ce qui concerne la chaîne situé en C-17, un doublet méthyle à δ 1,19 (H-21) est couplé avec un groupe méthine à δ 2,25 (H-20) qui est lui-même couplé à un groupement méthine à δ 4,02 (H-22) déblindé du fait de la présence d'un groupement hydroxyl (OH) sur le C-22. Un autre doublet méthyl à δ 1,30 (H-27) est couplé avec un groupement méthine à δ 3,08 (H-25) qui est lui même couplé avec un méthylène à δ 2,41 et 3,22 (H-24). La structure de la chaîne en C-17 a été confirmée par spectre RMN HMBC. Celui-ci montre, en effet, une forte corrélation entre le carbonyl en C-23 et les protons 22 et 24, ainsi qu'entre le carbonyle en C-26 et les protons 24 et 27.

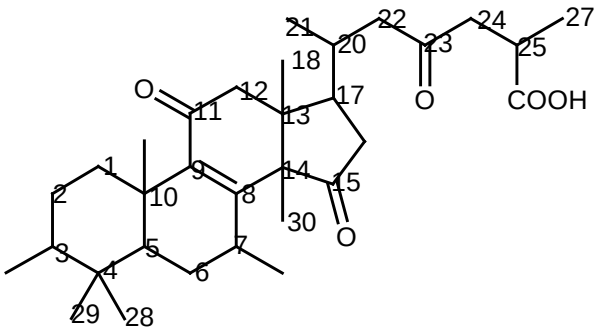


Figure 108 : numérotation des carbones des acides ganodériques

Les différentes corrélations carbone-hydrogène ont été établies par l'interprétation du spectre HMBC résumé ici dans le tableau 9.

La stéréochimie d'H-3, H-7 et H-17 a été définie par l'expérience NOESY permettant de mettre en évidence les proximités spatiale de proton par effet Overhauser) (voir tableau). Ces corrélations dipolaires ont été observées à partir de H-3 vers H-28 ; de H-19 à H-29 ; de H-7 à H-30 et H-17 à H-30.

Ainsi la structure chimique de ce composé a été identifiée comme un acide ganodérique B hydroxylée sur la chaîne en C-17. De plus les spectres RMN ont permis de révéler que le groupement hydroxyle se situait sur le C-22.

La structure définitive identifiée est le 3β,7β,22-trihydroxy-11,15,23-trioxo-lanost-8-en-26-oic acide (figure 109). Ce nouveau composé a été appelé Acide ganodérique FWI en référence à French West Indies (Les Antilles Françaises).

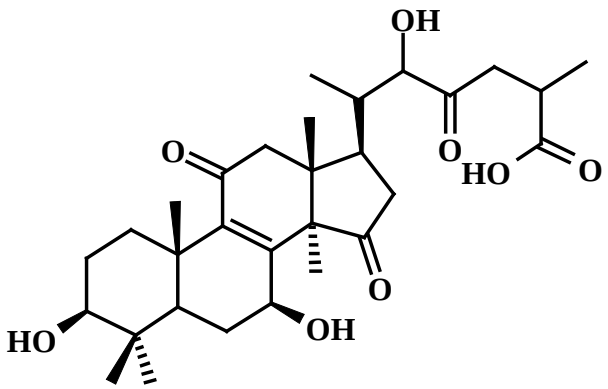


Figure 109 : 3β,7β,22-trihydroxy-11,15,23-trioxo-lanost-8-en-26-oic acide (GA FWI)

Atome	^{13}C	^{1}H (figure 110)	HMBC (figure 111)
1	34.7 t	α 0.99 m	C-2, C-10, C-19
		β 2.83 m	C-2, C-3, C-5, C-10
2	27.6 t	1.68 m	C-1, C-3, C-4, C-10
3	78.3 d	3.23 dd (4.7, 11.0)	C-4, C-28, C-29
4	38.8 s		
5	49.1 d	0.89 m	C-4, C-6, C-7, C-10, C-19, C-29
6	26.5 t	β 1.63 m	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10
		α 2.2 m	C-4, C-5, C-7, C-10

7	**67.0 d**	**4.83 t (8.7)**	**C-6, C-8, C-9**
8	**156.7 s**		
9	**142.8 s**		
10	**38.6 s**		
11	**198.0 s**		
12	**50.3 t**	**α 2.68 d (16.8)**	**C-9, C-11, C-13, C-14, C-18**
		β 2.81 d (16.8)	**C-11, C-13, C-14, C-17, C-18**
13	**45.4 s**		
14	**58.9 s**		
15	**218.0 s**		
16	**40.2 t**	**2.0 dd (9.7, 19.2)**	**C-15, C-17, C-20**
		2.57 dd (7.9, 19.2)	**C-13, C-15, C-17**
17	**41.4 d**	**2.45 m**	**C-12, C-13, C-18, C-20**
18	**17.5 q**	**1.0 s**	**C-12, C-13, C-14, C-17**
19	**18.5 q**	**1.23 s**	**C-1, C-5, C-9, C-10**
20	**39.7 d**	**2.25 m**	**C-17, C-21, C-22, C-23**
21	**18.4 q**	**1.19 d (6.9)**	**C-17, C-20, C-22**
22	**81.5 d**	**4.02 d (2.0)**	**C-17, C-20, C-21, C-23**
23	**211.4 s**		
24	**42.0 t**	**2.41 dd (3.8, 18.0)**	**C-23, C-25, C-26, C-27**
		3.22 dd (9.7, 18.0)	**C-23, C-25, C-26, C-27**
25	**34.4 d**	**3.08 m**	**C-24, C-26**
26	**180.2 s**		
27	**17.3 q**	**1.3 d (7.2)**	**C-24, C-25, C-26**
28	**28.1 q**	**1.04 s**	**C-3, C-4, C-5, C-29**
29	**15.5 q**	**0.87 s**	**C-3, C-4, C-5, C-28**
30	**24.5 q**	**1.34 s**	**C-8, C-13, C-14, C-15**

Tableau 9 : Déplacements chimiques (ppm) et multiplicité obtenu en RMN^{13}C, ^{1}H, constantes de couplage 1H 1H en proton (Hz) et corrélations proton-carbone déterminées par HMBC (dans $CDCl_3$) pour GA FWI

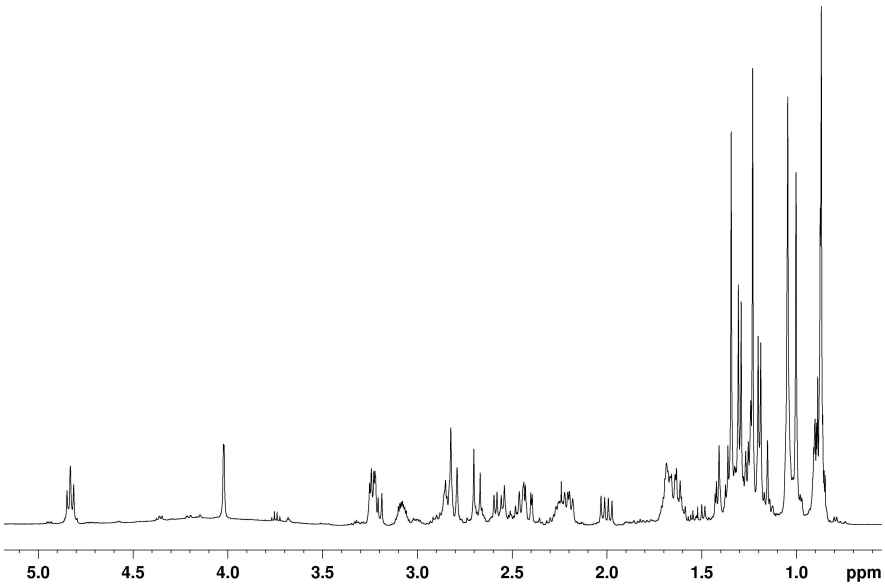


Figure 110 : Spectre RMN ^{1}H de GA FWI

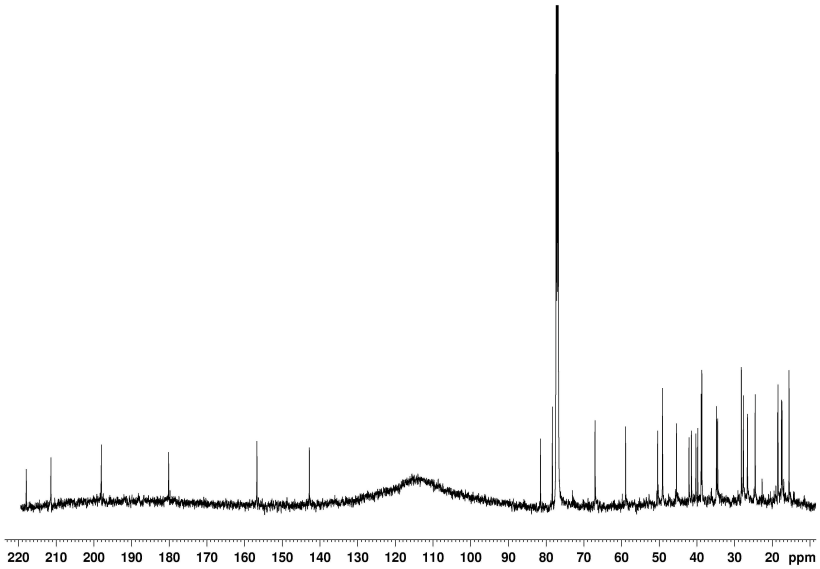


Figure 111 : Spectre RMN^{13}C obtenu pour GA FWI

5) Analyse de l'ion à *m/z* 529 de la fraction SW45GA en ESI-MS-MS et comparaison de son spectre avec celui de GA FWI

Pour une énergie de collision égale à -40 V, les deux spectres comportent beaucoup de similitude.(figure112)

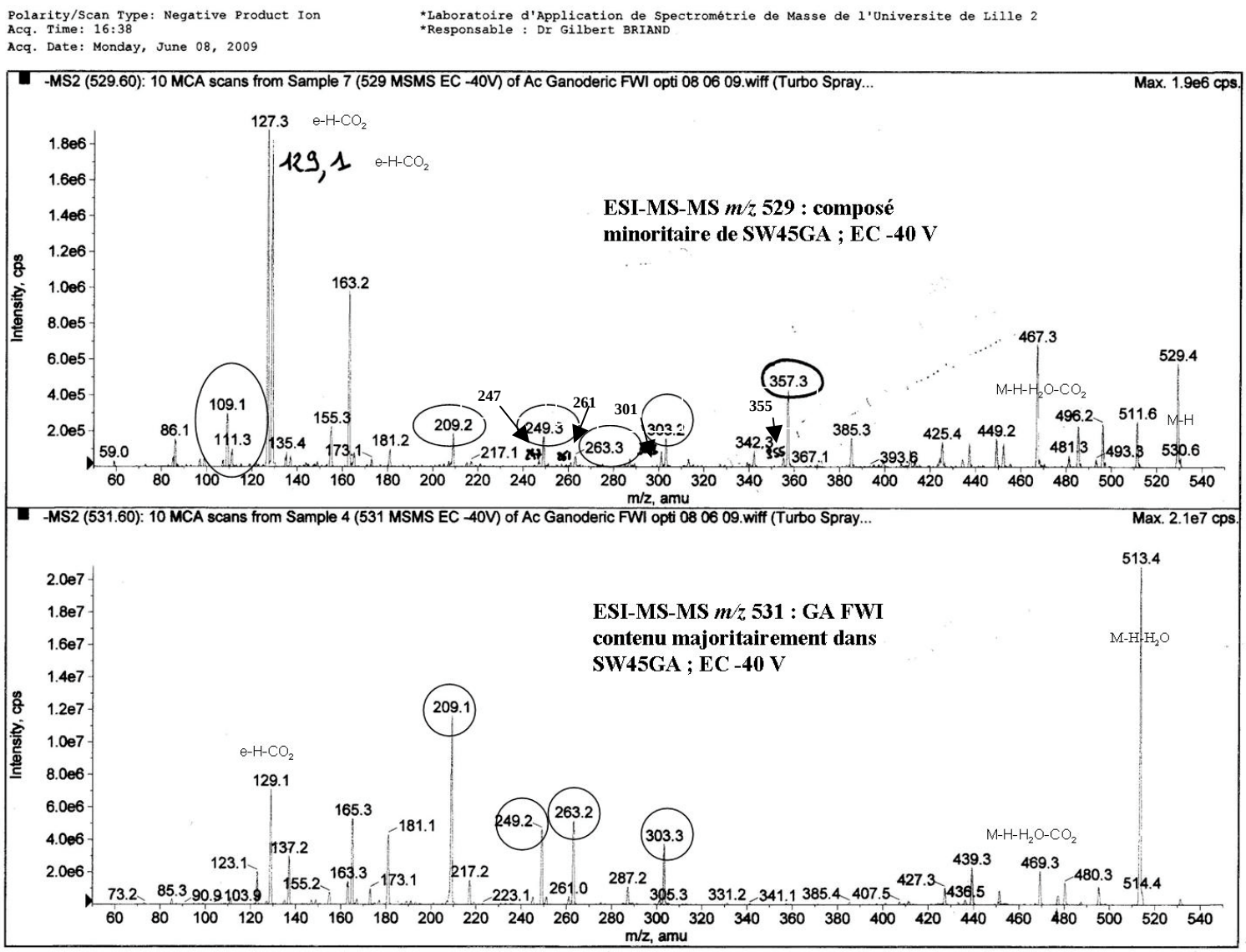


Figure 112 : comparaison des spectres de masses obtenus pare ESI MS^2 de l'ion à *m/z* 531 correspondant à GA FWI et de l'ion à *m/z* 529

Tout d'abord, les spectres ESI-MS-MS des ions à *m/z* 531 (GA FWI) et 529 (acide ganodérique inconnu) présentent les mêmes fragments **a ; a+CH_2 ; b** de *m/z* respectif **249 ; 263 ; 303.**

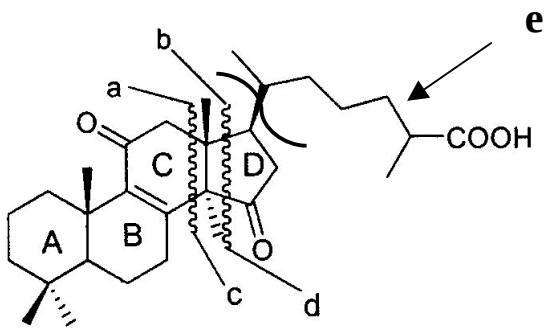
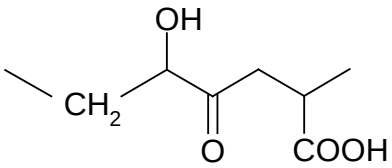


Figure 113 : différents types de fragmentation d'un acide ganodérique par ESI-MS^n

Ces 3 fragments sont caractéristiques des acides ganodériques de type III (Yang *et al.*, 2007), qui se caractérisent par une fonction hydroxyle sur le C-7 et une fonction carbonyle au niveau du C-15. De plus, le fragment **a+CH$_2$** n'est retrouvé que sur les acides ganodériques de cette classe. Toutefois, pour le composé inconnu à *m/z* 529, le fragment **b-16** correspondant à ***m/z* 287** n'est pas retrouvé.

Ensuite, nous retrouvons également sur les 2 spectres les fragments à *m/z* 129. Ces fragments correspondraient à la chaîne latérale **(e)** (Figure 113), obtenue par rupture de la liaison entre C-17 et C-20, duquel a été soustrait CO_2 de masse 44 g.mol^{-1}. Ce type de fragment, de masse faible, ne peut être décelé par ESI-MS-MS en mode 'ion trap' et c'est la raison pour laquelle ils ne sont pas évoqués par Yang *et al*, (2007).

Pour l'acide ganodérique FWI, par exemple, **e** est égal à 174 g.mol^{-1} ($C_8O_4H_{14}$)



= **e** ($C_8O_4H_{14}$) ; Masse molaire 174 g.mol^{-1}

La perte de 44 Da à partir de [e] engendre le fragment à *m/z* 129 [e-H-44]$^-$ qui génère ensuite, par la perte d'une molécule d'eau le fragment [e-H-44-18]$^-$ à *m/z* 111 (figure 112).

Le spectre du composé inconnu en ESI-MS-MS (mode négatif) présente également les fragments à *m/z* 129 et 111, ce qui signifie d'une part que ce composé possède, de manière identique à GA FWI, une chaîne latérale avec un groupement OH supplémentaire par rapport à GA B et d'autres part, que la différence de masse (-2 Da) entre les deux composés (*m/z* 531

pour GA FWI et *m/z* 529 pour le composé inconnu) se situerait au niveau du cycle cyclopentanophénantrénique.

Par conséquent, les fragments **a ; a+CH_2 ; b** de *m/z* respectif **249 ; 263 ; 303** correspondraient à un deuxième composé inconnu de masse identique au premier (530g.mol^{-1}) mais dont la différence de masse par rapport à GA FWI (-2 Da) se situerait au niveau de la chaîne latérale.

On retrouve, en effet, sur le spectre les fragments à *m/z* 127 et 109 provenant du fragment e dont la masse théorique serait égale à 172 g.mol^{-1}.

La présence conjointe des fragments [M (530)-H-chaîne latérale (174)]$^-$à *m/z* 355 et [M (530)-H-chaîne latérale (172)]$^-$à *m/z* 357, sur le spectre confirme cette hypothèse. De même, la présence des fragments de faible intensité **a ; a+CH_2 ; b** de *m/z* **247 ; 261 ; 301**, correspondraient ainsi à la fragmentation du cycle C et D du premier composé.

a) Hypothèse de structure des deux composés

Les deux ions parents *m/z* 529 perdent une molécule d'eau (*m/z* 511) ainsi qu'une molécule de CO_2 (*m/z* 467) au niveau de la chaîne latérale. Tous deux sont fragmentés également au niveau du cycle C et D pour donner les ions a ; a+CH_2 ; b. Ces deux types de fragmentation sont caractéristiques des acides ganodériques et particulièrement aux composés de type III.

La perte de 2 Da situé sur le cycle du premier composé devrait correspondre à la substitution de la fonction hydroxyle au niveau C-3 par une fonction carbonyle.

La perte de 2 Da situé sur la chaîne latérale du deuxième composé par rapport à GA FWI devrait correspondre :

-soit à une oxydation du C-22 transformant la fonction alcool en fonction carbonyle,

- soit à une déshydrogénation entre C-20 et C-22

b) Origine et temps de rétention des deux acides ganodériques

L'extraction de l'ion à *m/z* 529 en LC-ESI-MS^2 de la fraction GA_{IV}, montre deux pics d'absorption aux t_R 15,68 et 16,16 min. Ce résultat correspond à ceux obtenus en ESI-MS mode positif, pour lequel deux ions $[M+H]^+$ à *m/z* 531 ont été retrouvés.

Pour chacun des pics obtenus, les spectres de masse ont été analysés. Pour le pic à t_R 16,16 min, nous retrouvons sur le spectre de masse les ions à *m/z* 127 $[e\text{-}H\text{-}CO_2]^-$; 249 [a] ; 263 [a+14] ; 303 [b] ; 357 [M-H-chaîne latérale]$^-$; 385 et 467 $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO_2]^-$ tandis que pour le pic à t_R 15,68 min, nous retrouvons uniquement les ions $[e\text{-}H\text{-}CO_2]^-$ à *m/z* 129 et 385.

Ainsi, le premier composé correspondrait au pic d'absorption de t_R 15,68 min, tandis que le deuxième composé correspondrait au pic d'absorption de t_R 16,16 min.

Etant donné la faible quantité d'ions fils obtenus pour le premier composé de t_R 15,68 min, celui-ci semble plus difficile à fragmenter. De même, en ESI-MS mode positif, le composé à t_R 17,05 min n'a pas donné d'ion fils $[M\text{-}H_2O+H]^+$.

En conclusion, nous pouvons affirmer que l'ion minoritaire à *m/z* 529, retrouvé dans SW45GA à partir duquel a été identifié GA FWI, correspond à deux composés que l'on retrouve également dans la fraction GA_{IV}.

	Composé 1	**Composé 2**	**GA FWI**
Temps de rétention (min) LC-ESI-MS mode positif	**17,05**	**17,48**	**15,15**
Temps de rétention (min) LC-ESI-MS mode négatif	**15,68**	**16,16**	**14,99**
***m/z* LC-ESI-MS (+)**	**531**	**531 et 513**	**533 et 515**
***m/z* LC-ESI-MS^2 (-) et ESI-MS-MS direct (EC -40V)**	**529** $[M\text{-}H]^-$; **511** $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$ **467** $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO_2]^-$; **355** [M-H-chaîne latérale] ; **301** [b] ; **261** [a+14] ; **247** [a] ; **129** $[e\text{-}H\text{-}CO_2]^-$; **111** [**e-** $H\text{-}CO_2\text{-}H_2O$]	**529** $[M\text{-}H]^-$; **511** $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$ **467** $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO_2]^-$; **357** [M-H-chaîne latérale]$^-$; **303** [b] ; **263** [a+14] ; **249** [a] ; **127** $[e\text{-}H\text{-}CO_2]^-$; **109 [e-** $H\text{-}CO_2\text{-}H_2O]^-$	531 $[M\text{-}H]^-$; 513 $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$; 469 $[M\text{-}H\text{-}H_2O\text{-}CO_2]^-$; **303** [b] ; **287** [b-16] ; **263** [a+14] ; **249** [a] ; **129** $[e\text{-}H\text{-}CO_2]^-$; **111** [**e-** $H\text{-}CO_2\text{-}H_2O$]

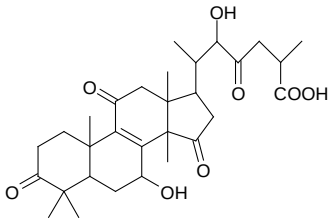
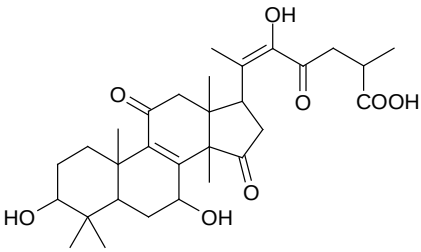
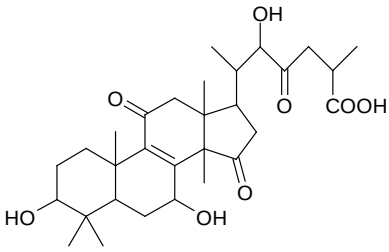
Structure (supposée(s) pour composé 1 et 2)		 Autre possibilité : fonction carbonyle sur C-22 et absence de double liaison $\Delta_{20\text{-}22}$	

Tableau 10 : caractéristiques des composés 1 et 2 en LC-ESI-MS^2 *vs* GA FWI

6) Séparation et purification des composés de SW45GA

a) Choix du mode opératoire (voir partie expériementale pour l'ensemble du paragraphe)

Comme nous venons de le voir précédemment, SW45GA est une fraction dont le constituant majeur GA FWI est pur à environ 70%. Les autres composés sont également des acides ganodériques dont la structure devrait être assez proche du composé majoritaire. Toutefois, de manière à confirmer cette hypothèse, nous avons tenté d'isoler ces composés par CLHP.

Tout d'abord, à l'échelle analytique, nous avons utilisé une colonne de type C-18 Platinium (250 x 4,6 mm ; 5 µm), les composés ont été élués en mode isocratique soit par des phases mobiles de type **méthanol / eau**, dont on a fait varier les proportions 25 / 75 => 70 / 30 (v/v) ou bien par des mélange **Acétonitrile / Eau** de proportion 10 / 90 à 50 / 50 (v/v) avec ajout éventuel d'acide acétique (0,5%) ou de TFA (0,05%). Les temps de rétention obtenus par cette méthode ont été trop long et la résolution des pics insuffisante pour envisager une séparation semi-préparative sur cette phase stationnaire.

Nous avons donc tenté d'analyser notre fraction à l'aide d'une colonne de type cellulose OJ puis d'une colonne de type ODH (voir partie expérimentale). La phase mobile utilisée Hexane / Ethanol 90 / 10 (v/v) sur la colonne OD-H a permis d'obtenir le meilleur résultat au niveau des temps de rétention et de la résolution des pics (temps d'analyse : 55 mn ; R_S entre chaque pic > 1,5)

C’est la raison pour laquelle, nous avons choisi de transposer nos conditions d’analyse sur une colonne de type OD (97,9 x 10 mm ; 20 µm) pour la séparation des composés de SW45GA en chromatographie semi-préparative.

b) Résultats

Quarante milligrammes de SW45GA ont ainsi été fractionnée de manière à obtenir 4 fractions purifiées : $GA_{F\alpha}$ (3,78 mg); $GA_{F\beta}$ (2,05 mg), $GA_{F\gamma}$ (4,42 mg), $GA_{F\delta}$ (6,5 mg). La vérification de la pureté des fractions a été réalisée sur la colonne semi-préparative dans les mêmes conditions d’élution que celle utilisée en chromatographie semi-préparative et à une concentration de 1 mg/ml. Les chromatogrammes obtenus ont été comparés avec la fraction de départ (SW45GA) (figure 114)

La pureté des quatres fractions semblent donc être satisfaisantes. Elles ont donc ensuite été analysées en LC-ESI-MS mode positif (figure 115)

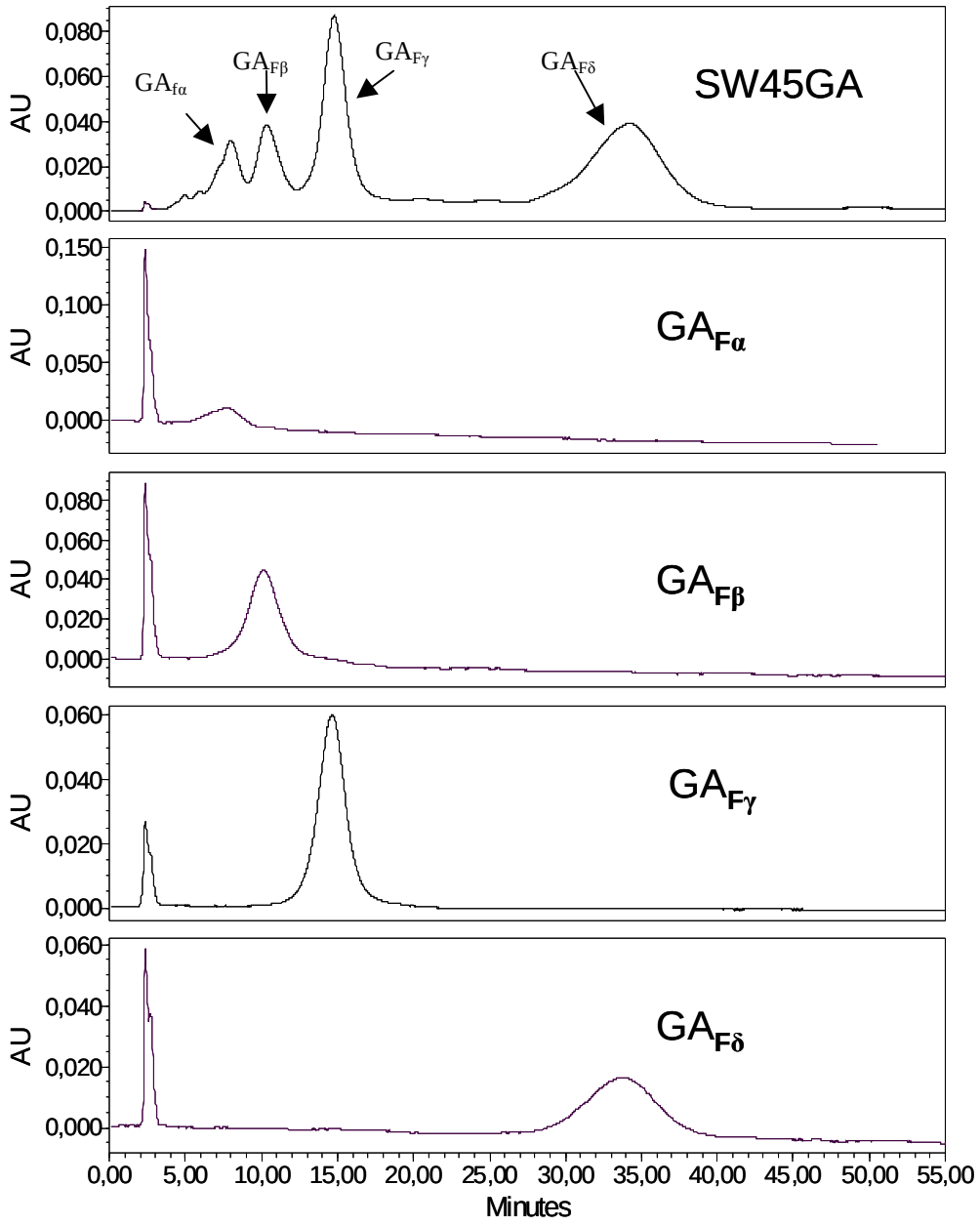


Figure 114 : profil chromatographique des 4 fractions purifiées à partir de SW45GA

Contrôle de la pureté des fractions en CLHP semi-préparative ; colonne OD (250 x 4,6 mm ; 20 µm), comparaison avec le chromatogramme UV de SW45GA. Volume injecté pour chaque fraction : 20 µl ; Concentration : 1 mg/ml

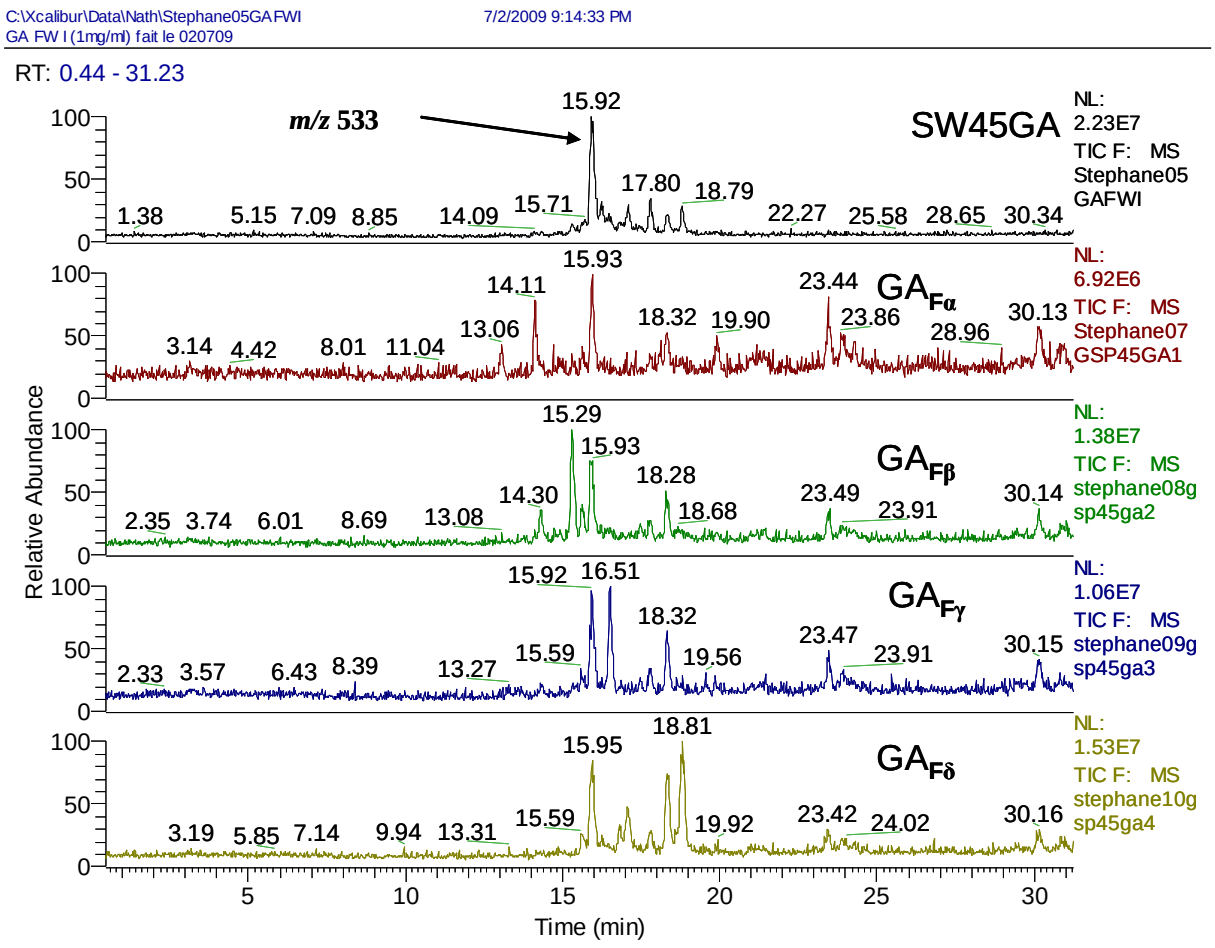


Figure 115 : Analyse des 4 fractions en LC-MS

En LC-ESI-MS, les 4 fractions paraissent moins pures que la fraction SW45GA de départ. Le composé majoritaire à *m/z* 533 a, de plus, été retrouvé sur chacune d'entre elle.

Les fractions ont ensuite été analysées en RMN (^{1}H).

Sur les quatres fractions seul le spectre RMN ^{1}H de la fraction $GA_{F\gamma}$ a pu justifier l'analyse plus approfondie de la fraction avec les corrélations en deux dimensions ^{1}H-^{13}C, HMBC, et HSQC.

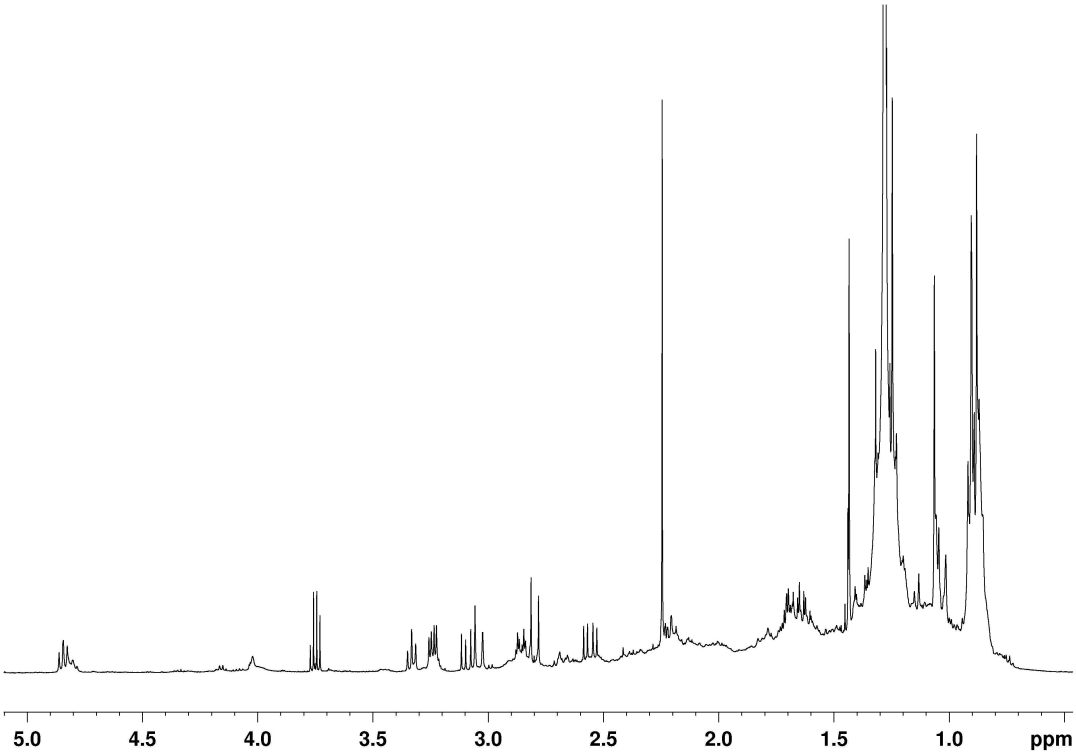


Figure 116 : spectre RMN ^{1}H de $GA_{F\gamma}$

Atome	^{13}C	^{1}H (figure 116)	HMBC
1	34.5 t	1.00 m	Non observable
		2.85 m	C-2, C-3, C-5, C-10, C-19
2	27.4 t	1.69 m	C-1, C-3, C-4, C-10
3	78.2 d	3.24 dd (5.2, 11.2)	C-4, C-28, C-29
4	38.8 s		
5	48.9 d	0.89 m	C-4, C-6, C-7, C-10, C-19, C-29
6	26.5 t	1.63 m	C-4, C-5, C-7, C-10
		2.21 m	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10
7	66.8 d	4.84 t (8.7)	C-6, C-8, C-9
8	156.3 s		
9	142.7 s		
10	38.8 s		
11	196.3 s		
12	48.8 t	2.8 d (16.2)	C-9, C-11, C-13, C-14, C-18
		3.04 d (16.2)	C-11, C-13, C-17, C-18
13	44.7s		
14	58.6 s		
15	216.1 s		
16	35.6 t	2.55 dd (8.7, 20.0)	C-13, C-15, C-17
		3.08 dd (9.3, 20.0)	C-15, C-17, C-20
17	54.0 d	3.33 t (8.7)	C-12, C-13, C-16, C-18, C-20
18	18.9 q	0.9 s	C-12, C-13, C-14, C-17
19	18.0 q	1.23 s	C-1, C-5, C-9, C-10
20	205.0 s		
21	31.1 q	2.24 s	C-17, C-20
22	27.9 q	1.05 s	C-3, C-4, C-5, C-29
23	15.2 q	0.88 s	C-3, C-4, C-5, C-28
24	24.5 q	1.43 s	C-8, C-13, C-14, C-15

Tableau 11 : Déplacements chimiques (ppm) et multiplicité obtenu en RMN^{13}C, ^{1}H, constantes de couplage 1H 1H en proton (Hz) et corrélations proton-carbone déterminées par HMBC (dans $CDCl_3$) pour $GA_{F\gamma}$

Le spectre RMN ^{13}C de la fraction $GA_{F\gamma}$ révèle entre autres : 3 fonctions carbonyls (δ 196,3 ; 205 ; 216,1 ppm), 2 carbones quaternaires éthyléniques (δ 142,7 et 156,3 ppm) et 6 méthyles (δ 15,2 ; 18 ; 18,9 ;24,5 ; 27,9 et 31,1 ppm). Cette molécule semble assez proche de la

structure des acides ganodériques excepté qu'elle ne possède que 3 carbonyles (4 pour les acides ganodériques), et ne contient que 24 atomes de carbones (contre 30 pour les GA). De plus, les atomes d'hydrogène sur le méthyl C-21 sont plus déblindés que les autres méthyles (δ 2,24 ppm) de part sa position en α du groupement carbonyle en C-20. Enfin, les corrélations HMBC du carbone 20 avec les protons 21 et 17 prouve la présence d'une fonction acétyl en position 17 à la place de la chaîne latérale retrouvée habituellement chez les acides ganodériques. A partir de ces résultats, ce composé peut être considéré comme le 3β,7β-dihydroxy4,4,14α-trimethyl-11,15,20-trioxo-lanost-8-en (figure 117) ou le Lucidone A (Nishitoba, 1985)

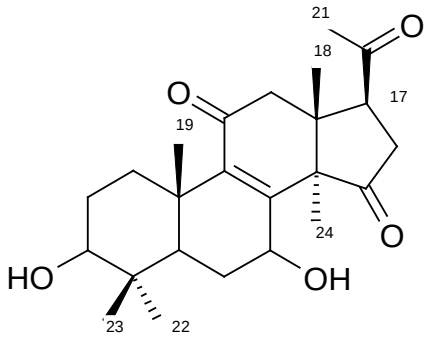


Figure 117 : Lucidone A : $C_{24}H_{34}O_5$; poids moléculaire : 402 g.mol^{-1}

Ce composé n'a jamais été retrouvé en LC-ESI-MS mode positif à *m/z* 403 ainsi qu'en LC-ESI-MS^2 mode négatif à *m/z* 401

En revanche, on le retrouve de manière intense sur les premiers chromatogrammes de SW45 effectués en LC-MS APCI$^+$;colonne ODS en phase inverse (50 mm X 4,6 mm) au temps de rétention 3,18 min sous la forme $[M+H]^+$ 403 *m/z* et $[M+H-H_2O]^+$ à *m/z* 385. Nous avons réitéré l'opération mais cette fois ci en mode ESI$^+$. Ces fragments ont été retrouvés mais avec une très faible intensité.

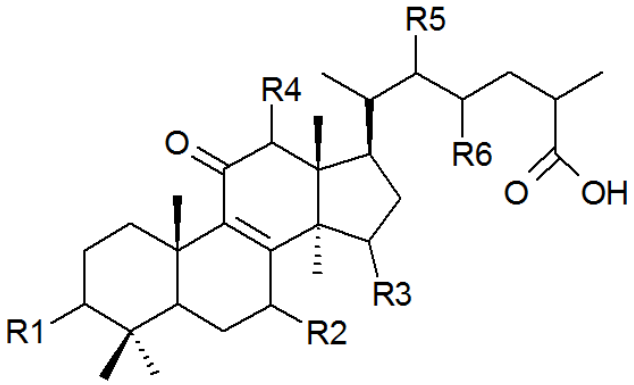
Ces ions pourraient correspondre à la fragmentation d'un acide ganodérique mentionné ci-dessus. Or, ces fragments ne sont pas retrouvés ni pour GA FWI, ni pour les acides ganodériques à *m/z 529* de la fraction SW45GA.

Ainsi, la lucidone A ne résulterait apparemment pas d'une dégradation provoquée par les variations de pH (puisque retrouvé dans SW45), ou de la fragmentation d'acides ganodériques par ESI-MS mode positif ou ESI-MS-MS mode négatif (puisque non retrouvé sur les spectres concernés) mais serait un composé à part entière retrouvé dans la fraction contenant les triterpènes acides.

F) Évaluation de l'activité antiproliférative de la fraction SW45GA enrichi en GA FWI sur cellules cancéreuses de type PC-3, HT-29 et MCF-7. Comparaison des résultats avec les témoins GA A, GA DM et GA F

	PC-3 (CI_{50} en µM.ml^{-1} ou % d'inhibition à 100µM)	MCF-7 (CI_{50} en µM.ml^{-1} ou % d'inhibition à 100µM)	HT-29 (CI_{50} en µM.ml^{-1} ou % d'inhibition à 100µM)
GA F	3%	0%	0%
GA A	6%	14%	0%
GA DM	87,98 µM	83,95 µM	28%
SW45GA (contenant **GA FWI** à 70 %)	**4%** à 53 µg.ml^{-1} de SW45GA correspondant à 70 µM théorique de GA FWI	**0%** à 53 µg.ml^{-1} de SW45GA correspondant à 70 µM théorique de GA FWI	**0%** à 53 µg.ml^{-1} de SW45GA correspondant à 70 µM théorique de GA FWI

Tableau 12 : comparaison de l'activité antiproliférative de GA A, GA F, GA DM et SW45GA (GAFWI)



Compound name	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Double liaison
acide ganodérique A	=O	β-OH	α-OH	H	H	=O	
acide ganodérique F	=O	=O	=O	β-OAc	H	=O	
acide ganodérique DM	=O	=O	H	H	H	H	$\Delta_{24,25}$
acide ganodérique FWI	β-OH	β-OH	=O	H	OH	=O	

Figure 118 : comparaison des structures moléculaires de GA A, GA F, GA DM et GA FWI

Tout d'abord, nous constatons que l'activité antiproliférative de GA FWI de SW45GA est sous estimé puisqu'il contient GA FWI à environ 70 %. Néanmoins, les faibles résultats obtenus pour SW45GA ne permettent pas d'espérer une activité antiproliférative significative de GA FWI.

Ensuite, l'activité des acides ganodériques semble inversement proportionnelle au degré d'oxydation de la structure de base de type lanostane des acides ganodériques (figure 118). L'hypothèse de Sliva *et al.* (2008), selon laquelle l'activité des acides ganodériques dépendrait du nombre de groupement hydroxyle, n'est pas confirmée ici. En revanche, parmi les acides ganodériques, GA DM présente la plus forte activité antiproliférative (notamment sur cellules de types PC-3, ce qui confirme les résultats antérieurs obtenu par Liu *et al.* (2009).

Nous avons vu précedemment que le *G. lucidum* asiatique possèdait vraisemblablement GA DM dans son extrait méthanolique. En revanche, il n'a pas été retrouvé dans les extraits de *G. tuberculosum* et de *G. lucidum sensu stricto.* La valeur de la CI_{50} de GA DM sur PC-3 qui est de 87,98 $\mu mol.l^{-1}$ correspondant à la valeur de 41,176 $\mu g.ml^{-1}$ pourrait expliquer l'activité

antiproliférative (CI_{50} de l'extrait méthanolique : 128 µg.ml^{-1}) de *G. lucidum* asiatique. Si tel était le cas, cela expliquerait l'activité moins importante de cet extrait sur HT-29, étant donné que pour GA DM nous n'obtenons qu'une valeur de 28 % pour 100µM. Toutefois, la faible intensité du pic correspondant à GA DM sur le chromatogramme de masse de *G. lucidum* asiatique ne permet pas d'affirmer cette hypothèse. De même, elle n'explique pas l'activité antiproliférative de *G. tuberculosum* ni de *G. lucidum* européen pour lesquels cette molécule n'a pas été retrouvée.

IV) Conclusions et perspectives

A travers les travaux que nous avons effectués et nos recherches bibliographiques, notre objectif était de démontrer que la démarche chimiotaxinomique, pour la recherche de substance antitumorale à partir de champignons tropicaux, était pertinente. La famille fongique que nous avons choisie : les *'Ganodermataceae'* n'est pas le fruit du hasard puisque le célèbre 'Lingzhi', appelé également *G. lucidum,* traditionnellement utilisé en médecine orientale, appartient à cette famille.

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si une ou plusieurs espèces de ganoderme, ou apparentées, récoltées aux Antilles françaises, présentaient de la même façon que le *G. lucidum* une activité antiproliférative sur cellules cancéreuses.

Pour cela, nous avons dans un premier temps situé les spécimens asiatiques, désignés sous le nom de *G. lucidum,* au sein de la classification traditionnelle. Les résultats obtenus par l'analyse micro- et macromorphologique des spécimens, le séquençage de leurs ITS ainsi que l'étude du profil chromatographique de leur extrait méthanolique, s'accordent pour dire que les spécimens asiatiques ne correspondent pas *G. lucidum sensu stricto,* qui est une espèce strictement européenne, mais à au moins deux autres espèces :

La première est d'origine chinoise. Elle se différencie par un contexte pâle, de couleur chamois, des spores ovoïdes avec de larges échinules et une surface porée jaunâtre. Actuellement, cette espèce ne correspond à aucun nom de la classification traditionnelle.

La deuxième est d'origine taïwanaise. Elle se différencie par des spores oblongues, finement échinulée ; sa forme est ramifiée, ce qui signifie qu'un même stipe peut présenter plusieurs chapeaux. D'après Wang *et al.*, (2009), cette espèce devrait correspondre à *G. multipileum.*

Nous avons donc comparé l'activité antiproliférative de plusieurs espèces néotropicales, identifiées par des moyens traditionnels et moléculaires, avec celle de l'espèce chinoise ainsi que celle de l'espèce européenne.

Le *G. lucidum* européen a présenté des résultats d'inhibition de prolifération identiques à ceux obtenus pour l'espèce asiatique, sur les cellules cancéreuses de type HT29 et MCF-7. En revanche, seul le *G. lucidum* européen a présenté une activité sur PC-3.

Les ganodermes ou apparentés (*Humphreya*) possédant un revêtement différencié n'ont pas montré de résultats d'inhibition de prolifération significatifs comparés à ceux dont le revêtement est différencié, en particulier celui identifié sous le nom de *G. tuberculosum*, pour lequel nous avons obtenu la meilleure activité antiproliférative.

D'après la bibliographie, l'activité potentiellement anticancéreuse du spécimen asiatique, désigné sous le nom de *G. lucidum*, résulterait soit de l'action des polysaccharides, soit des triterpènes, notamment des acides ganodériques.

Les polysaccharides ayant une activité indirecte, nous nous sommes concentrés sur la recherche de triterpènes, et plus particulièrement sur la recherche d'acides ganodériques. Les extraits des espèces les plus actives : *G. lucidum* européen, *G. lucidum* asiatique et l'espèce néotropicale *G. tuberculosum* ont été analysés par LC-MS^n.

De ces recherches, les résultats suivants ont été obtenus :

- Le chromatogramme de masse du *G. lucidum* européen obtenu par LC-MS n'a pas montré de composés apparentés aux acides ganodériques.

- Le chromatogramme de masse du *G. lucidum* asiatique a révélé la présence de deux acides ganodériques (GA A et GA F) ainsi que la présence probable d'autres acides ganodériques déjà décrits dans la bibliographie : GA C_2, GA D, GA H, GA J et GA DM.

- Le chromatogramme de masse de l'espèce néotropicale *G. tuberculosum* a révélé plusieurs composés, dont un majoritaire, suspecté d'être un acide ganodérique. L'analyse en LC-MS^n ESI négative a révélé que ce composé majoritaire correspondait à l'acide ganodérique B hydroxylé sur sa chaîne latérale.

Les premières conclusions que nous avons pu émettre à partir des résultats obtenus par LC-MS^n sont les suivantes :

- Nos spécimens asiatiques achetés en Chine et dont la surface porée est jaunâtre correspondent à l'espèce dont ont été extraits les principaux acides ganodériques publiés depuis ces trente dernières années.

- L'activité antiproliférative des extraits ne dépend peut être pas de la présence d'acides ganodériques étant donné l'activité significative de l'extrait du *G. lucidum* européen qui en est dépourvu.

- Les acides ganodériques ne sont pas spécifiques d'une seule espèce de ganoderme.

- Les profils chromatographiques (CCM et LC-MS) pour une même espèce sont reproductibles.

A partir de ces conclusions nous avons tenté de connaître l'identité des composés actifs par la comparaison de l'activité inhibitrice des différentes fractions de *G. tuberculosum.* La fraction éther de pétrole riche en ergostérol ou dérivés de l'ergostérol a montré la plus forte activité. Toutefois, la faible solubilité de ces composés dans le méthanol n'a pas permis d'assurer la purification de ces différents stérols. Nous nous sommes donc concentrés sur l'acide ganodérique majoritaire de l'espèce néotropicale active.

Plusieurs chromatographies successives ont permis de purifier partiellement le composé majoritaire. Le spectre RMN ainsi que le spectre de masse ont révélé que ce composé majoritaire correspondait à un nouvel acide ganodérique hydroxylé en C-22 que nous avons appelé GA FWI.

De plus, l'analyse en LC-MS^n des autres composés minoritaires de cette fraction a permis de déduire la structure de deux nouveaux acides ganodériques également hydroxylé sur C-22.

Ce type d'acides ganodériques n'ayant jamais été signalé auparavant, nous en avons déduit que la structure des triterpènes de type lanostane, en particulier les acides ganodériques, différait vraisemblablement d'une espèce à une autre. GA FWI, majoritaire sur deux spécimens de la même espèce, constituerait ainsi un marqueur chimique ou un signe de distinction taxinomique permettant de reconnaître cette espèce néotropicale (*G. tuberculosum*).

C'est aussi la raison pour laquelle, nous pensons que la souche taïwanaise désignée sous le nom de *G. lucidum* et identifiée selon la classification traditionnelle à *G. multipileum* (Wang *et al.*, 2009), pourrait correspondre à l'espèce produisant majoritairement les acides lucidéniques A, B et D (Nishitoba, 1985 ; Weng *et al.*, 2007).

Enfin, la comparaison de l'activité de la fraction contenant majoritairement GA FWI avec celles des acides GA A, GA F et GA DM n'a pas permis de montrer d'activités significatives de ces composés sur cellules cancéreuses. Ce résultat a confirmé notre hypothèse selon laquelle l'activité antiproliférative proviendrait des dérivés de l'ergostérol.

Les perspectives de recherches envisageables à partir de ces différentes conclusions sont les suivantes :

- A partir de nos trois espèces actives sur cellules tumorales, il serait intéressant de comparer le pouvoir antiprolifératif des fractions éther de pétrole avec celui des fractions acides ou neutres et basiques, de manière à déterminer définitivement la nature des composés potentiellement actifs. Les résultats nous permettraient également de cibler le type de molécules à purifier (dérivés de l'ergostérol, ou triterpènes de type lanostane : ganodérols ou triterpènes acides).

- De plus, il serait intéressant d'établir le profil chromatographique de *G. multipileum*. Pour cela, il faudrait être capable d'identifier correctement cette espèce.

- Si cette espèce correspond à celle produisant les acides lucidéniques, le profil chromatographique serait alors un moyen efficace pour distinguer les deux spécimens asiatiques désignés sous le nom de *G. lucidum*. De même, leur activité antiproliférative pourrait être comparée.

En ce qui concerne les autres polypores, deux espèces ont montré une activité antiproliférative intéressante : *Pycnoporus sanguineus* et *Laetiporus* aff. *sulphureus*. Le composé de la première espèce soupçonné d'être à l'origine de l'activité antiproliférative, correspondrait à la cinnabarine, dont la structure est proche de celle de l'actinomycine D. Ce composé a, en effet, montré un pouvoir d'inhibition de prolifération significative sur cellules cancéreuses (Dias & Urban, 2009).

En revanche, le vicariant néotropical de *Laetiporus sulphureus*, pour lequel une activité antiproliférative a été démontrée, n'a pour l'instant jamais fait l'objet de recherche pour la détermination des composés actifs. De plus, l'absence d'activité significative de l'espèce européenne sur cellules cancéreuses signifierait que la forte pression de sélection existant dans les milieux tropicaux (insectes, bactéries, champignons microscopiques), entraînerait une production plus importante de métabolites secondaires potentiellement exploitables en pharmacologie.

Ainsi, les récoltes de ganoderme ou autres polypores effectuée en milieu néotropicale, dans le but de rechercher de nouvelles substances bioactives, doivent continuer. D'ailleurs certaines niches écologiques de Martinique ou de Guadeloupe, où la pression environnementale est très forte, pourraient rassembler plusieurs spécimens de familles différentes mais dont les métabolites secondaires dirigés contre une même espèce invasive, présenterait des similarités.

Enfin, la dernière perspective envisageable à partir de ce travail, serait d'effectuer l'analyse morphologique et pharmacochimique sur un plus grand nombre de spécimens retrouvés dans le cladogramme de la mycothèque de l'UCL. Une telle démarche permettrait d'établir une corrélation plus forte entre les critères morphologiques des espèces et la position de celle-ci au sein du cladogramme.

V) Partie expérimentale

A) Récolte et identification

1) Récolte

Les différents ganodermes et autres polypores ont été récoltés lors de missions effectuées aux en Martinique et Guadeloupe, organisées dans le cadre d'un programme de recherches visant prioritairement à accroître les connaissances mycologiques aux Petites Antilles (Courtecuisse, 2006). Les spécimens correspondant au *Ganoderma lucidum* asiatique ont été rapportés de Chine par Cony Decock et Inès Devred, tandis que les spécimens correspondant au *Ganoderma lucidum* européen ont été récoltés par René Pacaud en Vendée et par Cony Decock en Dordogne. Les spécimens ont été identifiés au laboratoire de mycologie de la

faculté de pharmacie de Lille par des méthodes traditionnelles et à l'université Catholique de Louvain (C.Decock) par des techniques de séquençage moléculaire.

2) Identification

a) Caractérisation morphologique

Au niveau macroscopique, le champignon est tout d'abord décrit dans son intégralité sur le frais. Pour cela, nous nous sommes aidés d'une liste qui présente l'ensemble des traits morphologiques que l'on peut retrouver chez les polypores.

Liste des caractères morphologiques retrouvés à observer et à noter dans la description des polypores

-Lieu de récolte et écologie : ces critères sont importants puisqu'ils permettent de connaître le nom du substrat (*Quercus, Salix, Betula* etc…), son état (espèce saprophyte ou parasite), la zone géographique (Afrique, Asie, Néotropiques…) ainsi que le milieu environnant d'un champignon donné (milieu tropical, tempéré, aride…). Ils permettent de retrouver plus facilement une espèce pour laquelle on souhaite approfondir des études pharmacologiques.

-Caractéristiques du chapeau :

Insertion : dimidiée, largement attachée ou stipitée

Stipe : central, excentré, latéral…

Forme générale : réniforme, semi-circulaire, circulaire, flabelliforme …

Texture : flexible, non flexible, coriace, compressible…

Dimensions : étendue, diamètre, épaisseur…

Surface : plane, concave, convexe, brillante, mate…

Relief : lisse, bosselé, boursouflé, tuberculeux, brillant, mat…

Revêtement : glabre, pubescent, tomenteux, hérissé…

Couleur : unie ou zonée : concentriquement ou disposés radialement

Zonation des reliefs : Sillons, bourrelet, plis concentriques ou radiales

Marge :

forme : ondulée, lobée, régulière, lobulée ;

couleur

relief : en bourrelet, obtus, aigu, recouvrant et encadrant l'hyménophore…

- Caractéristiques de la chair

Epaisseur du cutis

Couleur : unie, double, stratifié, zonée concentriquement ou radialement

Texture : subéreuse, ligneuse, spongieuse, lacuneuse, pleine

Epaisseur

Incrustation de bandes résineuses compactes en forme de : liseré, zébrure, fine ou épaisses…

- Caractéristiques de l'hyménophore

Pores : couleur, forme, nombre par mm…

Tubes : couleur, longueur et texture…

- Caractéristiques du stipe

Dimension, texture, forme : cylindrique, tortueuse, aplatie, racornie, élargie, cylindrique …

b) Caractérisation microscopique

La microscopie a été étudiée sur exsiccata au laboratoire de Botanique (…), sur un microscope optique Zeiss Axioscop muni d'une caméra numérique. Les observations ont été réalisées aux grossissements x 400 et x 1000, suivant les méthodes d'observation traditionnelles (Ryvarden, 2004), dans les milieux d'observation suivants : KOH (solution aqueuse à 5%), rouge Congo (1% en solution ammoniacale à 10%), et solution de Melzer (pour 20 ml : 1,5 g d'IK, 0,5 g d'I_2, 20 g de chloral hydraté, en solution aqueuse). Sont pris en compte :

- les spores : aspect, taille, ornementations, longueur, largeur, présence ou non de pores germinatif, forme de l'apex…

- les hyphes squelettiques, ligatives et génératrices du contexte ou de la trame

- le revêtement piléique (coupe radiale effectuée à la main), avec description des piléocystides lorsque le revêtement est différencié (forme, organisation dans l'espace, longueur, largeur, figés ou non dans une résine…)

c) Caractérisation moléculaire

c-1) Préparation du matériel biologique

Elle peut se faire soit à partir de souches d'herbier ou de mycélium frais cultivé en milieu liquide.

Les herbiers :

La partie contenant le plus de cellules vivantes chez les polypores se situe à la périphérie de la surface porée. Cette zone contient, en effet, de nombreuses hyphes génératrices, les cellules hyméniales (basides et basidioles), ainsi que les spores. Par conséquent, une quantité plus importante de matériel génétique peut en être extraite. Nous avons pour cela découpé de petits morceaux de carpophores au niveau de la zone indiquée, que l'on a transférés ensuite dans un tube Eppendorf d'extraction contenant une solution tampon ou détergent appelé 'Lysis buffer'. De manière à optimiser le processus d'extraction, ce procédé a été réalisé le jour de la récolte des spécimens concernés. Les tubes ont ensuite été envoyés rapidement par courrier, vers l'Université Catholique de Louvain (UCL), pour le séquençage.

Le mycélium frais :

Nous avons déposé sur un milieu gélosé, type MA2 (malt-agar 2%), fournit par la mycothèque de l'UCL, 3 à 4 petits fragments issus de la surface porée des carpophores. Cette étape a également été effectuée le jour de la récolte, pour les mêmes raisons exposées ci-dessus. Cette étape a été réalisée de manière la plus stérile possible selon les possibilités offertes sur place (voir photo). La table de travail, où se déroulaient les ensemencements, était recouverte par une feuille d'aluminium préalablement stérilisée à l'alcool 70°C (figure 119). Le découpage des carpophores s'effectuait au scalpel à usage unique. Au bout de plusieurs jours, lorsqu'un mycélium se développait, les échantillons étaient sélectionnés, tandis que les milieux présentant des contaminations (aspect luisant caractéristique des contaminations bactériennes ou alors prolifération trop rapide permettant de soupçonner la présence d'autres champignons comme des *Trichoderma* par exemple) étaient rejetés.

Figure 119: salle pour les ensemencements des milieux gélosés.

Les boîtes de pétri, contenant les mycéliums, ont été envoyés par la poste à l'UCL. A partir de ces milieux de culture, le mycélium de chaque spécimen récolté, fut prélevé puis déposé dans un milieu MA2 liquide. Ce milieu, coulé en petits Erlens de 100ml, se prépare exactement comme le milieu solide sur boîte de pétri mais ne contient pas d'agar. Le milieu pousse sur un plateau rotatif à 105 tours / mn durant environ 2 semaines. L'extraction est réalisée à partir du moment où il y a suffisamment de matériel biologique pour remplir un tube Eppendorf.

c-2) Extraction d'ADN

Les extractions ont été réalisées à l'aide du kit 'Invisorb Spin Plant Mini Kit. Des billes de silice sont introduites dans les tubes eppendorfs, contenant le matériel à extraire (herbier ou mycélium). Le matériel est ensuite broyé par centrifugation (2 fois 6000 rotations par minute durant 30 secondes). L'extraction nécessite ensuite plusieurs étapes décrites ci-dessous

Lyse du matériel

On ajoute 400 µl de Lysis Buffer P et 20µl de protéine kinase pour l'éclatement et la lyse des cellules ainsi que la dégradation de protéines telles que les histones, par exemple. Le tout est centrifugé 5 mn à 13 000 tours par mn pour la purification.

Traitement RNAse et fixation de l'ADN

4 µl de RNAase (100mg/ml) sont ajoutés au surnageant pour dégrader l'ARN, ainsi que 200µl de Binding Buffer pour augmenter la fixation de l'ADN sur les colonnes de filtration.

On assemble des colonnes de filtration dans les tubes récupérateurs puis on transfère la suspension dans la colonne.

On centrifuge pendant une minute (12 000 tours / min) puis on élimine le filtrat contenant les débris cellulaires. On replace la colonne sur le tube collecteur.

Nettoyage

On ajoute 550 µl de Wash Buffer I, on centrifuge (12 000 tours / mn) puis on élimine le filtrat pour nettoyer l'ADN.

On réitère l'opération une première fois après ajout de 550 µl de Wash buffer II puis une deuxième fois après ajout de 400 µl de la même solution pour enlever toute trace d'éthanol contenu dans la solution Wash Buffer (1 mn et 2 mn respectivement).

Elution de l'ADN

L'ADN fixé sur la colonne est ensuite élué avec 150 µl d'eau distillée stérilisée préalablement chauffée à 65°C.

On centrifuge 1 min à 10 000 tours par min, puis on récupère le filtrat contenant l'ADN dans un tube de 1,5 ml.

c-3) PCR (Poly Chain Reaction)

Principe

Cette technique décrite en 1986 par K. Mullis *et al.* permet d'amplifier, c'est-à-dire d'augmenter de manière considérable, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique, de longueur définie, dont on dispose initialement.

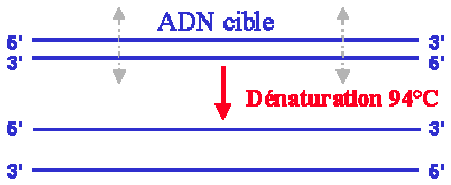
Le principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérases : celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce.

Depuis 1988, la possibilité d'utiliser une DNA polymérase non inactivée par la chaleur (Taq polymérase isolée d'une bactérie thermophile « *Thermus aquaticus* ») permet de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Cette technique nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment de DNA à amplifier. Connaissant cette séquence (une vingtaine de nucléotides), on synthétisera des oligonucléotides complémentaires appelés également 'amorces'.

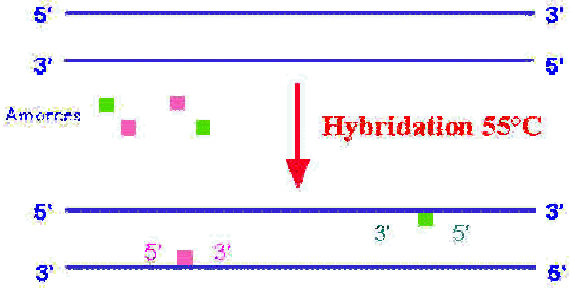
Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » définissent alors, en la bordant, la séquence à amplifier.

Des cycles successifs sont entrepris :

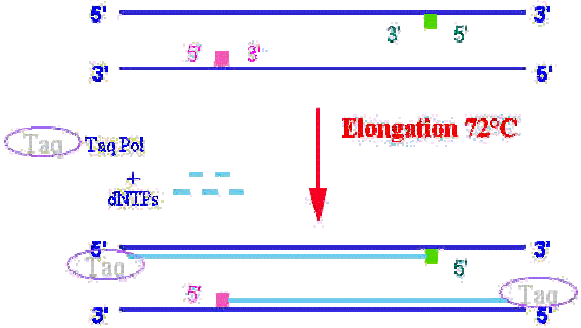
<u>Dénaturation</u> par la chaleur à 92-95°C pour séparer les deux brins de DNA,



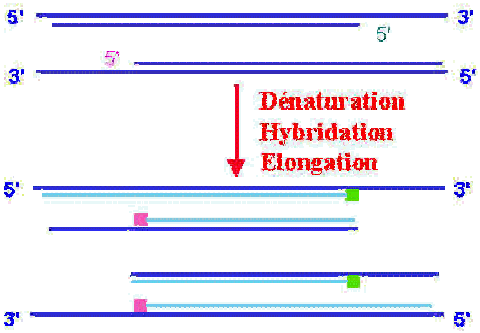
Hybridation avec les deux amorces spécifiques (par abaissement de la température à 50-55°C)



Elongation des amorces avec une Taq polymérase à 70-72°C



Le premier cycle permet de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.



Au deuxième cycle, la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.

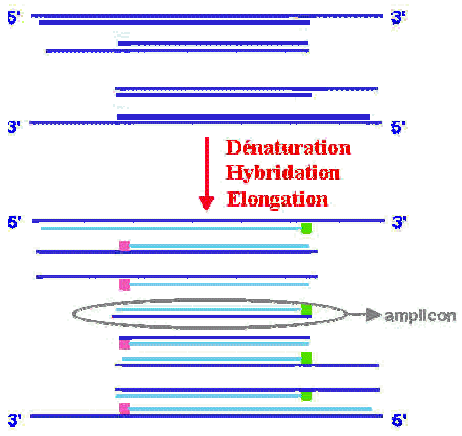


Figure 120 : figures extraits du protocole de la mycothèque de l'UCL

Au 3ème cycle apparaissent les premiers amplicons, correspondants au fragment d'ADN de longueur souhaitée (ADN court). Les brins polymérisés sur le modèle des brins synthétisés au cycle précédent sont bornés à leurs deux extrémités et leur longueur est égale à la distance qui sépare les amorces sur le brin d'ADN original.

Les brins longs continuent leur accumulation de façon linéaire car ils ne sont générés qu'à partir de l'extension des amorces sur l'ADN initial. Or la quantité d'ADN initial est fixée au départ et n'évolue pas. Par contre, les brins courts apparus à la fin du troisième cycle s'accumulent de façon exponentielle car chaque brin nouvellement formé sert de matrice lors du cycle suivant. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Mode opératoire

Les fragments d'ADN que l'on cherche à séquencer sont les régions codant pour l'ARN ribosomal et plus spécifiquement les sites internes de trancription (ITS1 et ITS2) utiles pour différencier les espèces (Moncalvo, 1995).

- Les amorces utilisées

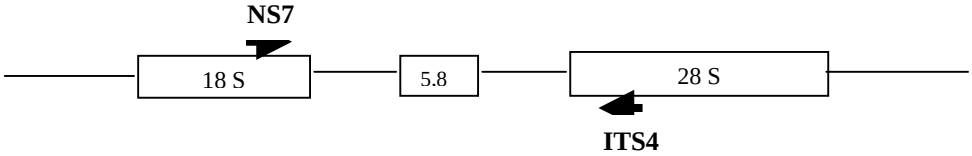


Figure 121 : Schéma de l'ADN ribosomique nucléaire et des amorces utilisées (Gardes &Bruns, 1993)

Nom de l'amorce	Séquence (5'->3')	référence
NS7 (ITS) I4 (ITS)	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(Symoens, 2000) (White *et al.*, 1990)

Tableau 13 : amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification des 2 marqueurs (ITS1 et ITS2) moléculaires.

L'amorce NS7 correspond à une région de l'ADN beaucoup plus stable que celle correspondant à l'amorce ITS1. C'est la raison pour laquelle elle a été choisie ici.

Préparation du mélange

Le mélange est préparé sur glace, puis réparti dans les mini-Eppendorfs. Chaque mini-Eppendorf contient 50µl de volume réactionnel comportant :

- 28,5 µl d'eau
- 5µl de Buffer
- 3 µl de $MgCl_2$
- 1 µl de dNTP (10mM de chaque nucléotide, concentration finale : 200 µM
- 1µl de l'amorce forward (10µM, concentration finale : 0,1µM)
- 1 µl de l'amorce reverse (10µM, concentration finale : 0,1µM)
- 0,5µl de Taq polymérase (5 unités / µl, concentration finale : 0,05 unités/µl)

- 10µl d'ADN (10 µl d'eau pour le témoin négatif) (10 ng/µl, concentration finale : 200pg/µl)

Si 24 mini-Eppendorfs sont utilisés, on multiplie les quantités de volume par 24.

Programme des températures pour la réaction PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les minis Eppendorf sont transférés dans un Peltier Thermal Cycler – 200 qui accomplira les cycles de variation de température

Région amplifiée	Températures (°C)	Durée (minutes)	Nombre de cycles total
ITS	94	3	
	94	1'30	
	55	1'30	30 X
	72	2	
	72	10	
	4	INFINI	

Tableau 14 : cycles de variation de température pour la PCR

Au fil des cycles la quantité d'amplicon va augmenter de façon exponentielle. On obtient, en théorie 2^n copies pour n cycles. Dans la pratique, pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produit environ 10^6 copies (amplicons de taille attendue).

c-4) Electrophorèse

Elle permet de s'assurer que la réaction PCR a eu lieu et qu'il n'y a pas d'ADN contaminant. L'ADN, chargé négativement, migre à travers un gel d'agarose grâce à l'influence d'un champ électrique. Des marqueurs de poids moléculaire sont déposés et migrent parallèlement au DNA à étudier. Le DNA est repéré par fluorescence aux UV après l'avoir mis en contact avec du bromure d'éthidium (BET). En comparant l'emplacement du DNA avec celui des marqueurs (dans ce travail : DNA middle range fast), on peut évaluer le nombre de paires de bases du fragment amplifié et ainsi repérer d'éventuels contaminants.

c-5) Purification

Elle permet d'enlever les résidus issus des réactifs précédents (Primers, Buffer, Taq polymérase en excès) qui peuvent interférer avec l'opération de séquençage. Pour cela on utilise un kit d'extraction d'Invisorb (MSB Spin PCRapace 500 proposé par Invitek GmbH). Les produits issus de la PCR sont transférés dans des Eppendorfs de 1,5 ml dans lesquels on ajoute 250 µl de Binding Buffer. On assemble les colonnes (identique à celle utilisées pour l'extraction) sur les tubes receveurs dans lesquelles on transfère le mélange. Après centrifugation, l'ADN fixé sur les colonnes est élué avec de l'eau distillée stérilisée par centrifugation.

c-6) Séquençage

Principe :

Les techniques de séquençage utilisent des enzymes particulières : les ADN polymérases. Ces enzymes sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Ces réactions se font par ajout de désoxyribonucléotides (dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate). On utilise pour le séquençage des nucléotides légèrement différents : les didésoxyribonucléotides (ddNTP).

Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3' (figure 122) En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

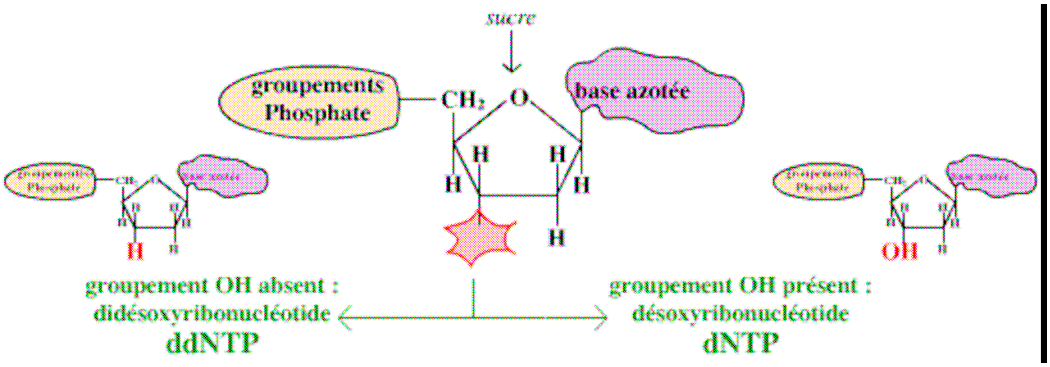


Figure 122 : extrait du protocole de la mycothèque de l'UCL : structure des didésoxyribonucléotides et des désoxyribonucléotide

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné. Une ADN polymérase n'est pas capable de débuter la synthèse d'un brin d'ADN à partir de rien. Il lui faut partir d'un court fragment d'ADN, appelé une amorce. Cette amorce est un oligonucléotide de 15 à 25 nucléotides, complémentaire d'une séquence d'ADN connue, située juste en amont de l'ADN à séquencer. Les séquences sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de lire les réactions de séquences : pour cela, on marque les fragments d'ADN grâce à des marqueurs fluorescents présent dans les ddNTP (figure123)

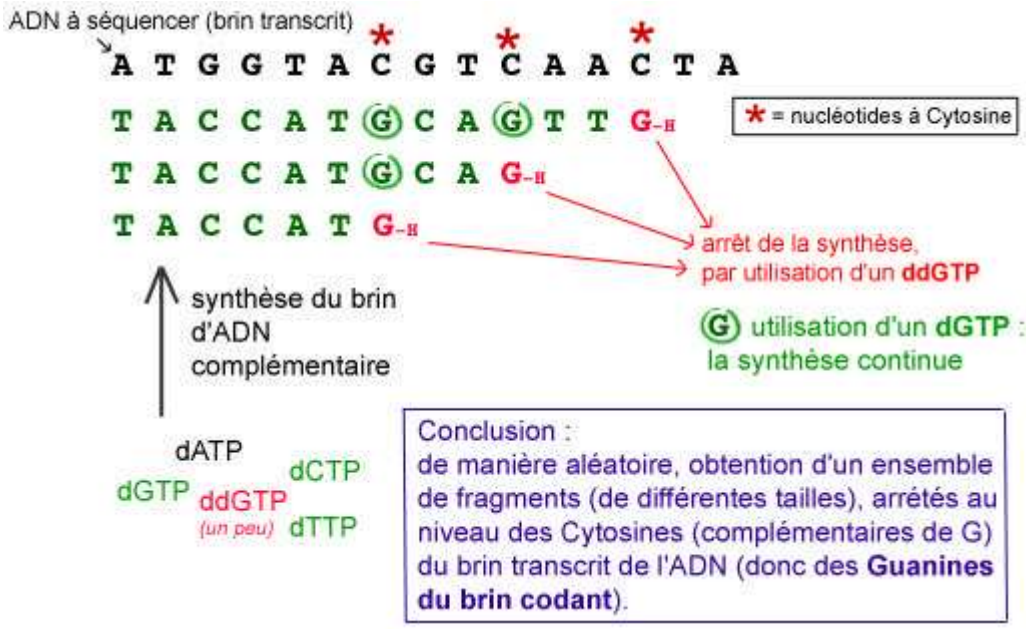


Figure 123 : extrait du protocole de la mycothèque de l'UCL : méthode de lecture des gènes séquencés

Mode opératoire (voir protocole de la mycothèque de l'UCL en annexe 1)

Amorces utilisées

Nom de l'amorce	Séquence (5'->3')	référence
ITS2 ITS3 ITS4	GCTGCGTTCTTCATCGATGC GCATCGATGAAGAACGCAGC TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White, 1990)

Tableau 15 : séquences des amorces

Les séquences obtenues avec le primer ITS4, sont trop longues à analyser (environ 1200 paires de bases), c'est la raison pour laquelle on utilise également des primers internes ITS2 et ITS3 (figure 124) Les séquences à analyser ne font plus que 500 pdb environ

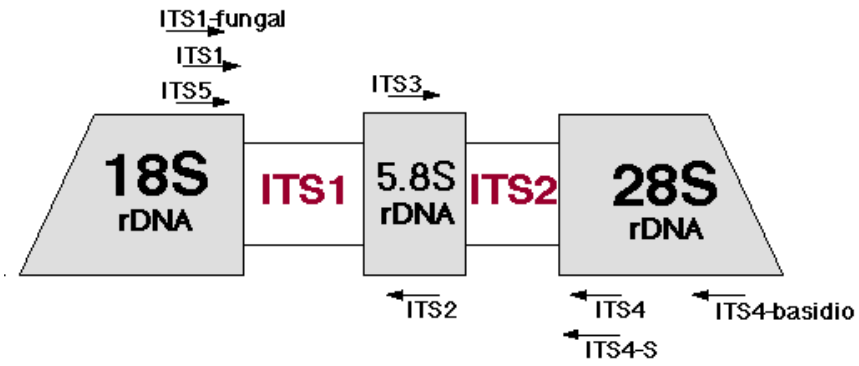


Figure 124 : emplacements approximatifs des amorces pour le séquençage des ITS

c-7) Analyse des séquences d'ADN

Principe

La très grande majorité des séquences réalisées et publiées aujourd'hui sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire : pour cela, on marque les fragments d'ADN grâce à des marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Les systèmes les plus modernes permettent même de lire les quatre nucléotides à partir d'une seule colonne de chromatographie. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en est faite en termes de nucléotides.

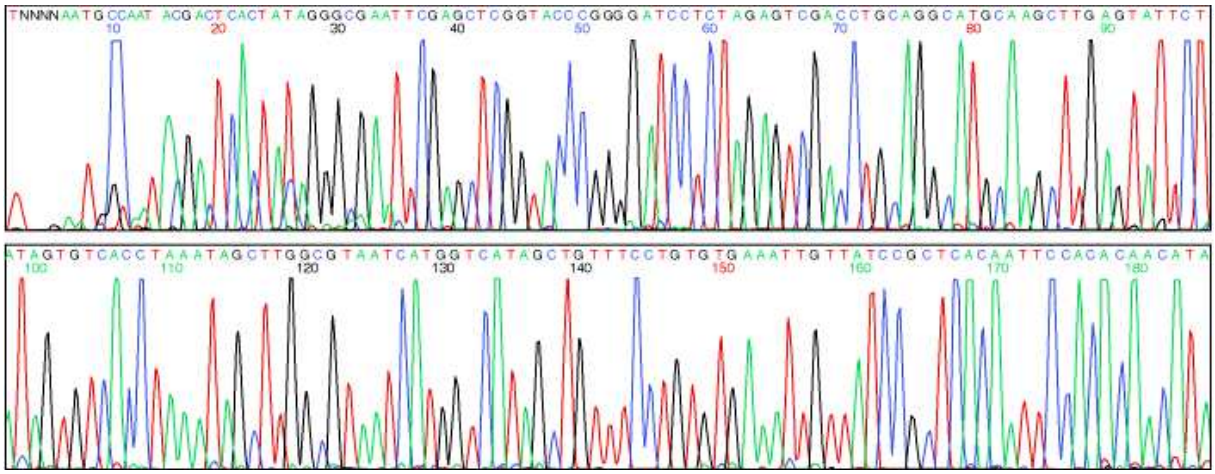


Figure125 : extrait du protocole de la mycothèque de l'UCL. Exemple d'enregistrement à partir d'un séquenceur automatique.

Dans ce travail, l'analyse des séquences ITS obtenues à partir des spécimens récoltés, a été effectuée par un séquenceur de type capillaire 2000 XL Beckman Coulter.

Sous l'action d'un haut voltage et d'un champ électrique déterminé, l'électrophorèse capillaire permet la migration et la séparation de fragments d'acides nucléiques chargés au travers d'un capillaire. Ces fragments d'acides nucléiques sont marqués au préalable avec quatre marqueurs spécifiques dont la fluorescence se situe dans la région rouge du spectre. Les fluorescences induites sont collectées par un photomultiplicateur. Les données brutes sont ensuite analysées par le logiciel CEQ^{TM} XL version 4.3.

Les séquences ITS2, 3 et 4 sont comparées, confrontés entre elles de manière à établir les concordances entre ITS2 et ITS4 ainsi qu'entre ITS3 et ITS4. Les résultats non concordants entraînent une réitération du séquençage des ITS du spécimen concerné.

B) Préparation des extraits de ganodermes et des autres polypores pour les tests pharmacologiques (MTT), les analyses en CCM et en LC-MS

1) Nettoyage des carpophores, sélection des spécimens et extraction

De manière à préparer correctement les extraits à tester sur cellules cancéreuses, il est crucial de respecter en amont certaines règles au moment de la récolte. Avant tout, pour chaque spécimen, la quantité trouvée sur le terrain doit être suffisamment importante pour la recherche ultérieure de molécules potentiellement actives. Ensuite, les spécimens doivent être rapidement séchés sur place durant 12 à 24 heures à l'aide d'un exsiccateur pour éviter les contaminations bactériennes, fongiques et les dégradations provoquées par les insectes.

Une fois les spécimens rapportés au laboratoire, les champignons sont à nouveau mis à sécher à 40°C pendant une semaine. Ensuite les carpophores sont nettoyés, découpés en petits morceaux et enfin hachés à l'aide d'un hacheur à lame puissante (Model : Microtron MB 550 Kinematica AG).

Dix grammes de chaque broyat sont extraits avec du méthanol (environ 200 ml) à température ambiante (20°C) pendant 5 jours et sous agitation à l'aide d'un agitateur rotatif (200 rpm). Après filtration, le solvant des filtrats est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2) Préparation des solutions « Poids/volume » à partir des extraits méthanoliques

Pour un extrait sec obtenu à partir de la macération de 10 g de matière sèche de sporophore dans le méthanol, on fait correspondre un volume égal à ***x*** X 10 ml**.** ***x*** étant égal au nombre de volume de 10 ml qu'il aura fallu pour dissoudre 1 poids d'extrait correspondant à 10 g de matière sèche.

La concentration finale de la solution obtenue sera égale à 10 g de matière sèche / *x* volume de solvant. Les solutions choisies sont souvent le méthanol ou l'éthanol, parfois le $CHCl_3$ ou

l'eau à de faible quantité (0,5 à 1 ml) pour éviter le risque d'altérations des composés ou la contamination des extraits.

3) Lyophilisation

On a retiré des solutions poids / volumes l'équivalent de 5g (par exemple, si la solution utilisée possède un rapport de 1 poids / 5 volumes, on prélèvera l'équivalent de 25 ml). Les solvants constituant les solutions poids / volumes ont été évaporés au rotavapor, puis les extraits secs ont été remis en solution aqueuse pour être lyophilisé à -50°C sous vide (Telstar® Cryodos -50) pendant environ 24 h. Les lyophilisats stockés à 4°C en chambre froide ont été utilisés pour les tests pharmacologiques (MTT, voir ci-dessous). Les lyophilisats ont ensuite été solubilisés dans le DMSO, puis filtrés à l'aide d'un filtre à 0,22 µm avant d'être testés sur les cellules humaines cancéreuses. Certains des extraits, notamment ceux ayant présenté une forte inhibition sur cellules cancéreuses, ont été étudiés en chromatographie de masse (LC-MS et LC-MS^2).

4) Tests cellulaires : mesure du pouvoir antiprolifératif des lyophilisats

Les tests cellulaires ont été réalisés à l'ICPAL en collaboration avec Amélie Lemoine.

Pour la sélection des extraits d'intérêt thérapeutique, 3 lignées cellulaires ont été utilisées :

La première correspond à des cellules prostatiques humaines hormono-indépendantes et issues de métastases osseuses **PC-3.**

La deuxième correspond à des cellules humaines provenant d'un adénocarcinome mammaire pour les cellules **MCF-7**.

La dernière correspond à des cellules humaines provenant d'un adénocarcinome colorectal de grade II **HT29.**

a) Cuture de cellules

Les lignées PC-3, MCF-7 et HT29 ont été cultivées respectivement dans les milieux RPMI-1640, DMEM et MEM supplémentée avec 10% du sérum de veau fœtal (SVF), 1% de

glutamine, 100 IU.ml.$^{-1}$ de pénicilline et 100 µg ml.$^{-1}$de streptomycine. Les cellules sont cultivées en monocouche dans des flacons plastiques de 75 cm^2 placés à 37°C sous une atmosphère humide et enrichie à 5% de CO_2. Les cellules sont ensuite décollées par une solution de trypsine et d'EDTA.

b) Mesure de la prolifération cellulaire

Test MTT : principe

La mesure de la prolifération repose sur le test MTT d'après la méthode de Hirst et collaborateurs. Cette méthode permet de quantifier l'activité enzymatique de la succinyl déhydrogénase mitochondriale, enzyme présente et active dans les cellules vivantes, capables de cliver un sel de tétrazolium de couleur jaune soluble dans l'eau, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (ou MTT) en un dérivé formozan de couleur bleue, insoluble dans l'eau. Les cristaux formés sont ensuite dissous avec une solution SDS (dodécylsulfate de sodium) solubilisé dans HCL. L'absorbance de la solution est déterminée à 570 nm avec une correction à 630 nm.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques à 96 puits (30000 cellules par puits) et incubées pendant 72 h. Elles sont ensuite lavées avec une solution de PBS et maintenus dans leur milieu de culture dépourvu de SVF et donc de facteur de croissance pendant 24 h afin de synchroniser les cellules.

Les résultats sont exprimés en % de croissance :

$$\textbf{\% de croissance} = [(A_J - A_{J0})/A_{J0}] \times 100$$

A : valeur de l'absorbance

J_0 : le premier jour de traitement

J : le dernier jour de traitement

On rapporte au pourcentage de croissance du témoin soit 100 % les valeurs obtenues. On en déduit les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire. Les valeurs obtenues sont ensuite rapportées au pourcentage de croissance du témoin (fixé à 100 %), ce qui permet d'en déduire les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire.

C) Partie analytique

1) CCM (Chomatographie sur Couche Mince)

Les solutions poids/volumes évoquées ci dessus permettent d'adapter pour chaque extrait brut, les quantités de volume à déposer en CCM pour que chaque dépôt corresponde à une masse de matière sèche identique.

Les extraits obtenus sont dilués dans un minimum de solvant puis déposés sur un gel de silice 'Polygram SIL G/ UV_{254}', d'épaisseur 0,20mm avec indicateur de fluorescence $UV_{254.}$ Le support plastique sur lequel est déposée la silice est mis dans une cuve contenant une phase mobile (éluant) qui va migrer. Les composés de l'extrait seront retenus différemment selon leur poids moléculaire, leur affinité entre la silice et l'éluant.

Selon le contenu de l'extrait et le degré de polarité de l'éluant, on aura un profil de migration différent. Cette technique nous a permis d'obtenir une première approximation sur la pureté des fractions obtenues après un processus chromatographique ou d'établir un profil chromatographique des extraits brut. Elle nous a permis également de connaître la nature de certains composés, soit par des niveaux de migration identique à des substances témoins, soit par la vaporisation de substances chromogènes.

- l'anisaldéhyde sulfurique pour la révélation des terpènes ou des triterpènes, des stéroïdes, des phénols, des sucres (Bolliger, 1965).

- le réactif de Dragendorff a également été utilisé pour la révélation de composés possédant un azote hétérocyclique.

Chaque CCM est observée à des longueurs d'onde égales à 254 nm et 366 nm afin de visualiser les composés comportant des doubles liaisons

2) Analyse LC-MS

Les analyses des spectres de masse sont effectuées au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA), avec la collaboration de Nathalie Duhal (Ingénieur au CUMA), sur un appareil de type 'Surveyor MSQ Thermo-Finnigan' simple quadripôle couplé à un chromatographe en phase liquide. Cet ensemble couplé est équipé d'une pompe quaternaire, d'un détecteur à barrette de diodes (PDA), d'un échantillonneur automatique et d'un compartiment pour colonne thermostatée. Les échantillons sont analysés à la concentration de 1 $mg.ml^{-1}$.

Le spectromètre de masse dispose de deux sources d'ionisation : ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et ionisation par électronébulisation (ESI).

Des essais ont été réalisés sur ces deux types de sources.

a) Premier essai

Dans un premier temps, les échantillons ont été séparés puis identifiés sur une colonne ODS en phase inverse (50 mm X 4,6 mm) couplée à un détecteur de masse en mode APCI positive.

Ce mode opératoire réalisé en routine par l'ICPAL a été abandonné par la suite en raison de la mauvaise résolution des pics chromatographiques obtenus pour nos extraits et du mode d'ionisation non adapté à l'ensemble des composés recherchés.

b) Deuxième essai

Dans un deuxième temps, les échantillons ont été analysés sur une colonne Zorbax SB-C18 en phase inverse (4,6 mm X 250 mm ; 5 µm ; Agilent) couplée à un détecteur de masse en mode ESI positive. A la sortie de la colonne, nous avons appliqué un split 2 : 1 sur l'effluent arrivant au niveau de la source ESI. La longueur d'onde du détecteur à barrette de diodes (PDA) est fixée à 252 nm (Yang *et al.,* 2007), et les composées sont détectés par balayage UV entre 190 et 400 nm. Ainsi, ils sont caractérisés par leur temps de rétention (t_R) et par leur masse moléculaire (*m/z*) . Le voltage du spray a été programmé à 3 kV et la température du gaz de nébulisation à 350°C. La différence de potentiel appliquée au cône d'entrée de la source est de 30 V. L'acquisition des données a été réalisée en mode full scan. 10 µl de solution méthanolique filtrée (0,22 µm) concentré à 1 $mg.ml^{-1}$ sont injecté dans la colonne. L'élution des molécules se fait en mode gradient.

Solvant A = H_2O et Acide formique 0,1 %

Solvant B = Acétonitrile et acide formique 0,1 %

Phase mobile utilisée

Temps (min)	Débit : ml / min	A %	B %
0	1	100	0
1	1	100	0
15	1	40	60
45	1	10	90
50	1	10	90
54	1	100	0
57	1	100	0

Tableau 16 : gradient d'élution utilisé pour l'analyse en LC-MS et LC-MS^2 des extraits bioactifs

3) Analyses en LC-ESI-MS^2

Les analyses sont réalisées au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses avec la collaboration de Mostafa Kouach (Ingénieur au CUMA). Le système HPLC est équipé d'une

pompe LC Perkin série 200, d'un échantillonneur automatique et d'une colonne SB-C18 Zorbax en phase inverse (4,6 mm X 250 mm ; 5 µm ; Agilent). Les éluants utilisés sont : H_2O contenant HCOOH 0,1 % (A) et CH_3CN contenant HCOOH 0,1 % (B). Le gradient d'élution utilisé sont les mêmes que ceux décrits ci-dessus. 10 µl de chaque solution méthanolique contenant les extraits ou les fractions purifiées à 1 $mg.ml^{-1}$ sont injectés à l'entrée de la colonne. A la sortie de la colonne, nous avons appliqué un split 2 : 1 sur l'effluent arrivant au niveau de la source ESI. La détection a été effectuée par ESI mode négatif sur un appareil de type API 3000, spectre de masse équipé d'un système en triple quadripole (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le voltage du spray est réglé sur -4,5 kV et la température du gaz auxiliaire (dryer or turbo ion spray) à 450°C. La tension de l'orifice (DP) est de – 60 V. L'énergie de collision utilisée a été de -10 à -60 V selon les résultats obtenus. L'acquisition des données s'effectue en mode balayage 'full scan mode' et en mode de fragmentation d'un ion parent et détection des ions produits (MS-MS "product ion scan"). Le logiciel d'analyse des données 'Analyst software 1.4.1 (Perkin-Elmer Sciex) a été utilisé pour le traitement des données.

4) RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire sont réalisés au laboratoire de Physique et d'Application RMN, avec la collaboration du Professeur Nathalie Azaroual. L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker AVANCE 500 équipé d'une sonde TXI, opérant à une fréquence de résonance en proton de 500 MHz et 125.8 Mhz en carbone. Les molécules sont solubilisées dans $CDCl_3$ avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence pour le déplacement chimique (ppm). Toutes les expériences RMN ont été réalisées à 22°C avec les séquences de RMN en une et deux dimensions, DEPT, corrélations homonucléaires scalaires ^1H-^1H (COSY), corrélations dipolaires homonucléaires ^1H-^1H (NOESY), corrélation ^1H-^{13}C à travers 1 liaison (HSQC) et corrélation ^1H-^{13}C à travers 2 ou 3 liaisons (HMBC). Les abréviations s, sl, d, dd, t, q et m se réfèrent respectivement à des signaux sous forme de singulet, singulet large, doublet, doublet dédoublé, triplet, quadruplet et multiplet non résolu ou complexe.

D) Fractionnement des extraits, méthodes préparatives

1) Extraction des composés apolaires et acides des extraits méthanoliques SW6 et SW45 (*G. tuberculosum*)

Ce processus a pour but d'isoler dans un premier temps les composés fortement apolaires de type ergostérol ou acides gras saturé ou insaturé (Kohda, 1985 ; Smânia, 1999) puis les acides ganodériques ou autres triterpènes présentant un groupement carboxylique (Nishitoba, 1984). Les extraits secs méthanoliques sont mis en suspension dans une solution hydro-alcoolique CH_3OH-H_2O (9:1) puis extraits, dans une ampoule à décanter, à l'éther de pétrole dans un premier temps puis au chloroforme. Les deux fractions obtenues sont séchées préalablement au sulfate de sodium anhydre, puis filtrées. La solution chloroformique est concentrée au 1/10^{ème}de son volume original, puis extrait avec une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$. La phase aqueuse basique est acidifiée à pH=3-4 avec une solution 6N d'HCl à 0°C puis extrait plusieurs fois au chloroforme tandis que le précipité formé au cours de l'acidification est solubilisé dans le chloroforme.

Cette méthode a été appliquée pour 3,5 g de matière sèche, calculé à partir de la solution poids/volume de SW6, et pour 166g de SW45. Ce dernier a été extrait dans les mêmes conditions exposées ci-dessus (5 jours à 20°C, sous agitateur rotatif) excepté la solution hydro-alcoolique du départ qui a été séchée puis remise en suspension dans l'eau avant son extraction au chloroforme. Les fractions obtenues à partir de l'extrait méthanolique SW6 ont été testées sur PC3 et analysées sur CCM, tandis que les fractions apolaires (EP) et acides (A) issues de SW45 ont été analysées en LC-MS et fractionnées sur colonne de Silice à pression atmosphérique.

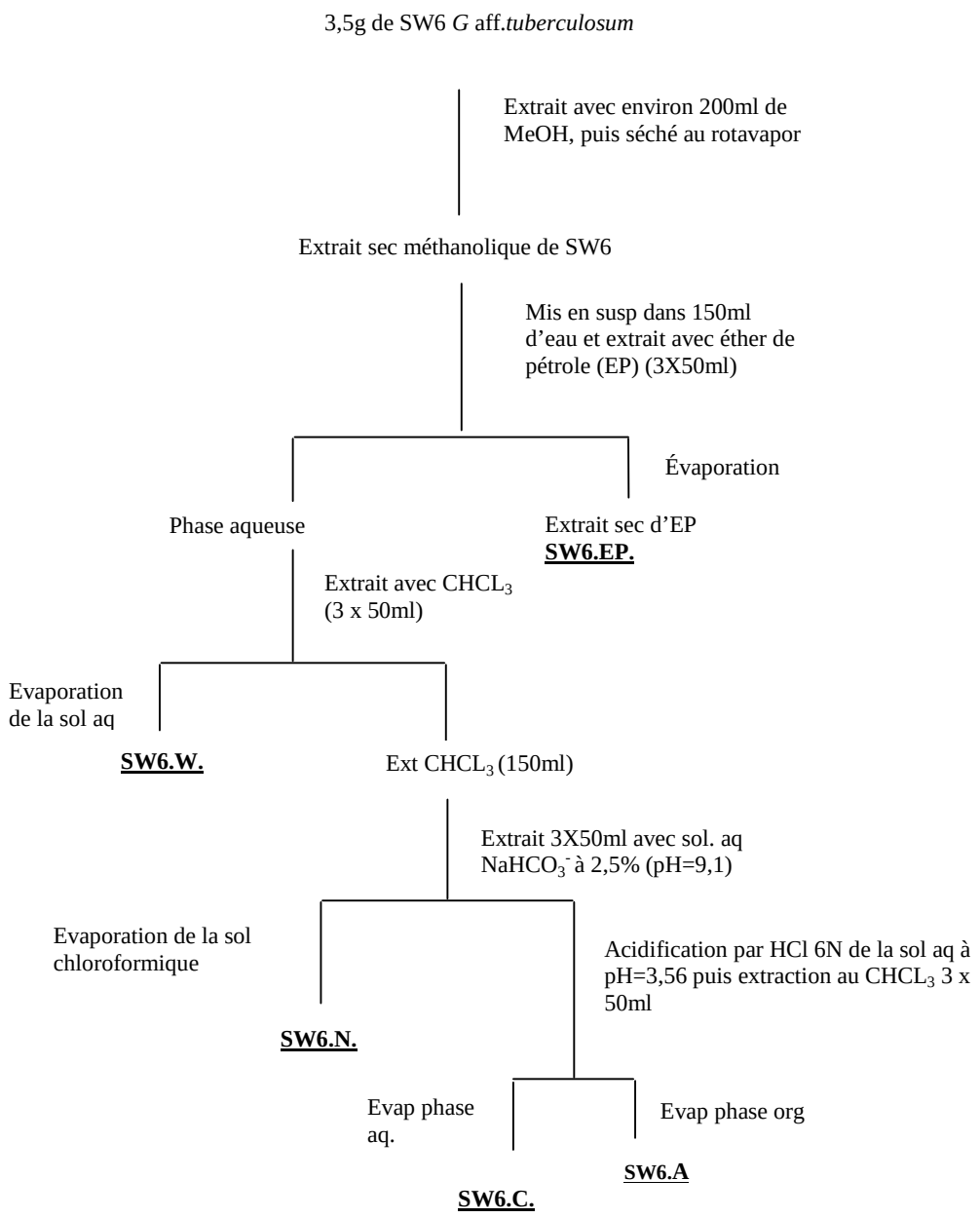


Figure 126 : schéma d'extraction de SW6

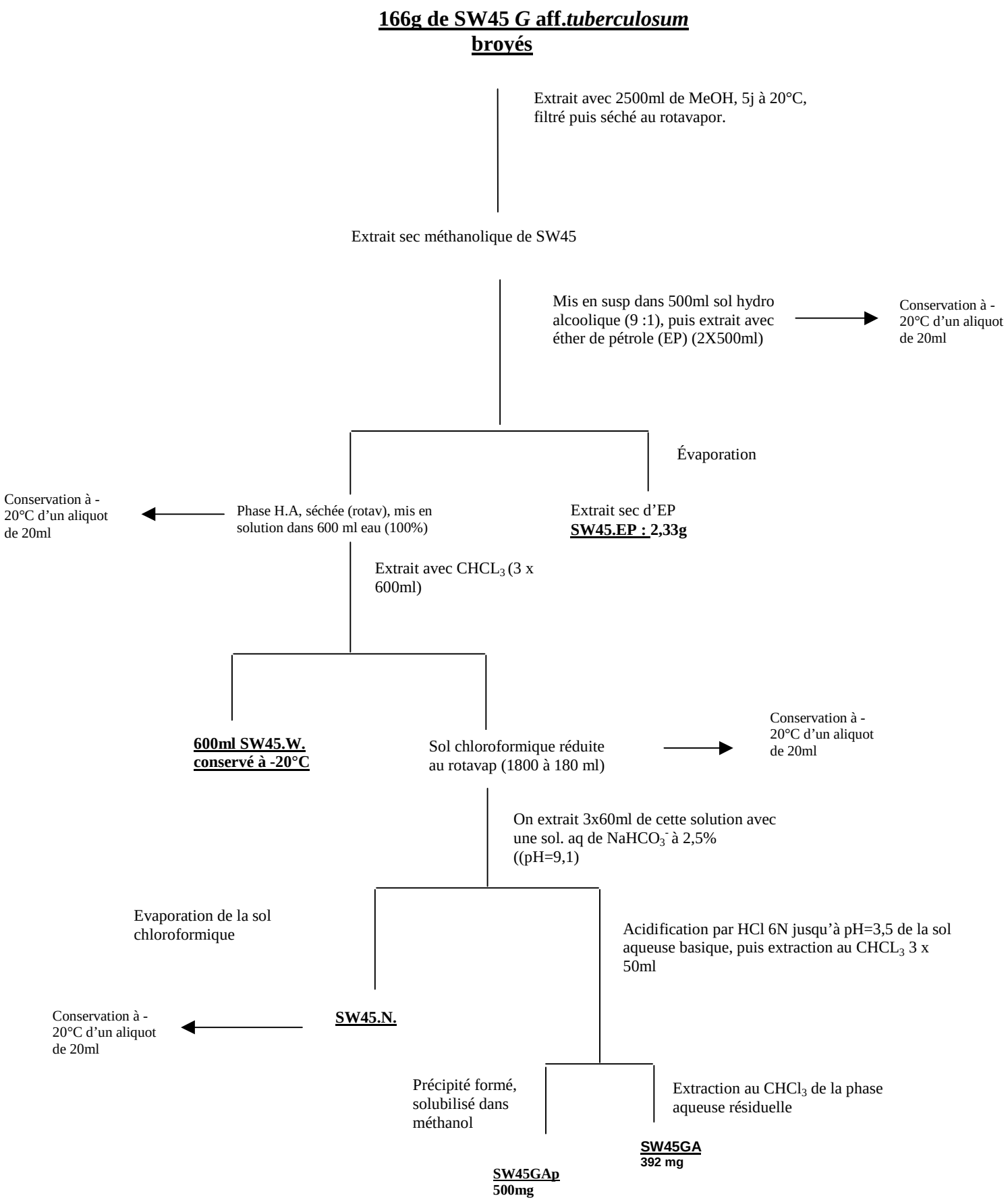


Figure 127 : schéma d'extraction de SW45

2) Fractionnement et purification des composés à partir de SW45

a) Fractionnement de SW45.EP par flash chromatographie

SW45.EP (2,33g) a été fractionnée par chromatographie flash , couplée à un détecteur UV sur gel de silice Merck 60 (0,015-0,040 mm) à l'aide d'un appareil de type spot flash system de chez Armen Instrument. Plusieurs élutions successives ont été réalisées : Heptane, Heptane-Acétone (95 : 5), Heptane-Acétone (70 : 30), Heptane-Acétone (50 : 50) puis par du méthanol (rinçage) et contrôlée par CCM. Les éluats ont été séparés en 8 fractions **(de FrI à FrVII)** de poids respectifs : 327, 8, 5, 633, 33, 64 et 30 mg. La fraction I et II (327 mg + 8 mg) ont été réunies pour donner la fraction **FrI'**.

Eluant	Fraction(s) obtenue(s)	Poids (mg)
Heptane		
Heptane-Acétone (95 : 5)	FrI et FrII	327 et 8
Heptane-Acétone (90 : 10)	FrIII	5
Heptane-Acétone (70 : 30)	FrIV et FrV	633 et 33
Heptane-Acétone (50 : 50)	FrVI	64
Méthanol (rinçage)	FrVII	30

Tableau 17 : gradient d'élution utilisé pour le fractionnement de SW45.EP

La fraction FrI et FrII on été réunis en une fraction après comparaison de leur profil chromatographique sur CCM : **FrI'**

b) Fractionnement de FrI' par chromatographie sur colonne de silice

Les purifications par chromatographie sur colonne ont été réalisées sur un gel de silice de 60 de granulométrie 0.063-0.200

La fraction **FrI'** a été fractionnée sur colonne de silice (30g) par élution successive.

Eluant	Volume (ml)	Fraction(s) obtenue(s)	Poids (mg)
Heptane-Acétone (99 : 1),	600	FrI'_A et FrI'_B	244 et 23
Heptane-Acétone (98 : 2),	300	FrI'_C et FrI'_D	10 et 15
Heptane-Acétone (97 : 3)	150	FrI'_E	
Heptane-Acétone (95 : 5)	100	FrI'_E	24
Heptane-Acétone (80 : 20),	120	FrI'_F	20

Tableau 18 : gradient d'élution utilisé pour le fractionnement de FrI'

Les éluats ont été séparés en 6 fractions (de **FrI'_A à FrI'_F**) de poids respectifs : 244, 23, 10, 15, 24, et 20 mg

c) Fractionnement de FrI'$_A$ par CCE (Chromatographie sur Couche Epaisse)

Le principe est le même que pour une CCM, excepté l'épaisseur de la silice qui permet le dépôt d'une plus grande quantité d'extrait. Cette méthode est utilisée à des fins préparatives, puisque chaque niveau de migration, correspondant à une ou plusieurs molécules, absorbant à 254 ou 366 nm est délimité à l'aide d'une fine pointe de spatule. Chaque zone est ensuite grattée et récupérée dans un Erlen. La silice contenant la fraction ou la molécule recherchée est ensuite extraite à l'aide d'un solvant (CH_2Cl_2-MeOH : 80 / 20) sous agitation. La silice est ensuite soustraite par filtration et le solvant évaporé au rotavapor. Le degré de pureté de la fraction sèche est ensuite analysé par LC-MS. Si la fraction est suffisamment pure, la structure moléculaire pourra être étudiée par RMN, LC-MS-MS, IR, point de fusion et. De même, elle pourra être étudiée pharmacologiquement (Test MTT).

La fraction FrI'$_A$ a été fractionnée sur CCE par l'éluant Hexane-Acétone (9 : 1) pour donner 5 fractions (de **FrI'$_{A-1}$ à FrI'$_{A-5}$**) de poids respectifs : 74, 116, 44, 10 et 0.1 mg.

d) Fractionnement de SW45GAp

d-1) Sur colonne de Silice

250 mg de la fraction SW45GAp, enrichie en composés acide et issue du précipité, sont déposés sur colonne de silice puis élués successivement par :

Eluant	Volume (ml)	Fraction(s) obtenue(s)	Poids (mg)
$CHCl_3$	360		
$CHCl_3$-CH_3OH (99 : 1)	180	FGA_I	23
$CHCl_3$-CH_3OH (98 : 2)	180	FGA_{II}-FGA_{III}	13
$CHCl_3$-CH_3OH (97 : 3)	90	FGA_{III}	2
$CHCl_3$-CH_3OH (96 : 4)	90	FGA_{IV}	23
$CHCl_3$-CH_3OH (95 : 5)	120	FGA_V	16
$CHCl_3$-CH_3OH (93 : 7)	200	FGA_{VI}	25
$CHCl_3$-CH_3OH (90 : 10)	200	FGA_{VII}	
$CHCl_3$-CH_3OH (85 : 15)	400	FGA_{VII}-FGA_{VIII}	21
$CHCl_3$-CH_3OH (82 : 18)	200	FGA_{VIII}	75
$CHCl_3$-CH_3OH (75 : 25)	300		
$CHCl_3$-CH_3OH (65 : 35)	60		
$CHCl_3$-CH_3OH (50 : 50)	60		
CH_3OH	200		

Tableau 19 : gradient d'élution utilisé pour le fractionnement de SW45GAp

d-2) Par CCE

Les fractions FGA_{VI} - FGA_{VII} ainsi que les fractions FGA_{IV}-FGA_{V} ont été réunies 2 à 2 pour donner FGA_{VI-VII} et FGA_{IV-V} Ces deux nouvelles fractions ont été ensuite fractionnées par CCE.

e) Chromatographie semi-préparative de SW45GA

e-1) Appareillage

Les analyses de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Analytique, avec la collaboration de Cécile Danel (Maître de conférence au laboratoire de chimie analytique), sur une chaîne WATERS équipée d'un détecteur Waters UV PDA M 996 et d'une pompe W600. Les injections des solutés ont été réalisées à l'aide de boucles calibrées, de volume variant entre 20 et 100 µL.

e-2) Analyse de SW45GA en CLHP

Nous avons d'abord utilisé une colonne de type C-18 Platinium (250 x 4,6 mm ; 5 µm). L'élution a été réalisée à chaque fois en mode isocratique. Plusieurs types de phase mobile ont été testés. En premier lieu, nous avons utilisé un mélange **Méthanol / Eau** pour lequel nous avons fait varier, d'une analyse à une autre, les proportions: de 25 / 75 à 70 / 30 (v/v). En second lieu, nous avons utilisé un mélange **Acétonitrile / Eau** [proportions testées : de 10 / 90 à 50 / 50 (v/v). L'ajout de TFA (0,05 %) ou d'acide acétique à 0,5 % a également été testé. Le débit était de 1 ml/min, la température de 30°C, et pour chaque analyse 20 µL d'une solution à 1 mg/ml de SW45GA ont été injectés.

Ensuite, nous avons utilisé 2 colonnes de type polysaccharide, la cellulose ODH (250 x 4,6 µm ; 5µm) ainsi que la cellulose OJ (250 x 4,6µm ;10µm). L'élution a été effectuée en mode isocratique à 0,8 ml/min. Pour chaque colonne de type cellulose, 3 proportions différentes de phase mobile (Hexane / Ethanol) ont été testées 70 / 30 ; 80 / 20 ; 90 / 10 (v/v). Vingt microlitres d'une solution à 1mg/ml ont été analysées.

Pour l'ensemble des analyses, les produits sortants ont été enregistrés par un balayage UV de 193 à 400nm. Les chromatogrammes ont été extraits à 254 nm (correspondant au λ_{max} des composés).

e-3) Chromatographie semi-préparative de SW45GA

La colonne de type OD (97,9 x 10 µm ; 20 µm) ainsi que la phase mobile Hexane / Ethanol 90 / 10 (v / v) en mode isocratique ont été sélectionnées pour la chromatographie semi-préparative de SW45GA. Le débit utilisé a été de 2,4 ml et la température de 30°C. Après une étude de surcharge en volume et en concentration, il a été montré que l'injection de 100 µL d'une solution contenant SW45GA à 16 mg/ml (soit 1,6 mg injecté) permettait de maintenir une résolution correcte. Quarante mg de SW45GA ont ainsi été fractionnés de manière à obtenir 4 fractions purifiées : $GA_{\mathbf{F\alpha}}$ (3,78 mg); $GA_{\mathbf{F\beta}}$ (2,05 mg), $GA_{\mathbf{F\gamma}}$ (4,42 mg), $GA_{\mathbf{F\delta}}$ (6,5 mg). Chacune de ces fractions a été analysée en LC-ESI-MS mode positif, ainsi qu'en RMN ^{1}H.

Annexe 1 : réaction de séquençage, protocole de la mycothèque de l'UCL

Notions théoriques de la méthode

Le séquençage

Les techniques de séquençage utilisent des enzymes particulères : les ADN polymérases. Ces enzymes sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Ces réactions se font par ajout de désoxyribonucléotides (dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate). On utilise pour le séquençage des nucléotides légèrement différents : les didésoxyribonucléotides (ddNTP).
Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête...

Une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer. Dans le milieu de réaction se trouvent des dNTP en grand nombre, et une faible proportion d'un ddNTP (à Adénine, ou Guanine, ou Thymine, ou Cytosine). A un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase. Cette synthèse s'arrêtera donc à cet endroit.
L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacement d'un nucléotide donné.
Une ADN polymérase n'est pas capable de débuter la synthèse d'un brin d'ADN à partir de rien. Il lui faut partir d'un court fragment d'ADN, appelé une amorce. Cette amorce est un oligonucléotide de 15 à 25 nucléotides, complémentaire d'une séquence d'ADN connue, située juste en amont de l'ADN à séquencer : l'ADN polymerase synthetise dans le sens 5' vers 3'.

Les séquences sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de lire les réactions de séquences: pour cela, on marque les fragments d'ADN grâce à des marqueurs fluorescents présent dans les ddNTP.

Mode opératoire

A. *Matériel*

Boîtes de Pétri stériles
Couvercles micro-plaque :
- *Thermowell 8 clear cap STR/12 (Elscolab - COS6556)*
- Thermowell sealing mat 96 well (Elscolab - COS6555)

Feuilles aluminium: Seal and sample (Analis - 538619)
Pipette multicanaux 50-300 µl
Sample microtiter plates, 96 well (Analis - 609801)
Tips 10 µl stérile
Tips 200 µl stériles
Tubes 50 ml stériles

B. *Produits*

Ceq DTCS quick start kit 96 reactions, conservation a –20°C
(Analis – 608120)
- Glycogène
- Huile minérale
- Master MIX
- Puc 18 et son primer
- SLS (sample loading solution-Formamide)

Primer à 10 µM purifiés par HPLC, resuspendu et dilué avec de l'eau pour biologie moléculaire

Produits	*N°*	*Local*	*Situation*	*Références*
Acétate de sodium 3M pH 5.2	108	d.189	4 °C (78)	Sigma – S7899
Na2EDTA 100 mM pH8	103	d.189	Armoire produits séquenceur	Sigma – E7889
Water for biomol	55	d.189	Armoire produits séquenceur	Sigma – W4502
Ethanol 100 %	520	d.164.10	8°C	

C. *Equipement*

Appareils	*Numéros des appareils*
Appareil PCR : MJ Research PTC-200	9
Centrifugeuse : ALC	13
Congélateur Liebherr	81
Speed Vac SC 110 Savant	14

D. *Préparations*

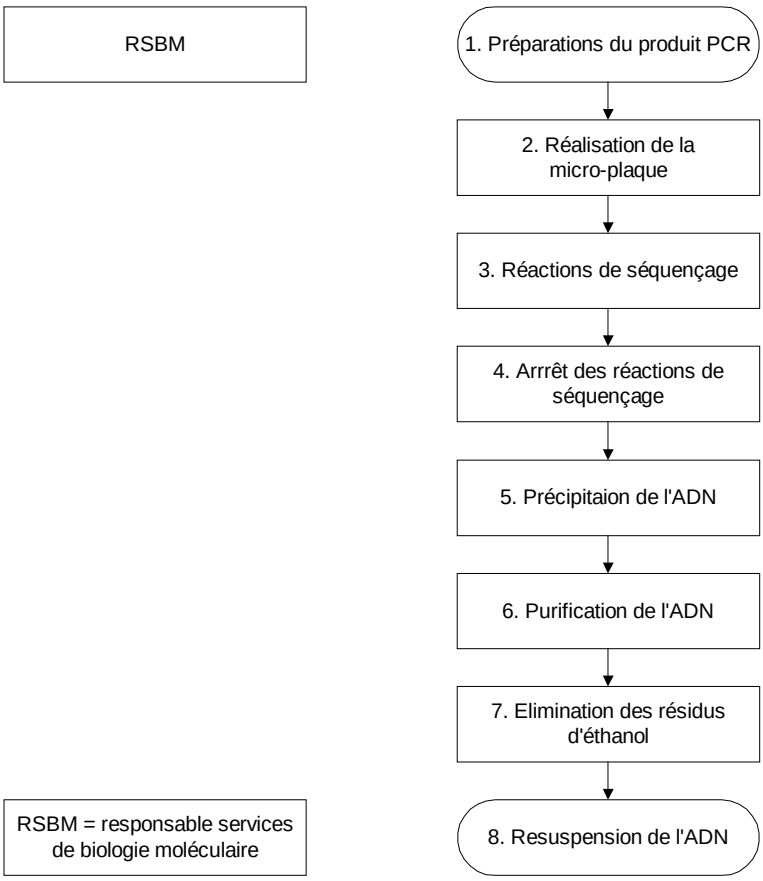
1. Solution STOP

Préparation lors de l'utilisation.
Quantité de solution à utiliser par puit de réaction.
2 µl de Na2EDTA + 2 µl de NaOAc + 1 µl de glycogène

2. Ethanol absolu 95 % et 70 %

Faire une dilution de l'éthanol absolu 100 % avec de l'eau biomol dans un pied gradué stérile et aliquoter dans des tubes 50 ml stériles (Falcon). Mettre les tubes à –20°C.

E. *Flowchart*



F. *Tableau*

N°	ACTION
1	Le produit PCR doit avoir été purifié et quantifié après purification (biophotomètre ou gel d'agarose).
2	Chaque réaction doit comporter les composants suivant : 1 µl de primer 10 µM (un seul primer par puit) , 8 µl de Master MIX (pouvant être dilué 2 x avec de l'eau biomol), produit PCR purifié (le volume varie en fonction de la concentration +/- 3µl), eau biomol pour ajuster le volume de réaction final à 20 µl par puit de réaction. Il est important de mettre un contrôle de la réaction de séquençage : PUC 18 (fourni avec le kit). La réaction comprenant le Puc 18 est composée de : 1 µl d'ADN, 2 µl de primer, 3.8 µl d'eau biomol et 8 µlde Master MIX. Si utilisation d'un plasmide au lieu de produit PCR, ajouter uniquement l'eau au plasmide et faire un préheat de 4 minutes à 96°C (Appareil PCR PTC-200 n°10, programme preseq 4). Ajouter ensuite le primer et le Master MIX.
3	Après avoir réalisé la micro-plaque, couvrir celle-ci avec un couvercle (thermowell sealing mat pour 96 puits ou strip de 8 couvercle). Placer ensuite la micro-plaque dans l'appareil PCR PTC-200 MJ research. Choisir le programme SEQ1 préalablement encodé. La durée du « RUN » est de 3h03. Après arrêt du programme conserver la micro-plaque à 4°C.
4	La réaction de séquençage est arrêtée à l 'aide de la solution STOP. Celle-ci est constituée de 2 µl de Na2EDTA + 2 µl de NaOAc + 1 µl de glycogène, et ce dans chaque puit de réaction. Calculer la quantité de solution STOP indispensable pour les réactions de séquençage de la micro-plaque, faire le mélange au moment de l'utilisation et répartir 5 µl dans chaque puit.

5	Mettre 60 µl d'éthanol absolu 95 % glacial dans chacun des puits. Pour plus de facilité, mettre l'éthanol dans une boîte de Pétri stérile et le répartir à l'aide de la pipette milticanaux. Sceller la micro-plaque avec une feuille d'aluminium autocollant, vortexer quelques secondes et mettre à –20°C durant 10 minutes. Centrifuger la micro-plaque 30 minutes à 2550 rpm et 4°C (Centrifugeuse ALC : 016- programme 1). Equilibrer la centri à l'aide d'une micro-plaque usagée contenant le même volume en eau. Après centrifugation, éliminer l'éthanol 95 % en retournant la micro-plaque sur du papier Torq, surtout ne pas « tapoter » la micro-plaque retournée afin d'éviter les pertes de culots. Après avoir remis la micro-plaque à l'endroit ne plus le retourner car les culots ont pu se redissoudre dans le reste d'éthanol et pourraient être perdus si la micro-plaque était à nouveau retournée.
6	Mettre 200 µl d'éthanol 70 % glacial dans chaque puits de la micro-plaque. Centrifuger 5 minutes à 2550 rpm et 4°C (Centrifugeuse ALC : CO 016- programme 2). Equilibrer la centri à l'aide d'une micro-plaque usagée contenant le même volume en eau. Après centrifugation, éliminer l'éthanol 70 % en retournant la micro-plaque sur du papier Torq, surtout ne pas « tapoter » la micro-plaque retournée afin d'éviter les pertes de culots. Après avoir remis la micro-plaque à l'endroit ne plus le retourner car les culots ont pu se redissoudre dans le reste d'éthanol et pourraient être perdus si la micro-plaque était à nouveau retournée. Répéter le nettoyage une deuxième fois. Après avoir éliminé l'éthanol pour la deuxième fois, faire un « short spin » de la micro-plaque à l'endroit à 2550 rpm à 4°C. Ensuite, faire une centrifugation très courte à 300 rpm et 4°C (Centrifugeuse ALC : 016 - programme 3) de la micro-plaque à l'envers sur un papier « torck », arrêter la centrifugeuse dès qu'elle atteint 300 rpm. Récupérer la micro-plaque à l'endroit.
7	Etant donné qu'après le centrifugation à l'envers il reste des trace d'éthanol, la micro-plaque va être placée au Speed-Vac durant 15 minutes, afin d'évaporer les restes de celui-ci. (Speed-Vac : CO 008)
8	Resuspendre les culots d'ADN avec 40 µl de SLS (Formamide) et ajouter un goutte d'huile sur chacun des puits afin d'éviter toute évaporation lors du séquençage. Si le séquençage n'est pas réalisé dans l'immédiat, conserver la micro-plaque à 4°C pour quelques heures ou à -20°C pour plus longtemps. Il est conseiller de séquencer la micro-plaque le plus rapidement possible après sa préparation car d'éventuelles dégradations des dyes pourraient survenir.

Consignes de sécurité spécifiques

Le Master Mix contient les fluorochromes et une enzyme ; il est donc fragile. Il est conseiller de la sortir du congélateur –20°C au moment de l'utilisation, de ne pas le remuer trop énergiquement et de ne pas le laisser trop longtemps à la lumière.

Ne pas mettre la micro-plaque sur glace lors de l'arrêt de la réaction avec la solution STOP afin d'éviter la précipitation de celle-ci.

Vérifier que les produits de réactions de séquençage sont bien au fond des puits.

Si présence de peluches ou crasse dans les puits, les enlever avant le séquençage.

Bibliographie

http://www.dil.univ-mrs.fr/~vancan/optionBio1/documents/PCR.pdf

http://www.dnalc.org/shockwave/cycseq.html

http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/BiologieMoleculaire/BiologieMoleculaire-5.html

http://www.univ-tours.fr/genet/anim4.htm

http://www2.lifl.fr/~touzet/M1/coursCorinneAbbadieM1bioinfopartie2.pdf

Documents associés

Titre du document
Protocole de séquençage DTCS « Quick start » pour système CEQ 2000 XL
Utilisation du Speed Vac SC 110 Savant

Utilisation du système d'analyse automatique de séquences d'ADN (séquenceur capillaire 2000 XL Beckman Coulter)

Principe de la méthode

Sous l'action d'un haut voltage et d'un champ électrique déterminé, l'électrophorèse capillaire permet la migration et la séparation de fragments d'acides nucléiques chargés au travers d'un capillaire. Ces fragments d'acides nucléiques marqués au préalable avec quatre marqueurs spécifiques dont la fluorescence se situe dans la région rouge du spectre.

Les fluorescences induites sont collectées par un photomultiplicateur. Les données brutes sont ensuite analysées par le logiciel CEQ™ XL version 4.3.

Définitions et abréviations

Electrophorèse capillaire: migration, séparation de molécules chargées et marquées spécifiquement sous l'action d'un champ électrique à haut voltage à travers un capillaire de longueur et de diamètre précis. La séparation des molécules chargées est basée sur les différences de masse et de taille.

ADN = Acide DésoxyriboNucléique
HPLC = High Pressure Liquid Chromatography
RSBM = responsable des services de biologie moléculaire

Matériel, produits et équipement

A. Matériel

Coton-tige COPAN (usage unique, stérile et non peluchant)
Lot de 8 capillaires de 33 cm de long pour séquences allant jusque 800 paires de bases (Beckman Coulter)
Micro-plaque parois fines pour échantillons (Beckman Coulter)
Micro-plaque pour tampon (Beckman Coulter)
Pipette multi-canaux spécifique séquençage

B. Produits

Cartouche de gel pour 96 échantillons, stockée à 4°C (Beckman Coulter)
Eau déionisée (Purification par HPLC recommandée)
Tampon (Beckman Coulter), stocké à 4°C

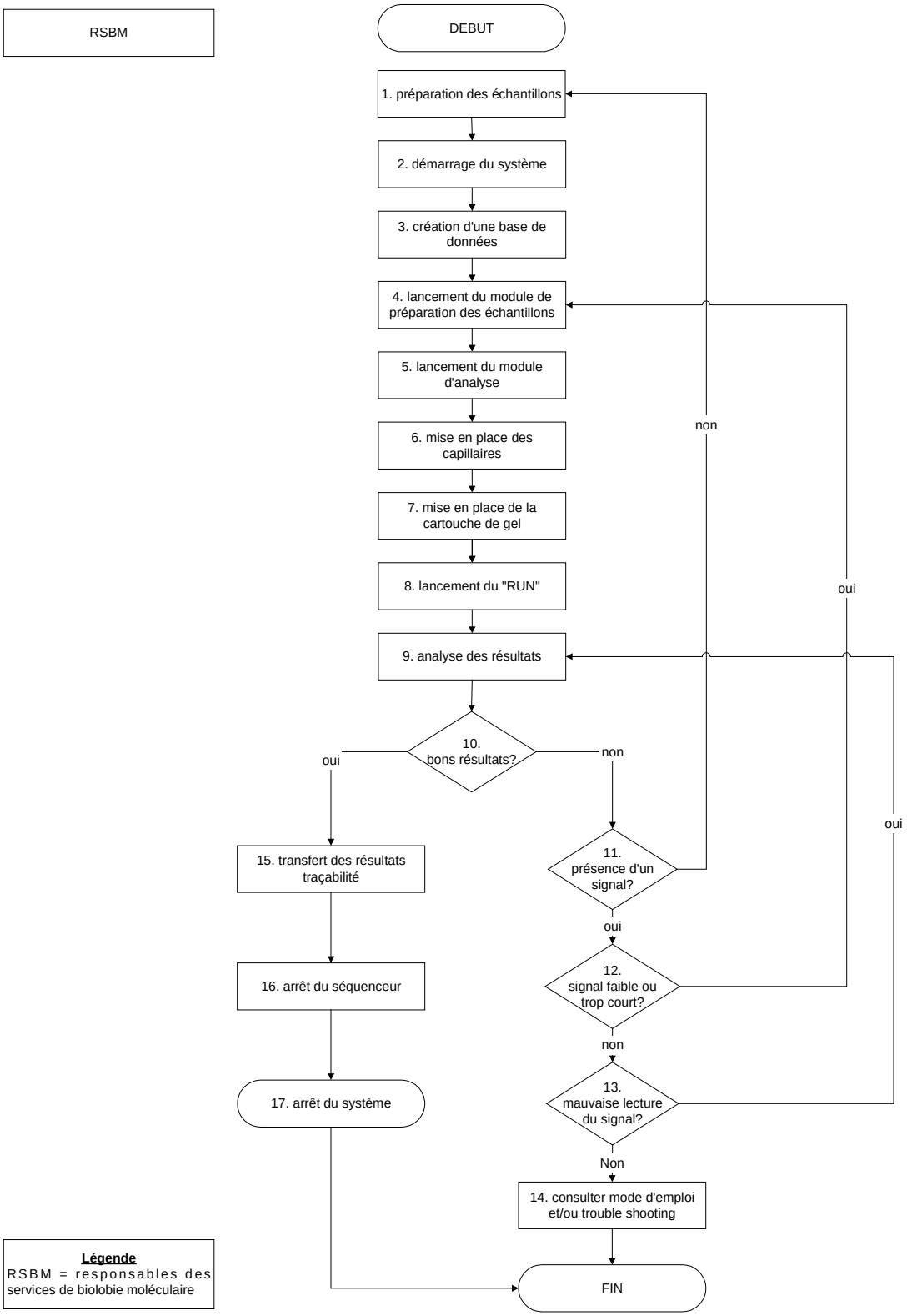
C. Equipement

Séquenceur capillaire 2000 XL Beckman Coulter (y compris PC et imprimante HP) (n° d'inventaire: 35).

Consignes de sécurité spécifiques

- Prendre connaissance des informations sur la sécurité indiquée dans M 035/2 pages v-viii.
- Lire attentivement les instructions des fenêtres de contrôles affichées sur l'ordinateur (ex : Please Wait)

- Placer les capuchons prévus aux extrémités des capillaires lorsqu'ils sont retirés et veiller à ce qu'ils soient correctement remplis d'eau HPLC ou de tampon Beckman Coulter. Ne jamais toucher l'extrémité libre des capillaires.
- Conserver les capillaires, les cartouches de gel et le tampon à 4°C.
- Ne pas laisser les capillaires ni le gel dans le séquenceur si celui-ci n'est pas utilisé.
- Nettoyer correctement les embouts des capillaires, la fenêtre de détection et les contacteurs des éventuels dépôts de sels et de gel.
- En cas de panne, d'entretien ou de changement de local, compléter le Registre d'appareillage (FORM QU 008/4).



A. Tableau

OU : d.189
QUAND : séquençage

N°	ACTION
1	Voir : M 035/2
2	-Voir : M 035/2 page 1. -Dans le bureau, cliquer sur CEQ 2000. Double-cliquer au centre de la fenêtre apparue, obtention du "MENU principal".
3	Voir : M 035/2 pages 1 et2.
4	-Voir : M 035/2 pages 2, 3, 6-12. -Sample setup/File/New/(Nom-Méthode-Analyse)/Save As/Project Name/Name/OK -Le nom des microplaques doit commencer par BECK et être suivi du numéro de celle-ci. Une copie de la disposition d'échantillons par microplaque ainsi que le résumé de l'encodage se trouve en copie papier dans la farde appropriée. -Des méthodes sont encodées (ITS, 28S, 18S, MITO : PBIOM 005) mais d'autres peuvent être crées. La méthode LFR-1 peut être utilisée de manière standard. La méthode correspond aux échantillons d'une même colonne. -Les échantillons doivent être nommés suivant un code (FORM CO 017/1). -Si votre "run" n'a pas donné de bons résultats (trop peu d'ADN ou "run" trop court), il y a possibilité de relancer celui-ci en modifiant la méthode choisie. Pour ce faire, créer une nouvelle "sample setup" et garder la microplaque d'échantillons à 4°C maximum 24 heures ou à –20°C pour une plus longue conservation (maximum deux à trois jours).
5	-Voir : M 035/2 page 3 -Message d'information/OK. Message attention gel/OK. Se mettre dans la fenêtre du "LOG" afin de suivre les opérations effectuées.
6	-Voir : M 035/2 pages 3, 54-60. -Vérifier la présence ou non des capillaires car ceux-ci peuvent déjà être présents dans le séquenceur. Si les capillaires sont installés, passer à l'étape suivante. Attention les capillaires ne sont pas remplacés, mais installés. -Replenish/Install capillary array/(15 minutes pour l'installation)/Done (car pas de changement de capillaire)/Confirm Capillary array select -Les capillaires sont très fragiles, ils sont conservés à 4°C et ne doivent pas rester plus de 48 h dans le séquenceur s'ils ne tournent pas. -Vérifier qu'il n'y a pas de dépôt de sels sur le support des capillaires ou nettoyer avec un coton-tige imbibé d'eau HPLC. Ne pas mettre vos doigts à l'extrémité de ceux-ci.

	-Vérifier que la fenêtre de lecture est propre à l'extérieur sinon passer un coton tige toujours dans le même sens. Si les impuretés persistent, elles se trouvent probablement à l'intérieur du capillaire, il faudra donc purger les capillaires et les remplir une fois de gel. Vérifier ensuite si les impuretés ont disparu ou recommencer.
7	-Voir : M 035/2 pages 3, 4, 63-68. -Vérifier la présence ou non de cartouche de gel car celle-ci peut déjà être présente dans le séquenceur. Replenish/Install gel cartridge/(mettre la cartouche de gel)/Set to New/Done -Vérifier qu'il n'y a pas de dépôt de gel dans le support de celui-ci ou nettoyer avec un coton-tige imbibé d'eau HPLC. La cartouche de gel est conservée à 4°C.
8	-Voir : M 035/2 pages 4,5, 12-16. -Vérifier que les puits des microplaques d'analyse et de tampon sont remplis, ainsi que la présence de la grille de rinçage. Le séquenceur vous indiquera s'il y a assez de gel pour effectuer le "run". S'il n'y a pas assez de gel, retourner au point 7.
9	-Voir : M 035/2 pages 10, 16-29. -Possibilité d'analyse et de transfert automatique ou manuel. -Différents types de problèmes ainsi que leurs causes éventuelles et solutions sont repris dans PBIOM 002.
10	Les résultats sont corrects lorsque leur signal n'est pas trop faible (vérifier le "raw data" et que l'analyse a proposé une séquence correcte).
11	Si aucun signal n'est présent c'est-à-dire qu'il n'y a que la présence des fluorochomes, il faut recommencer la réaction de séquence. L'absence de signal peut être due entre autres à la perte du culot d'ADN, à l'oubli d'un réactif ou à une mauvaise réaction de séquence, celle-ci pouvant résulter de beaucoup de paramètres, d'où l'utilité du témoin positif (puc 18).
12	Un signal faible peut provenir d'une concentration trop faible en ADN. Il est possible de relancer le "run" en modifiant la méthode utilisée et en augmentant le temps d'injection de l'échantillon dans le capillaire ; cela augmentera la concentration de l'ADN sans recommencer la réaction de séquence.
13	Si votre signal est mal analysé (présence de "N" ou mauvaise lecture en fin de séquence…), il est possible de relancer l'analyse en changeant des paramètres.
14	Pour d'autres problèmes, consulter le mode d'emploi (M 035/1, /2) ou le guide des problèmes (PBIOM 002). Les réactions devront être recommencées au point 1.

15	-Les résultats sont copiés sur "ZIP" après chaque séquençage, ainsi que sur CD-rom lorsqu'il faut sauver la "database". -Les aramètres internes du séquenceur sont automatiquement enregistré, et copié sur le CD-rom.
16	-Voir : M 035/2 pages 3, 54-60. -Les capillaires ne doivent pas nécessairement être enlevés si un autre "run" doit être effectué endéans 24 h. La cartouche de gel doit être enlevée après chaque "run". Attention: les capillaires ne sont pas remplacés, mais retirés. -Pendant l'enlèvement des capillaires, retirer également les microplaques d'échantillons et de tampon. Dans le module "RUN", Replenish/Release capillary array/OK/Remove capillary array, (15 minutes pour enlever les capillaires et installer le plug)/Install manifold plug/Done Voir : M 035/2 pages 3, 4, 63-68. Attention: retirer la cartouche de gel et installer le plug. Dans le module "RUN", Replenish/Release gel cartridge/OK/Remove gel cartridge (enlever le gel)/Install plug -Actionner ensuite le bouton d'arrêt du séquenceur.
17	Dans la barre de raccourcis, cliquer sur la dernière icône (porte), le programme se ferme automatiquement.

Documents associés

DOCUMENT	***TITRE DU DOCUMENT***
	Protocole de séquençage DTCS "Quick start" pour système CEQ 2000 XL
	CEQ 2000 Sequence Analysis Trouble Shooting Guide
	CEQ 2000 XL DNA Analysis System CEQuence Investigator
	CEQ 2000 XL Software version 4.3 Addendum
	Méthodes de séquençage enregistrées
FORM QU 008/4	Registre d'appareillage
M 035/1	Mode d'emploi
M 035/2	Mode d'emploi : guide rapide

Formulaires en annexe

TITRE DU FORMULAIRE
Liste des codes liés au séquenceur

Annexe 2 : Monographie de ***Microporellus*** du groupe ***dealbatus*** (Berk. & M.A. Curtis) Murrill récolté en Martinique.

SW/Mart07 GSP20
Case Pilote, Morne rose, Forêt hygrophile. Au sol sur racine de *Inga laurina ou Daphnopsis americana*
15/08/07

Description Macroscopique

Chapeau

Réniforme ou circulaire, l'insertion est latérale. la base est lobée, et les lobes se rejoignent à maturité, l'insertion devient ainsi excentré ou centrale. La texture est flexible, légèrement compressible. La taille est variable : de 2,7 cm à 14 cm de diamètre. Le chapeau possède une dépression centrale au niveau du point d'insertion du stipe. La surface est lisse, glabre et mâte. Zoné concentriquement, avec une zonation principale tous les 5 à 10mm de couleur crème à brun foncé. L'allure générale est relativement claire. Dans chacune des principales zones, il y a des zones plus fines tous les 1 à 2mm. La marge est régulière ou sinueuse, parfois lobulée imbriquée, frisée sur 0,5cm, elle s'enroule au séchage. Le contact est doux au touché. Présence de zones blanches surtout au centre du chapeau correspondant à un phénomène de concrétion de résine ou d'autres substances ou de formation de mycélium secondaire. Présence de petits cristaux ressemblant à du sable sur le revêtement.

Stipe

Il est petit et cylindracé, de taille variable : 2 à 3 cm de long et 0,5 à 1cm de large. De consistance coriace, il est recouvert d'une croûte sur sa première moitié en partant de la base.

Chair

Revêtement apparent après section, la chair est pâle, de couleur beige, zoné concentriquement, d'épaisseur variable 2 à 5mm au niveau de la base. La texture est subéreuse mais compacte.

Hyménophore

Décurrent à maturité et dissocié du stipe, la surface porée est de couleur crème orangé et doux au toucher. La longueur des tubes ne dépasse pas 3mm de long. Les pores sont circulaires à ovales, 8 /mm.

Description microscopique

Basidiospores (Cf figure 1)

Les spores sont hyalines, à parois épaisses, guttulées, subsphériques, non amyloïdes, 4,5-[5,03]-6 x 4-[4,23]-4,5 µm de diamètre

Le revêtement (cf figure 6)

Composé d'extrémités hyphales hyalines en forte densité, en cutis, parfois redressées et légèrement clavées. On observe des cloisons de manière importante, des boucles rarement. Le dépôt blanchâtre qui apparaît parfois sur le revêtement, correspondrait à la formation de mycélium secondaire étant donné que celui-ci s'épaissit en certains endroits, et que ces lieux montre la présence de nombreuses hyphes génératrice.

Les hyphes de la chair (cf figure 3 et 4)

On distingue à première vue une forte densité d'hyphes squelettiques, à paroi épaisses, non ramifiées, la plupart rectiligne. Aucune boucle n'a été constatée. Leur diamètre varie de 3 à 7 µm, avec une prépondérance d'hyphes à 5µm de diamètre. L'épaisseur des parois varie de 1 à 3 µm. L'extrémité de ces hyphes lorsqu 'elle est observée, est aigue à paroi fine.

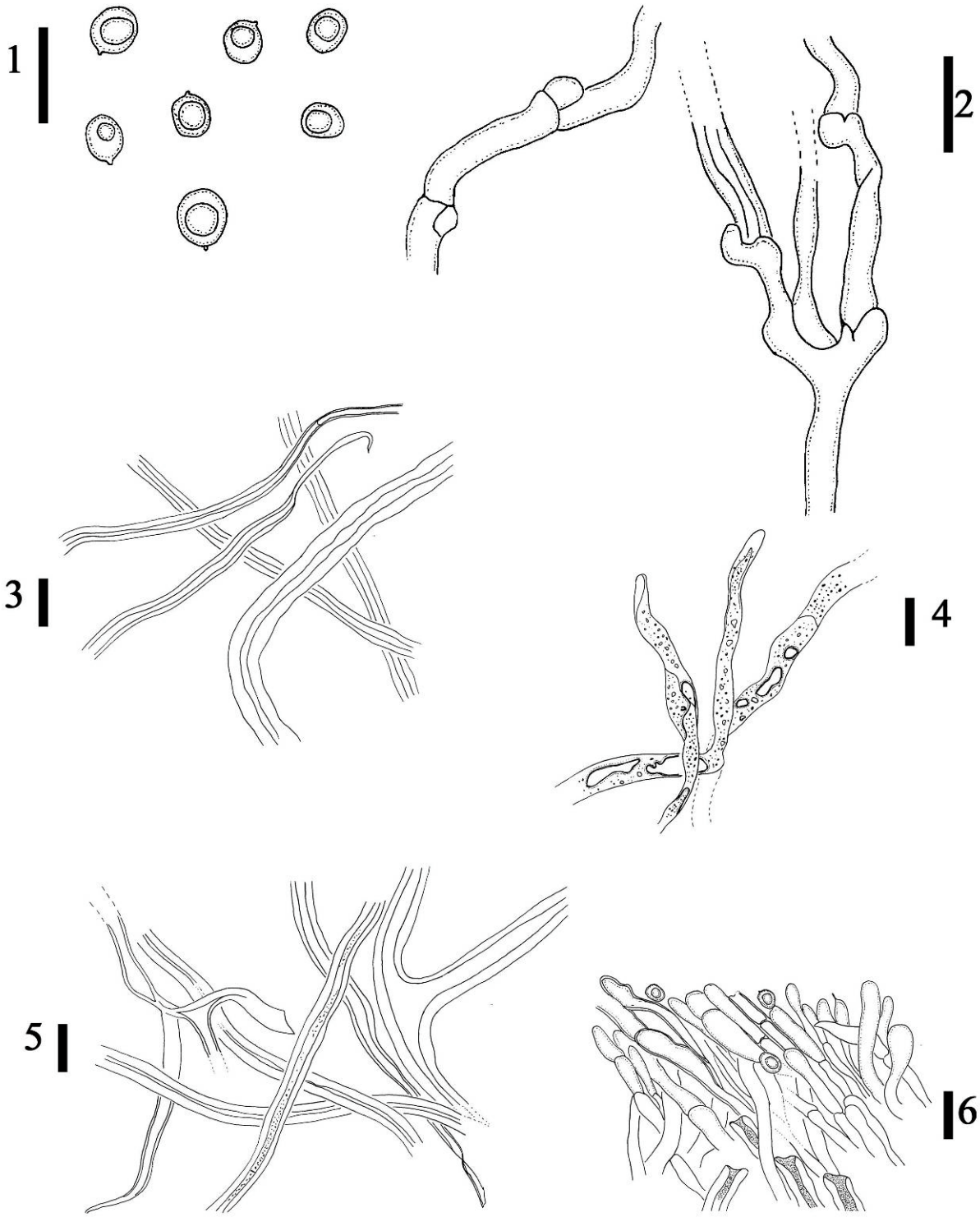
Un autre type d'hyphes apparaît également : les hyphes laticifères (cf : figure 4). Leur diamètre varie de 5 à 6µm. Leur extrémités est digitées, la zone intracellulaire contient de nombreux globule voire des vacuoles au contenu huileux.

Les Hyphes de la trame (cf figure 5)

Les hyphes squelettiques sont dextrinoïdes surtout au niveau de la trame, majoritaires, longues, à paroi épaisses se touchant parfois, parfois ramifiées en arborescences ou non, l'intérieur est parfois congophile, leur extrémités sont aigues et à paroi fines semblables aux hyphes génératrices, 3 à 7 µm de diamètre.

Les Hyphes génératrices (cf : figure 6) sont hyalines, avec des diamètres variables allant de 2 à 3 µm. Elles sont cloisonnées avec des boucles et des parois fines. Les hyphes squelettiques prennent naissance à partir des boucles des hyphes génératrices de la même manière que les *Ganodermataceae*, que Corner a décrite en 1983.

Microporellus du groupe ***dealbatus*** (Berk. & M.A. Curtis) Murrill



1 trait = 10 µm

Bibliographie

Acevedo-Rodriguez P. & Strong M.T. – 2008 – Flora of the West Indies. Smithsonian Institute (publié sur Internet: http://botany.si.edu/antilles/WestIndies).

Bazzalo M.E. & Wright J.E. – 1982 – Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16(1), p. 293-325

Boh B., Hodžar D., Dolničar D., Berovič & Pohleven F. – 2000 – Isolation and Quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. *Food Technol. Biotechnol*. 38 (3), p. 11-18.3

Bok J.W., Lermer L., Chilton J., Klingeman H.G. & Towers G.H. – 1999 – Antitumor sterols from the mycelia of Cordyceps sinensis. *Phytochemestry* 51, p. 891-898

Bolliger H.R., Brenner M., Ganshirt H., Mangold H.K., Seiler H., Stahl E. & Waldi D. – 1965 – Thin-layer chromatography ; a laboratory handbook. 553 p. Springer-Verlag (Berlin, New York)

Bresadola G. – 1932 – *Iconographia mycologica* 21, p. i-v, pl. 1001-1050.

Brown D.B. – 1998 – The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 15(66) , p. 653-696

Bruneton J. – 1999 – Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales –3e éd. 1120 p. Tec et Doc-Lavoisier (Paris ; Ed.médicales internationales, Cachan).

Carranza-Morse J. – 1993 – Pore fungi of Costa Rica III. *Mycotaxon* 48, p. 45-57.

Chen Y., Yan Y., Xie M.Y., Nie S.P., Liu W., Gong X.F., Wang Y.X. *et al.* – 2008 – Development of chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol 47, p. 469-477.

Chen D.H. & Chen W.K.D. – 2002 – Determination of Ganoderic acids in triterpenoid constituents of *Ganoderma tsugae. J. Food Drug Anal.* 1, p. 195-201.

Chen Y.K., Kuo Y.H., Chiang B.H., Lo J.M., Sheen L.Y. – 2009 – Cytotoxic activities of 9,11-Dehydroergosterol Peroxyde and Ergosterol Peroxyde from the fermentation mycelia of

Ganoderma lucidum cultivated in the medium containing leguminous plants on Hep 3B cells. *J. Agric. Food. Chem*. 57, p. 5713-5719

Chinese Pharmacopoeia Commission (ed) – 2000 – Pharmacopoeia of the people's republic of China. 1, p. 130. Beijing : Chemical Industry Press.

Corner E.J.H. – 1983 – Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Beih. Nova Hedwigia* 75, p. 182 p.

Correa E., Cardona D., Quiñones W., Torres F., Franco Ana E., Vélez Ivan D., Robledo S. & Echeverri F. – 2006 – Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. *Phytotherapy Res.* 20(6), p. 497-499.

Courtecuisse R. – 2005 – La diversité fongique dans le domaine guyano-caribéen. État des lieux et perspectives. *In* Colloque "Les écosystèmes forestiers de la Caraïbe". Tois-îlets (Martinique), 5 décembre 2005 (conférence sur invitation).

Courtecuisse R. – 2006 – Les champignons des Petites Antilles (Martinique et Guadeloupe). Société mycologique de France (publié sur Internet: http://mycofrance.org).

Courtecuisse R. – 2009 – Liste préliminaire des *Fungi* recensés dans les îles françaises des Petites Antilles : Martinique, Guadeloupe et dépendances II – Basidiomycètes non lamellés (rouilles et charbons exclus). *Doc. Mycol.* 135-136, p. 1-52 (*in press*).

David A. & Rajchenberg M. – 1985 – Pore fungi from French Antilles and Guiana. *Mycotaxon* 22, p. 285-325.

Decock C. & Figueroa H. – 2007 – Studies in *Ganodermataceae* (Basidomycota) : the concept of *Ganoderma coffeatum* in the Neotropics and East Asia. *Cryptogamie, Mycologie* 28, p. 77-89

Dias D.A. & Urban S. – 2009 – HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Nat. Prod. Comm.* 4, p. 489-498.

Domínguez X.A., Butruille D., Zamudio A., Reyes G. & Castillo T. – 1972 – Ergostérol et L-mannitol dans des champignons parasites. *Phytochem.* 11 ; p. 2616.

Duss R.P. – 1903 – *Énumération méthodique des champignons recueillis à la Guadeloupe et à la Martinique.* 94 pp

Feldman C. – 1978 – Formulaire pratique de pharmacologie. 704 p. Ed Doin (Paris).

Fiasson J.L. & Niemelä T. – 1984 – The Hymenochaetales : a revision of the European poroid taxa. *Karstenia.* 24 ; p. 14-28

Foroutan A. & Vaidya J.G. – 2007 – Record of new species of *Ganoderma* in Maharashtra India. *Asian J. Pl. Sci.* 6(6), p. 913-919

Fournet J. – 2002 - *Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique*. 2538 p. Gondwana éditions (Montpellier, Cirad ; Trinité).

Fu C.M., Lu G.H., Schmitz O.J., Li Z.W., Leung K.S.Y. – 2008 **–** Improved chromatographic fingerprints for facile differentiation of two *Ganoderma* spp. *Biomed. Chromatogr.* 23, p. 280-288.

Gonzáles A.G., León F., Rivera A., Padrón J.I., González-Plata J., Zuluaga J.C., Quintana J., Estévez F. & Bermejo J. – 2002 – New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna. J. Nat. Prod.* 65, p. 417-421.

Gao J.J., Min B.S., Ahn E.M., Nakamura N., Lee H.K., Hattori M. – 2002 – New triterpene Aldehydes, Lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chem. Pharm. Bull*. 50, p. 837-840.

Gao Y. – 2004 **–** Chemopreventive and tumorocidal properties of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum*. Part 1. Preclinical and clinical studies. *Int. J. Med. Mushrooms* 6, p. 95-106.

Gao J.J., Nakamura N., Min B.S., Hirakawa A., Zuo F. & Hattori M. – 2004 – Quantitative determination of Bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products. *Chem. Pharm. Bull.* 52, p. 688-695.

Gardes M. & Bruns T.D. – 1993 – ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol*. 2, p. 113-118.

González A.G., León F., Rivera A., Padrón J.I., González-Plata J., Zuluaga J.C., Quintana J., Estévez F., Bermejo J. – 2002 – New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna. J. Nat. Prod.* 65(3), p. 417-421.

Gottlied A.M. & Wright J.E. – 1999a – Taxonomy of *Ganoderma* from South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycol. Res.* 103(6), p. 661-673.

Gottlied A.M. & Wright J.E. – 1999b – Taxonomy of *Ganoderma* from South America: subgenus *Elfvingia*. *Mycol. Res.* 103(10), p. 1289-1298.

Gottlieb A.M., Ferrer E. & Wright J.E. – 1999 – rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma. Mycol. Res* 9, p.1033-1045.

Guzmán G., Torres M.G., Ramirez-Guillén F. & Rios-Hurtado A. – 2004 – Introducción al conocimiento d elos macromicetos de Chocó, Colombia. *Rev. Mexic. Micol.* 19, p. 33-43

Hattori M. – 2001 – Recent studies on the bitter principles of *Ganoderma lucidum* –isolation of novel triterpenes, their biological activity and pharmacokinetics. *Proc. Int. Symposium Ganoderma Sci*, Auckland, 27-29 April, 2001.

Hong S.G. & Jung H.S. – 2004 – Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96(4), p. 742-755

Hseu R.S., Wang H.H., Wang H.F. & Moncalvo J.M. – 1996 – Differentiation and Grouping of Isolates of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compared with Grouping on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Environ. Microb*. 62(4), p.1354-1363.

Hsu C.L., Yu Y.S. & Yen G.C. – 2008 – Lucidenic Acid B induces apoptosis in human leukemia cells via a mitochondria-mediated pathway. *J. Agric. Food. Chem*. 56, p. 3973-3980.

Huie C.W. & Di X. – 2004 – Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J. Chromatogr.* 812, p. 241-257.

Jiang J., Slivova V. & Sliva D. – 2006 – *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation of human breast cancer cells by down regulation of estrogen receptor and NF-κB signalling. *Int. J. Oncol.* 29, p. 695-703.

Jiang J., Grieb B., Thyagarajan A. & Sliva D. – 2008 – Ganoderic acids suppress growth and invasive behaviour of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-κB signalling. *Int. J. Mol. Med.* 21, p. 577-584.

Kikuchi T., Matsuda S., Kadota S., Murai Y. & Ogita Z. – 1985 – Ganoderic acid D, E, F, and H and lucidenic acid D, E, and F, new triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 33, p. 2624-2627.

Kim H.W. & Kim B.K. – 1999 – Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) P. Karst. (*Aphyllophoromycetideae*). *Int. J. Med. Mushrooms* 1, p. 121-138 .

Kohda H., Tokumoto W., Sakamoto K., Fujii M., Hirai Y., Yamasaki K., Komoda Y., Nakamura H., Ishihara S. & Masaru U. – 1985 – The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* 33, p. 1367-1374.

Lapassat A-V. – 2000 – *Étude du Lingzhi (Champignons merveilleux) Aspect littéraire et médical*. 80 p. Mémoire de maîtrise de langue, littérature chinoises.

Lee S., Park S., Oh J.W. & Yang C. – 1998 – Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Med.* 64(4), p. 303-308.

León F., Quintana J., Rivera A., Estévez F. & Bermejo J. – 2004 – Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells. *J. Nat. Prod.* 67, p. 2008-2011.

Léveillé J.-H. – 1846 – Description des champignons de l'herbier du museum de Paris. *Ann. sci. nat., Bot.* III, 5, p. 111-167

Li C.H., Chen P.Y., Chang U.M., Kan L.S., Fang W.H., Tsai K.S. & Lin S.B. – 2005 – Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomérases and induces apoptosis of cancers cells. *Life Sci*. 77(3), p. 252-265.

Lin C.N. & Tome W.P. – 1991 – Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum. J. Nat. Prod.* 54, p. 998-1002.

Lindequist U., Timo H., Niedermeyer J. & Jülich W.-D. – 2005 – The pharmacologiocal potential of mushrooms. *Evidence-based Compl. Altern. Med.* (ECAM) 2, p. 285-299.

Liu G.-Q., Ding C.-Y. & Wang X.-L. – 2007 – Mechanisms of anticancer action of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. A review of recent researches. *Mycosystema* 26(3), p. 470-476

Liu Y.W., Gao J.L., Guan J., Qian Z.M., Feng K. & Li S.P. – 2009 – Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of *Ganoderma* on tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 57, p. 3087-3093.

Liu J., Shimizu K., Konishi F., Kumamoto S. & Kondo R. – 2007 – The anti-androgen effect of ganoderol B isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum. Bioorg. Med. Chem*. 15, p. 4966-4972.

Liu J., Kurashiki K., Shimizu K. & Kondo R. – 2006 – Structure-activity relationship for inhibition of 5α-reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum. Bioorg. Med. Chem*. 14, p. 8654-8660.

Liu J., Shiono J., Shimizu K., Kukita A., Kukita T. & Kondo R. – 2009 – Ganoderic acid DM: Anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem*. 19, p. 2154-2157.

Liu J., Tamura S., Kurashiki K., Shimizu K., Noda K., Konishi F., Kumamoto S. & Kondo R. – 2009 – Anti-androgen effects of extracts and compounds from *Ganoderma lucidum. Chem. Biodivers*. 6, p. 231-243.

Matsuda H., Akaki J., Nakamura S., Okazaki Y., Kojima H., Tamesada M. & Yoshikawa M. – 2009 – Apoptosis-Inducing Effects of Sterols from the Dried Powder of Cultured Mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Chem. Pharm. Bull*. 57, p. 411-414.

Matthieu L. – 2006 – *Inventaire et analyse écologique des champignons du Bois de Maubeuge à Ferrière-la-Petite (Nord).* 104 p. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur de Pharmacie (Lille).

Min B.S., Gao J.J., Nakamura N. & Hattori M. – 2000 – Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicité against Meth-A et LLC cells. *Chem. Pharm. Bull.* 48, p. 1026-1033.

Minter D.W., Rodríguez Hernández M. & Mena Portales J. – 2001 – *Fungi of the Caribbean. An annotated checklist*. 946 p

Miyamoto I., Liu J., Shimizu K., Sato M., Kukita A., Kukita T. & Kondo R. – 2008 – Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. *Eur. J. Pharmacol*. 602, p. 1-7.

Miyazaki T. & Nishijima M. – 1981 – Studies on fungal polysaccarides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum. Chem. Pharm. Bull.* 29, p. 3611-3616.

Mizuno T., Ohsawa K., Hagiwara N. & Kuboyama R. – 1985 – Fractionation and Characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Biol. Chem*. 7, p. 1679-1688.

Mizuno T. – 1999 – The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). *Int. J. Med. Mushrooms* 1, p. 9-29.

Mizushina Y., Hanashima L, Yamagushi T., Takemura M., Sugawara F., Saneyoshi M., Matsukage A., Yoshida S. & Sakaguchi K. – 1998 – A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 249(1), p. 17-22

Moncalvo J.-M. – 2000 – Systematics of *Ganoderma*. *In* J. Flood, P.D. Bridge & M. Holderness (éds.), *Ganoderma* diseases of perennial crops. Chapter 2, p. 23-46 (CABI Publ.)

Moncalvo J.-M., Wang H.F. & Hseu R.S. – 1995 – Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex. Comparison with ttraditionnal taxonomic characters. *Mycol. Res.* 99, p. 1489-1499

Moncalvo J.-M. & Ryvarden L. – 1997 – A nomenclatural study of the *Ganodermataceae* Donk. *Synopsis Fungorum* 11, 114 p. Fungiflora (Oslo-Norway).

Moradali M.F., Mostafavi H., Ghods S. & Hedjaroude G.A. – 2007 – Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi. *Intern. Immunopharmacol.* 7, p. 701-724.

Murrill, W.A. – 1908 – Agaricales, *Polyporaceae* (conclusio). *N. Am. Fl.* 9(2), p. 73-131

Nishitoba T., Sato H., Kasai T., Kawagishi H. & Sakamura S – 1984 – New bitter C_{27} and C_{30} terpenoids from *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agric. Biol. Chem*, vol 48(11), p. 2905-2907

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. – 1986 – Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology.* 51(1), p. 263-273.

Nishitoba T., Sato H. & Sakamura S. – 1985 – New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. *Agric. Biol. Chem.* 45(5), p. 1547-1549.

Nishitoba T., Sato H., Shirasu S. & Sakamura S. – 1986 – Evidence on the strain-specific terpenoid pattern of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem*. 50, p. 2151-2154.

Ofodile L.N. – 2005 – Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytotherapy Research* 19, p. 310-313.

Ooi V. E-C & Liu F. – 1999 – A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharide. *Int. J. Med. Mushrooms* 1, p. 195-206.

Parmasto E. – 1986 – Preliminary list of vietnamese Aphyllophorales and *Polyporaceae* s. str. *Script. Mycol.* 14, 88 p.

Paterson R.R.M. – 2006 – *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, p. 1985-2001.

Patouillard, N. – 1899 – Champignons de la Guadeloupe. *Bull. Soc. mycol. Fr.,* 15, p. 191-209, pl. IX-X

Pegler D.N. & Yao Y.-J. – 1996 – Oriental species of *Ganoderma*, section *Ganoderma*. *In* S.P. Wasser (ed.) Botany and Mycology for the next Millenium: collection of scientific articles devoted to the 70th anniversary of academician sytnik KM. N. G. Kholodny institute of botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, p. 336-347

Rajchenberg M. & de Meijer A.A.R. – 1990 – New and noteworthy polypores from Paraná and São Paulo States, Brazil. *Mycotaxon* 38, p. 173-185

Rivière C. – 2006 – Conception et synthèse de molécules à visée anticancéreuse inspirées de motif issus de coumarine et d'iridoïdes isolés de deux plantes endémiques malgaches : un exemple d'application de la démarche ethnopharmacologique. *Mémoire en vue de l'obtention du Mastère en Drug Design* (Université de Lille 2 – ICPAL)

Roberts P. & Spooner B. – 1999 – How many species ? Assessing fungal diversity in the British Isles. *XIII Congress of European Mycologists [Alcalá de Henares (Madrid) Spain, 21-25 09.1999] Book of Abstracts*, p. 112 .

Rösecke J. & König W.A. – 2000 – Constituants of various wood-rotting Basidiomycetes. *Phytochemistry* 54, p. 603-610.

Ross G.D., Vetvicka V., Yan J., Xia Y. & Vetvicková J. – 1999 – Therapeutic intervention with complement and β-Glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42, p. 61-74.

Ruiz A. & Varela A. – 2006 – Nuevos registros de Aphyllophorales (Basidiomicota) en bosque montano húmedo y de niebla de Colombia. *Caldasia* 28(2), p. 259-266

Ryvarden L. – 1983 – Type studies in the *Polyporaceae* 14. Species described by N. Patouillard, either alone or with other mycologists. *Occ. Pap. Farlow Herb. Crypt. Bot.* 18, 39 p.

Ryvarden L. – 1985 – Type studies in the *Polyporaceae*. 17. Species described by W.A. Murrill. *Mycotaxon* 23, p. 169-198.

Ryvarden L. & Gilbertson R.L. – 1993 – European polypores. Part 1. *Fungiflora*, p 1-387.

Ryvarden L. – 2000 – Studies in neotropical polypores. 2. A preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia* 92(1), p. 180-191.

Ryvarden L. – 2004 – Neotropical polypores. Part. 1. Introduction, *Ganodermataceae* & *Hymenochaetaceae*. *Synopsis Fungorum* 19, 229 p.

Saccardo P.A. - 1888 – *Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum*. Vol. 6 [coll.: J. Cuboni et V. Mancini: *Sylloge Hymenomycetum omnium hucusque cognitorum* vol. II – *Polyporae, Hydnae, Thelephorae, Clavariae, Tremellinae*], 928 p.

Saccardo P. A. & Sydow P. – 1902 – *Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum* vol. 16. Supplementum universale pars V – 1291 p.

Sarembaud A. & Poitevin B. – 1996 – Médicaments à usage homéopathique. Dictionnaire pratique abrégé. 256 p. Masson éd. (Paris).

Sliva D., Labarrere C., Slivova V., Sedlak M., Lloyd Jr. F.P. & Ho N.W.Y. – 2002 – *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochem. Bioph. Res. Co*. 298, p. 603-612.

Smânia A. Jr, Monache Franco Delle, Smânia E.F.A. & Cuneo R. – 1999 – Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphyllophoromycetideae*) fruit body. *Int. J. Med. Mushrooms* 1, p. 325-330.

Smânia A. Jr, Marques C.J.S., Smânia E.F.A., Zanetti C.R., Carobrez S.G., Tramonte R. & Loguercio-Leite C. – 2003 – Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Res.* 17, p. 1069-1072.

Smith B. & Sivasithamparam K. – 2000 – Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. Mycol. Res. 104, p. 943-951

Steyaert R.L. – 1967a – Considération générale sur le genre *Ganoderma* et plus spécialement sur les espèces européennes. *Bull. Soc. roy. bot. belg.* 100, p. 189-211.

Steyaert R.L. – 1967b – Les *Ganoderma* palmicoles. *Bull. J. bot. nat. Belg.* 37, p. 465-492.

Steyaert R.L. – 1980 – Study of some *Ganoderma* species. *Bull. J. bot. nat. Belg.* 50, p. 135 - 186.

Su C.H., Yang Y.Z., Ho H.O., Hu C.H. & Sheu M.T. – 2001 – Performance Liquid Chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *J. Chromatogr. Sci.* 3, p. 93-100.

Su H.J., Fann Y.F., Chung M.I., Won S.J. & Lin C.N. – 2000 – New lanostanoids of *Ganoderma tsugae*. *J. Nat. Prod.* 63(4), p. 514-516.

Symoens F., Bouchara J.-P., Heinemann S. & Nolard N. – 2000 – Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *J. Hosp. Infect.* 44, p. 273-280.

Tang W., Liu J.W., Zhao W.M., Wei D.Z., Zhong J.J. – 2006 – Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer. *Life Sciences* 80, p. 205-211.

Thoen D. – 1982 – Usages et légendes liés aux polypores – Notes d'ethnomycologie n°1 *Bull. Soc. mycol. Fr.* 98(3), p. 289-318

Tomasi S., Lohézic-Le Dévéhat F., Sauleau P., Bézivin C. & Boustie J. – 2004 – Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. *Pharmazie* 59(4), p. 290-300.

Toth J.O., Luu B & Ourisson G. – 1983 – Les acides ganodériques T à Z : tritèrpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum*. *Tetrahedron Lett.* 24, p. 1081-1084.

Umezawa H., Hayano S, Takeuchi T. & Mizuhara Y. – 1948 – Isolation of actinomycin A from a strain of *Streptomyces*. *Jap. J. Med.* 1(2), p. 100-103.

Wang D.-M., Wu S.-H., Su C.-H., Peng J.-T., Shih Y.-H. & Chen L.-C. – 2009 – *Ganoderma multipileum*, the correct name for '*G. lucidum*' in tropical Asia. *Abstr. Asia Mycology Congress (AMC2007), Penang (Malaysia) 2-6 déc. 2007. MS n° 2599*, 18 p.

Wang X.M., Yang M., Guan S.H., Liu R.X., Xia J.M., Bi K.S. & Guo D.A. – 2006 – Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 41, p. 838-844.

Wasser S.P. – 2002 – Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, p. 258-274.

Wasser S. P. – 2005 – Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of Dietary Supplements.*, p. 603-621.

Welti S. – 1998 – *Contribution à la recherche de substances bioactives issues d'un* Streptomyces *des sols miniers de Nouvelle-Calédonie.* 52 pp. Mémoire de DEA "Génie Enzymatique-Bioconversion et micrologie". Université de Compiègne et IRD de Nouméa (Nouvelle-Calédonie).

Welti S. & Courtecuisse R. – 2009 - *Ganodermataceae* from French West Indies. *Fungal Divers.* In press.

Welti S., Moreau P.-A., Azaroual N., Decock C., Lemoine A., Duhal N., Kouach M., Millet R. et Courtecuisse R. – 2009 – Antiproliferative activities of methanolic extracts from a Neotropical *Ganoderma* species: identification and characterization of a novel Ganoderic acid called Ganoderic acid FWI (French West Indies). *International Journal of Medicinal Mushrooms.* In press.

Welti S. *et al.* – 2009 – Further steps in chemical fingerprinting of *Ganoderma* species using ganoderic acids. *In prep.*

Weng C.J., Chau C.F., Chen K.D., Chen D.H., Yen G.C. – 2007 – The anti-invasive effect of lucidenic acids isolated from a new *Ganoderma lucidum* strain. *Mol. Nutr. Food. Res.* 51, p. 1472-1477.

Weng C.J., Chau C.F., Hsieh Y.S., Yang S.F. & Yen G.C. – 2008 – Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-κB and AP-1. *Carcinogenesis* 29, p. 147-156.

White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J.W. – 1990 – Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* : Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (éds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, p. 315-322. Academic Press, Inc. (New York).

Wu T.S., Shi L.S. & Kuo S.C. – 2001 – Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpènes. *J. Nat. Prod.* 64, p. 1121-1122.

Xu J.W., Xu Y.N. & Zhong J.J. – 2009 – Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Yang J.J. & Yu D.Q. – 1990 – Synthesis of *Ganoderma* alkaloid A and B. *Acta Pharmaceutica Sinica* 25, p. 555-559.

Yang M., Wang X., Guan S., Xia J., Sun J., Guo H. & Guo D.A. – 2007 – Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18, p. 927-939.

Yeh X.Y. – 1990 – Taxonomic study of *Ganoderma australe* complex in Taiwan. Ph.D Dissertation. National Taiwan University. 110 p. (non vu)

Yeh X.Y., Chen Z.C. & Kimbrough J.W. – 1994 – *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. From Florida. *Abstr. 11th ann meeting of the Mycol. Soc. Rep. China*, p. 32 (non vu)

Yihuai G., Dai X., Guoliang C., Ye J. & Zhou S. – 2003 – A randomized, placebo-controlled, multicenter study of *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr) Lloyd (*Aphyllophoromycetideae*) polysaccharides (Ganopoly®) in patients with advenced Lung cancer. *Int. J. Med. Mushrooms* 5, p. 369-381.

Yoshikawa K., Nishimura N., Bando S., Arihara S., Matsumura E. & Katayama S. – 2002 – New lanostanoids, elfvingic acids A-H, from the fruit body of *Elfvingia applanata*. *J. Nat Prod*, 65(4), p. 548-552.

Yuan J.-P., Wang J.-H. & Liu X. – 2007 – Distribution of free and esterified ergosterols in the medicinal fungus *Ganoderma lucidum. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 77, p. 159-165.

Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J. & Wasser S.P. – 2005 – Medicinal mushrooms modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, p. 453-468.

Zhang Q.-H. & Lin Z.-B. – 1999 – The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) P. Karst.(Ling Zhi) (*Aphyllophoromycetideae*) polysaccharides is related to tumor necrosis factor-α and interferon-γ. *Int. J. Med. Mushrooms* 1, p. 207-215.

Zhang Q., Zuo F., Nakamura N., Ma C.M., Hattori M. – 2009 – Metabolism and pharmacokinetics in rats of ganoderiol F, a highly cytotoxic and antitumor triterpene from *Ganoderma lucidum*. *Nat. Med.* (Tokyo) 63(3), p. 304-310.

Zhao J., Zhang X.Q., Li S.P., Yang F.Q., Wang Y.T., Ye W.C. – 2006 – Quality evaluation of *Ganoderma* through simultaneous dtermination of nine triterpènes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci*. 29, p. 2609-2615.

Zhao J.-D., Xu L.-W. & Zhang Z.-Q. – 1983 – Taxonomic studies on the family *Ganodermataceae* of China II. *Act. Mycol. Sin.* 2(3), p. 159-167 (in chinese)

Zjawiony J.K. – 2004 – Biologically active compounds from aphyllophorales (Polypore) fungi. *J. Nat. Prod.* 67, p. 300-310.

Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des *Ganodermataceae* de Martinique, Guadeloupe et dépendances

Résumé

En premier lieu, notre travail résume l'état des connaissances sur les *Ganodermataceae* des Antilles françaises, en se basant sur l'analyse exhaustive de la littérature et sur les récoltes personnelles que nous avons effectuées au cours de 7 missions sur le terrain, en Guadeloupe et en Martinique (2003-2008). Soixante quatre collections ont été examinées, ainsi que plusieurs types d'espèces décrites des Néotropiques (*Ganoderma dussii* Pat., *G. pulverulentum* Murrill, *G. subfornicatum* Murrill, *G. tuberculosum* Murrill). Au total, quinze taxons ont été identifiés dans les Antilles françaises. Les caractères morphologiques de chaque espèce ont fait l'objet d'une description méticuleuse, d'une illustration sur planche ainsi que d'une discussion. De plus, chacune de nos hypothèses portées sur l'identité des espèces s'appuie sur des résultats phylogénétiques. Les espèces suivantes sont citées pour la première fois aux Antilles : *Ganoderma amazonense* Weir, *Ganoderma flaviporum* (Murill) Sacc.& Trotter, *Ganoderma subamboinense* (P. Hennings) Bazzalo & Wright, *Ganoderma tuberculosum* Murril. En second lieu, nos recherches ont porté sur la comparaison des activités antiprolifératives de différents extraits méthanoliques de *Ganodermataceae* Donk récoltés aux Antilles et Guyane françaises et de deux espèces de référence : *Ganoderma lucidum* européen et '*Ganoderma lucidum'* asiatique, sur cellules cancéreuses humaines de type prostatique (PC-3), mammaires (MCF-7) et colorectal (HT-29). Nous avons démontré que certains ganodermes néotropicaux tel le *Ganoderma tuberculosum* pouvaient aussi inhiber la croissance des cellules cancéreuses de la même façon, sinon plus, que le *Ganoderma lucidum* utilisé en médecine traditionnelle asiatique et le *Ganoderma lucidum* européen. Les acides ganodériques A, DM et F, pour lesquels une activité anticancéreuse a été démontrée, n'ont pas été retrouvés dans l'extrait méthanolique de *Ganoderma tuberculosum*. D'un autre côté, l'extrait de cette espèce contient un composé majoritaire correspondant

à un acide ganodérique jusqu'ici jamais décrit : GA FWI. Celui-ci n'a pas montré d'activité antiproliférative significative sur cellules cancéreuses de type PC-3, MCF-7 et HT29. De plus, ce travail a montré que l'activité antiproliférative du *G. lucidum* européen est similaire à celle du *G. lucidum* traditionnellement utilisé en médecine asiatique excepté pour HT29 pour lesquels aucune activité n'a été démontrée pour l'espèce asiatique. Enfin, notre étude illustre l'importance des investigations taxinomiques fiables, avec des méthodes traditionnelles et moléculaires, afin d'identifier clairement les espèces contenant les molécules spécifiques bioactives.

Mots Clefs : Activités antiproliferatives, *Ganodermataceae*, *Ganoderma lucidum*, *Aphyllophoromycetideae*, métabolites secondaires, triterpènes fongiques, acides ganodériques.