



**HAL**  
open science

## Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture

Ibrahima Diallo

► **To cite this version:**

Ibrahima Diallo. Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG042 . tel-02481192

**HAL Id: tel-02481192**

**<https://theses.hal.science/tel-02481192>**

Submitted on 17 Feb 2020

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences des Aliments et Nutrition

Préparée au sein de l'École doctorale GAIA

Unité de recherche QUALISUD

## Titre de la thèse

**Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de  
sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous  
différentes conditions de culture**

Présentée et soutenue publiquement par Ibrahima DIALLO

Le 19 Décembre 2019

Sous la direction du Pr. Alain MICHEL, Unité Mixte de Recherche (UMR) 95 Qualisud

Co-direction : Pr. Françoise FONS, Unité Mixte de Recherche (UMR) 5175 CEFE

Devant le jury composé de

M. Finn KJELLBERG, Directeur de Recherche, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive	Président
Mme Veronica RODRIGUEZ-NAVA, Professeur, Université de Lyon 1	Rapporteur
Mme Anne LANDREAU, Maître de Conférences, Université Angers	Rapporteur
Mme Françoise FONS, Professeur, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive	Examineur
M. Frédéric BOUDARD, Maître de Conférences, Université de Montpellier	Examineur
M. Lonceny TRAORE, Maître de Conférences, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry	Examineur
M. Patrick POUCHERET, Maître de Conférences, HDR, Université de Montpellier	Membre invité
M. Alain MICHEL, Professeur, Université de Montpellier	Membre invité



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## Résumé

*Lentinula edodes* est un champignon comestible cultivé et commercialisé depuis des siècles en raison de ses propriétés nutritionnelles et médicinales. Riche en protéines, en fibres, en minéraux et pauvre en calories, le Shiitake présente de multiples propriétés pharmacologiques. Peu d'études ont évalué l'influence des conditions de culture sur les possibles effets « santé » de ce champignon. Nos travaux ont porté sur la comparaison des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de sporophores (souche identique de Shiitake) issus de 3 producteurs de la région Occitanie Française : deux cultivant en non biologique et un cultivant en biologique. Une extraction séquentielle sous sonication (cyclohexane, chloroforme, éthanol et eau) a été réalisée sur ces champignons suivie d'une caractérisation qui a permis d'identifier des molécules dont l'ergostérol dans les extraits apolaires, l'acide ascorbique et des acides aminés dans les extraits polaires. La capacité antioxydante de chaque extrait a été évaluée en utilisant le DPPH et l'ORAC. L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques et aqueux de tous les producteurs a été évaluée *in vitro* sur un modèle de macrophages inflammatoires. A 1 mg/ml, tous les extraits présentent une activité antioxydante modérée avec un potentiel antioxydant plus prononcé dans les extraits aqueux, alors que la teneur en polyphénols dosée par le réactif de Folin Ciocalteu est plus importante dans les extraits cyclohexaniques. A 50 µg/ml, les extraits éthanoliques inhibent fortement la production du NO de manière concentration dépendante pour les trois producteurs sans affecter la viabilité cellulaire (prétraitement pendant 4 heures ; temps de stimulation par le LPS/IFN $\gamma$  de 24 heures). Par contre, l'inhibition observée pour les extraits aqueux est très faible. Cette activité constatée ne serait pas due à une activité du NO Scavenging des extraits. Le TNF $\alpha$  sécrété dans les surnageants cellulaires des macrophages prétraités par les extraits éthanoliques de Shiitake est inhibé de manière concentration dépendante, contrairement aux extraits aqueux qui n'ont pas un effet inhibiteur sur la molécule. Cette étude préliminaire montre que même si les conditions de culture du Shiitake sur lesquelles nous avons travaillé influencent la teneur en ergostérol, en acides aminés et son pouvoir antioxydant de façon significative, elles n'affectent pas son potentiel anti-inflammatoire *in vitro*.

**Mots clés :** Shiitake, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, culture biologique, culture non biologique.

## Abstract

*Lentinula edodes* is an edible mushroom grown and marketed for centuries due to its nutritional and medicinal properties. Shiitake has multiple pharmacological activities as antioxidant and anti-inflammatory effects. Few studies were performed taking into account the influence of culture conditions to optimize the biological properties of Shiitake mushroom on human health. Our work focused on the comparison of antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of Shiitake fruit bodies cultivated by three mushroom producers in the French Occitanie region using the same strain in various growing conditions (organic and non-organic). Sequential extraction under sonication was performed on freeze dried fungal materials followed by a characterization which made it possible to identify molecules including ergosterol in apolar extracts, ascorbic acid and amino acids in polar extracts. Regarding the bioactive potential of Shiitake, at 1 mg/ml, all extracts have a quantifiable but moderate antioxidant activity with a more pronounced antioxidant potential in the aqueous extracts, while the polyphenol content determined by the Folin Ciocalteu reagent is greater in the cyclohexane extracts. At 50 µg/ml, the ethanol extracts of the three producers strongly inhibit NO production in a dose-dependent manner with absence of cytotoxic effect on cells (pretreatment for 4 h with 24 h of stimulation time with LPS / IFN $\gamma$ ). On the other hand, the inhibition observed for the aqueous extracts is very low. This observed activity would not be due to an activity of NO scavenging of extracts. TNF $\alpha$  secreted in cell supernatants of macrophages pretreated with ethanol extracts of Shiitake is inhibited in a concentration-dependent manner while mushroom aqueous extracts do not have an inhibitory effect. Our results show that the Shiitake growing conditions used in the present study influence the contents of ergosterol and amino acids as well as its antioxidant capacity but do not affect its anti-inflammatory activity *in vitro*.

**Key words:** Shiitake, antioxidant capacity, anti-inflammatory activity, organic and non-organic cultivation.

## *Dedicace*

*A mon feu père Mamoudou DIALLO pour l'éducation, les valeurs morales, le sens de la responsabilité que tu m'as inculqué ainsi que les sacrifices consentis à mon égard. J'aimerais tant que tu sois parmi nous pour fêter ce jour exceptionnel, mais parce que la mort est un chemin où chacun passera, tu seras absent autour de la table à la maison familiale pour fêter cette consécration. Dors en paix cher père, je ne cesserais jamais de prier pour toi.*

*A ma mère Rahmatoulaye DIALLO, dont l'espoir repose sur la réussite de ses enfants. Cette thèse est l'aboutissement de votre dévouement constant, de vos sacrifices, de vos constantes sollicitudes et de vos prières. Merci Maman*

*A mon adorable épouse Mariama DIALLO, pour ton soutien moral inestimable, ta longue patience durant ces 3 années d'aventures et ton amour intarissable.*

*A ma petite fille Assiatou Diari DIALLO, Trouves ainsi résumé en quelques pages le dur travail de ma vie et saches que pour toi, c'est un exemple à suivre.*

*A tous ceux qui m'ont donné le savoir, ne serait ce que pour une demi journée et à tous ceux qui m'ont aidé.*

*A tous mes freres et sœurs : Lamine, Thierno Oury, Bachir (paix à ton âme), Tafsiratou, Djely, Abdoulaye, Yayé Kesso, Maladho, Mouctar, Yayé Fatou et Yayé Assi.*

*A tous ceux qui se battent pour la l'égalité, la justice sociale et la solidarité entre les citoyens de mon pays.*

## Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le créateur de l'univers qui m'a donné la santé, la chance et le courage pour réaliser ce travail. Que tu sois loué éternellement et que ta miséricorde infinie continue à m'accompagner.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR Qualisud pour la partie « *Activités anti-inflammatoires* ». La partie « *Caractérisation et Activités antioxydantes* » a été effectuée au sein du Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFE, de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montpellier sous le financement de l'ambassade de France en Guinée via Campus France dans le cadre de la coopération bilatérale entre les 2 pays.

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, malgré leurs multiples occupations. Je remercie Monsieur **Finn KJELLBERG**, Directeur de Recherche au Centre d'Ecologie Fonctionnel et Evolutive du CNRS pour avoir accepté de présider ce jury. Toute ma reconnaissance à **Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA** Professeur à l'Université de Lyon I et de **Madame Anne LANDREAU**, maître de Conférences à l'Université d'ANGERS pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je voudrais remercier vivement mon Directeur de thèse Monsieur le **Pr. Alain MICHEL** et ma codirectrice de thèse Madame le **Pr. Françoise FONS** pour avoir accepté de m'accueillir dans vos laboratoires respectifs et de la confiance qui vous avez porté en moi en me confiant ce sujet de thèse. Vos critiques et suggestions constructives ainsi que vos orientations scientifiques irréprochables m'ont été d'un apport inestimable.

Je remercie infiniment Docteur **Patrick POUCHERET** et Docteur **Lonceny TRADRE** pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Messieurs, Grand merci pour votre grande implication et votre engagement du début jusqu'à la fin de ce travail. Je suis convaincu que vous deux, vous avez eu l'une des tâches les plus difficiles car étant les acteurs qui ont fourni toute la documentation et qui ont menés toutes les démarches auprès de l'ambassade de France en Guinée qui ont abouti à l'attribution de la bourse à ma modeste personne. Vous avez été d'un soutien précieux pour moi.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame le **Pr. Sylvie RAPIOR** pour sa disponibilité indéfectible durant cette aventure. Ce fut un travail de longue haleine, qui a été accompli grâce à votre sens critique et à vos conseils avisés. Merci pour tous ces articles que vous n'avez cessé de m'envoyer jusqu'à la dernière minute pour enrichir et valoriser cette thèse. Je tiens à vous exprimer également infiniment toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit. Ni aurai été votre disponibilité et votre perspicacité, ma bibliographie ne pouvait être aussi riche. Ce travail est le vôtre.

Je remercie sincèrement et de façon infinie, le Docteur **Frédéric Boudard** et Docteur **Sylvie MOREL** (tous maître de conférences à la faculté de pharmacie de l'Université de Montpellier) pour leur implication technique et scientifique lors de la réalisation de travail. Les années passées à vos côtés m'ont permis de découvrir des chercheurs aux qualités intellectuelles immenses et un exemple de disponibilité. Les mots ne sauront jamais assez ressortir le profond respect et toute l'admiration que j'ai à votre égard. Soyez rassuré de ma grande estime et de ma parfaite reconnaissance. Tous nos échanges ont laissé des traces positives dans ce parcours. Que dire de vos orientations scientifiques et de vos encouragements qui ont permis de cultiver en moi un esprit critique. Vous êtes tout simplement des sources d'inspiration et des modèles pour moi dans le domaine de la recherche scientifique.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à ces vaillantes dames qui ont été une boussole pendant tous mes travaux de thèse. Il s'agit de **Manon VITOU** et de **Caroline GUZMAN**. Votre disponibilité, votre aide et votre amitié sont sans reproches. Vous avez été géniales et merveilleuses. Que dire de vos conseils, de nos discussions scientifiques et de nos rires au laboratoire et pendant la pause où nous refaisons le monde ? Grâce à vous, nous avons traqué plusieurs molécules, même si certaines parmi elles que nous aimions avoir, ont refusé de refaire surface (rires). Toutes ces séances de rires et de sourires avec Philippe et Sylvie MOREL je m'en souviendrais longtemps. Vous faites partir désormais de ma famille.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et toute mon amitié à tout le personnel du laboratoire de botanique, je vais nommer **Laurence MONDOLOT** (que j'appelle affectueusement ma Maman chérie), **Philippe LAFISCA** et **Florence JEGO** pour la bonne humeur et cette chaleur amicale que vous avez exprimée à mon endroit pendant ces 3 ans. Merci pour toutes ces invitations à manger.

À ma chère maman, mes frères, mes sœurs, mes oncles, mes tantes sans exception et à ma belle famille, merci pour les sacrifices consentis à mon égard. Vous êtes ma force et la raison de mon combat.

Je voudrais remercier du fond cœur, **Sylvie MUNIER** pour ses coups de mains qu'elle m'a apporté pour la lyophilisation de mes extraits, **Madame Nathalie SAINT** pour les stats, **Erik CHAILLAN** pour ses efforts fournis lors de la mise en forme de ce manuscrit, **Karine PRÉTET** et **Florence BICHON** pour leur bonne humeur. Je vous en serais toujours éternellement reconnaissant.

Je remercie également tous mes amis doctorants **François GBOGBIRI**, **Ali MEBARKI**, **Mamady DIAWARA**, **Bourahima BAMBA** pour leurs amitiés et les échanges fructueux que nous avons partagés ensemble.

À mes ami(e)s proches et d'enfances : **Sékou KEITA**, **Boubacar Loulou DIALLO**, **Alpha Dumar Sow**, **Ibrahima Sory BARRY**, **Hadja Ramata BALDE**, **Tno Aliou DIALLO**, **Kaoussoulaye DIALLO**, **Abdoul Karim DIALLO**, **Mamadou Alpha DIALLO (polcuteur)**, **Saidou Aliou (Laifou)** pour vos constants encouragements.

À tous les stagiaires avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer durant cette thèse au laboratoire de botanique: **Valentin CELLARD** et **Chambaud MARINE**, je vous remercie pour la qualité de vos contributions dans ce travail.

A mon adorable et courageuse épouse, je te remercie pour le sacrifice et le pardon consenti à mon égard. Ton écoute, ta patience et ton amour m'ont permis de surmonter l'impossible. Je t'aime Madame **Mariama IDD DIALLO**.

A tous ceux qui m'ont soutenu, aidé d'une manière ou d'une autre pendant ces années pleines d'émotions, de joies et de stress parfois, je vous dis MERCI et je vous en serais reconnaissant pour le reste de ma vie.



## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract .....	ii
<i>Dédicace</i> .....	ii
Remerciements .....	iv
Liste des Publications et Communications.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Introduction.....	1
Première partie : Bibliographie et état de l’art sur le sujet de thèse.....	4
Chapitre I : Généralités sur <i>Lentinula edodes</i> .....	5
1.1 Introduction à la mycologie.....	5
1.1.1 Définition.....	5
1.1.2 Règne des fungi .....	5
1.1.3 Modes de vie des champignons .....	6
1.2 Aspect mycologique du Shiitake.....	7
1.2.1 Historique.....	7
1.2.2 Description mycologique.....	8
1.2.3 Cycle de reproduction .....	9
1.2.4 Taxonomie (Classification).....	10
1.3 Composition chimique.....	11
1.3.1 Macronutriments .....	12
1.3.2 Micronutriments .....	16
1.3.3 Les composés organiques volatiles .....	18
1.3.4 Les acides organiques.....	19
1.3.5 Les polyphénols .....	19
1.4 Culture du Shiitake .....	26
1.4.1 Exigences nutritionnelles et facteurs environnementaux pour sa culture .....	26
1.4.2 Les types de cultures .....	29
1.5 Conservation.....	32
1.5.1 Séchage.....	32
1.5.2 Congélation.....	32

1.5.3	Dans le vinaigre .....	32
1.5.4	Dans l'huile .....	32
2	Chapitre II : Propriétés biologiques.....	33
2.1	Activité antioxydante .....	33
2.1.1	Bref rappel du stress oxydant.....	33
2.1.2	Shiitake et activité antioxydante .....	36
2.2	Activité anti-inflammatoire .....	42
2.2.1	Rappel sur l'inflammation .....	42
2.2.2	Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation .....	42
2.2.3	Types d'inflammation.....	43
2.2.4	Les médiateurs inflammatoires.....	45
2.2.5	Les anti-inflammatoires.....	49
2.2.6	Shiitake et activité anti-inflammatoire.....	51
2.3	Autres activités.....	53
2.3.1	Activité hypocholestérolémiante .....	53
2.3.2	Activités hypoglycémiantes.....	55
2.3.3	Activités anti-cancéreuses.....	56
2.3.4	Activités antibactériennes et antifongiques.....	63
2.3.5	Activité hépatoprotectrice .....	66
	Deuxième partie : Travaux de thèse.....	71
1	MATERIEL ET METHODES .....	72
1.1	Produits chimiques .....	72
1.2	Matière fongique.....	72
1.3	Préparation des échantillons.....	73
1.4	Procédure d'extraction des molécules.....	73
1.5	Criblage chimique sur chromatographie sur couche mince.....	75
1.6	Caractérisation des extraits par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) .....	75
1.6.1	Analyse des polyphénols et de l'acide ascorbique .....	76
1.6.2	Identification et quantification de l'ergostérol .....	77
1.6.3	Identification de la lovastatine et de $\alpha$ -tocophérol .....	78
1.7	Carctérisation des extraits par chromatographie sur couche mince .....	78
1.7.1	Détection des acides phénoliques (Acide vanillique et acide gallique) et acide ascorbique .....	78
1.7.2	Identification de l'ergostérol et de l' $\alpha$ -tocophérol.....	78

1.7.3	Identification, séparation et quantification des acides aminés .....	79
1.8	Dosage des polyphénols totaux .....	79
1.9	Détermination du pouvoir antioxydant des extraits <i>in vitro</i> .....	80
1.9.1	DPPH .....	80
1.9.2	ORAC.....	81
1.10	Activité anti-inflammatoire .....	81
1.10.1	Mesure de la viabilité cellulaire par le test MTS/PMS .....	81
1.10.2	Effet des extrais sur la production de NO par les macrophages inflammatoires.....	82
1.10.3	Dosage du NO par la méthode de Griess .....	82
1.10.4	Activité NO scavenging des extraits .....	83
1.10.5	Effet des extraits sur la production de TNF $\alpha$ par les macrophages inflammatoires.....	83
1.10.6	Dosage du TNF $\alpha$ dans les surnageants de culture .....	83
2	RESULTATS.....	85
2.1	Extraction et rendement d'extraction.....	85
2.2	Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM).....	86
2.3	Analyse des chromatogrammes par la chromatographie liquide à haute performance .....	89
2.4	Caractérisation des extraits par la chromatographie liquide haute performance.....	92
2.4.1	Caractérisation des acides phénoliques et de l'acide ascorbique.....	92
2.4.2	Identification de l' $\alpha$ -tocophérol .....	94
2.4.3	Identification et quantification de l'ergostérol .....	95
2.5	Caractérisation des extraits par chromatographie sur couche mince .....	98
2.5.1	Identification de l'acide ascorbique .....	98
2.5.2	Identification de $\alpha$ -tocophérol .....	99
2.5.3	Identification, séparation et quantification des acides aminés .....	100
2.6	Teneur en polyphénols totaux .....	103
2.7	Activité antioxydante des extraits.....	105
2.7.1	Activité antioxydante des extraits du Shiitake .....	105
2.7.2	2,2 diphényle-1-picryl-hydrazyl (DPPH).....	106
2.7.3	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) .....	108
2.8	Activité anti-inflammatoire .....	109
2.8.1	Effet des extraits éthanoliques et aqueux du Shiitake sur la viabilité cellulaire .....	109
2.8.2	Effet des extraits sur la production de NO par les macrophages inflammatoires .....	111
2.8.3	Activité du NO scavenging des extraits éthanoliques et aqueux .....	113
2.8.4	Dosage du TNF $\alpha$ .....	114

3	DISCUSSION .....	118
3.1	Extraction .....	118
3.2	Polyphénols totaux.....	119
3.3	Activités antioxydantes .....	124
3.3.1	DPPH .....	124
3.3.2	ORAC.....	125
3.4	Activité anti-inflammatoire des extraits polaires sur les cellules J774.A1 .....	129
3.4.1	Dosage du NO.....	129
3.4.2	Dosage du TNF $\alpha$ .....	131
	Conclusion et perspectives.....	134
	Références bibliographiques .....	137
	Annexes .....	174
	Annexe 1: Article 1 .....	174
	Annexe 2 : Communication orale .....	176
	Annexe 3 : Poster 1.....	177
	Annexe 4 : Poster 2.....	179
	Annexe 5 : Poster 3.....	180
	Annexe 6 : Poster 4.....	181

## Liste des Publications et Communications

Les résultats de ce travail ont été publiés sous forme d'article et communications :

### A. Publication

Diallo I., Boudard F., Morel S., Vitou M., Guzman C., Saint N., Michel A., Rapior S., Traoré L., Poucheret P., et Fons F. Antioxidant and Anti-inflammatory Potential of *Lentinula edodes* (Shiitake) Sporophores from Various Cultures Conditions. (Soumis le 27/09/2019 dans *International Journal of Medicinal Mushrooms*). Impact factor 2017= 1,423; 5-year IF = 1,525.

### B. Communications nationales et internationales

Ce travail a été aussi valorisé et a fait l'objet de communications orale et par affiche

#### I. Communication orale

Diallo I., Morel S., Rapior S., Traoré L., Michel A., Poucheret P., Vitou M., et Fons F. Potentiel antioxydant de *Lentinula edodes* (Shiitake) issu de différents modes de culture. 7<sup>ème</sup> Journées Scientifiques de l'Agro-alimentaire (JSAA-2019) (Hammamet, Tunisie du 17 au 20 Mars 2019).

#### II. Communications affichées

1. Diallo I., Michel A., Poucheret P., Morel S., Vitou M., Traoré L., Rapior S. et Fons F. *Lentinula edodes* (Shiitake), an edible nutritional and medicinal mushroom: health benefits and risks. iCEPS Conference 2017, 5<sup>ème</sup> édition. Non-pharmacological interventions: from methodology to evidence of efficacy (Montpellier, France, 18-20/05/2017). Poster E9. hal-02267085.
2. Diallo I., Morel S., Michel A., Poucheret P., Vitou M., Traoré L., Rapior S. et Fons F. Nutritional and antioxidant properties of *Lentinula edodes* (Shiitake) from various culture conditions. 5<sup>ème</sup> Symposium International AFERP « Pharmacognosy from here and there » (Angers, France, 17-19/07/2017). Poster 19, page 51. hal-02267094.
3. Diallo I., Michel A., Poucheret P., Morel S., Vitou M., Traoré L., Rapior S. et Fons F. *Lentinula edodes* (Shiitake) : Intérêt nutritionnel, potentiel thérapeutique et risques. 27<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques des Enseignants-Chercheurs en Sciences Végétales et Fongiques des UFR de Pharmacie francophones STOLON (Dijon, France, 28-30/08/2017). hal-02267097.

4. Diallo L., Michel A., Poucheret P., Morel S., Vitou M., Traoré L., Rapior S. et Fons F. *Lentinula edodes* (Shiitake) et cancer : Propriétés pharmacologiques, essais cliniques et preuves d'efficacité. iCEPS Conférence 2018, 6<sup>ème</sup> édition. Cancer : l'efficacité des Interactions Non Médicamenteuses (Montpellier, France, 23/03/2018). hal-02267074

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Taxonomie du Shiitake</i> .....	11
<i>Tableau 2: Composition nutritionnelle en macronutriments du Shiitake pour 100 g de champignon selon</i> .....	12
<i>Tableau 3 : Composition en acides aminés dans le Shiitake.</i> .....	15
<i>Tableau 4 : Besoin de l'organisme en acides aminés</i> .....	16
<i>Tableau 5 : Composition nutritionnelle en micronutriments</i> .....	17
<i>Tableau 6 : Acides phénoliques identifiés dans le Shiitake</i> .....	23
<i>Tableau 7 : Les extraits et les méthodes utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante de Shiitake</i> .....	38
<i>Tableau 8 : Résumé succinct des effets biologiques et origines des principaux médiateurs de l'inflammation</i> .....	48
<i>Tableau 9 : Quelques études sur l'activité anti-cancéreuse du Shiitake</i> .....	58
<i>Tableau 10 : Concentration minimale inhibitrice et zone d'inhibition (en mm) de l'extrait de Shiitake</i> .....	65
<i>Tableau 11 : Récapitulatifs général des principes actifs du Shiitake, leurs activités biologiques et leurs modes d'actions</i> .....	68
<i>Tableau 12 : Nomenclature des différents extraits en fonction du solvant d'extraction</i> .....	74
<i>Tableau 13 : Gradient de solvant pour acides phénoloques et acide ascorbique</i> .....	77
<i>Tableau 14 : Gradient du solvant pour l'ergostérol</i> .....	78
<i>Tableau 15 : Rendement d'extraction des producteurs A, B et C en fonction de leurs extraits</i> 85	
<i>Tableau 16 : Molécules d'intérêt révélées par la CCM</i> .....	86
<i>Tableau 17 : Identification et quantification des composés phénoliques des extraits des producteurs A, B et C déterminée par HPLC-DAD.</i> .....	93
<i>Tableau 18 : Quantité d'ergostérol dans les extraits des trois producteurs.</i> .....	97
<i>Tableau 19 : Acides aminés identifiés par chromatographie sur couche mince.</i> .....	101
<i>Tableau 20 : Teneur en acides aminés dans les extraits.</i> .....	101
<i>Tableau 21 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de chaque producteur en µg GAE/mg d'extrait</i> .....	103
<i>Tableau 22: Activité antioxydante des extraits des producteurs A, B et C dans différents solvants d'extraction.</i> .....	106
<i>Tableau 23 : Résultats test DPPH (EC<sub>50</sub> de l'ergostérol et de l'α-tocophérol).</i> .....	108

<i>Tableau 24 : Activité NO scavenging des extraits éthanoliques et aqueux pour les producteurs A, B et C.</i> .....	114
<i>Tableau 25 : Tableau comparatif du dosage du Folin, des conditions d'extraction et de l'expression des unités issu de la littérature</i> .....	122
<i>Tableau 26 : Comparaison de l'activité antioxydante, des conditions de cultures, de la souche utilisée, de la méthode d'extraction et du dosage issue de la littérature utilisant la méthode d'ORAC.</i> .....	127

### **Liste des figures**

<i>Figure 1 : Champignon Shiitake, crédit photos : F.FONS</i> .....	8
<i>Figure 2 : Cycle de reproduction du Shiitake</i> .....	10
<i>Figure 3 : Structure chimique du Lentinane</i> .....	14
<i>Figure 4 : Classification des polyphénols</i> .....	20
<i>Figure 5 : Quelques molécules phénoliques</i> .....	21
<i>Figure 6 : Structure chimique des flavonoïdes</i> .....	25
<i>Figure 7 : Les activités biologiques connues du shiitake</i> .....	33
<i>Figure 8 : Différents facteurs du stress oxydatif</i> .....	34
<i>Figure 9 : Conséquences du stress oxydatif</i> .....	35
<i>Figure 10 : Déséquilibre entre molécules pro et anti-inflammatoires</i> .....	45
<i>Figure 11 : Molécules d'éritadénine</i> .....	55
<i>Figure 12 : Voies possibles de l'action du lentinane</i> .....	63
<i>Figure 13 : Protocole d'extraction</i> .....	74
<i>Figure 14 : Schéma de fonctionnement d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse</i>	76
<i>Figure 15 : Profils de la répétabilité des chromatogrammes des extraits apolaires des producteurs A, B et C, révélés au H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	87
<i>Figure 16 : Révélateur spécifique des composés phénoliques (NEU) : visualisation de composés phénoliques à 360 nm.</i> .....	87
<i>Figure 17 : CCM des extraits polaires révélés à la Ninhydrine. A) extraits éthanoliques, B) extraits aqueux</i> .....	88
<i>Figure 18 : CCM sur plaque de verre des extraits apolaires, éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (90:10) après pulvérisation de DPPH. A) extraits cyclohexaniques, B) extraits chloroformiques</i> .....	89



<i>Figure 19 : Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits cyclohexaniques des trois producteurs (A, B et C) à 254 nm</i> .....	90
<i>Figure 20 : Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits chloroformiques des trois producteurs (A, B et C) à 254 nm.</i> .....	91
<i>Figure 21 : Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits aqueux des producteurs A, B et C à 254 nm.</i> .....	91
<i>Figure 22: Chromatogramme de l'α-tocophérol. On observe un pic majoritaire à 49.5 min (α-tocophérol) et un autre à 48,9 min correspondant à un produit de dégradation.</i> .....	94
<i>Figure 23 : Chromatogrammes de l'extrait C1 (identique pour cette portion à ceux des autres extraits).</i> .....	94
<i>Figure 24 : Chromatogramme de l'ergostérol dans l'extrait 1 du producteur A et du standard avec un temps de rétention à 12 minutes.</i> .....	95
<i>Figure 25 : Formule chimique de la molécule d'ergostérol</i> .....	96
<i>Figure 26 : Spectre UV de l'acide ascorbique et des extraits</i> .....	98
<i>Figure 27 : A) Chromatographies sur couche mince des extraits apolaires des producteurs A, B et C utilisant l'α-tocophérol comme témoins. B) Comparaison des spectres UV des composés détectés en CCM: Au Rf = 0,73 de l'α-tocophérol (en vert, λ<sub>max</sub>=292 nm) et au Rf = 0,74 des extraits (en violet, λ<sub>max</sub>=280 nm).</i> .....	99
<i>Figure 28 : Identification des acides aminés (Isoleucine, Valine et Alanine) par CCM avec révélation à la Ninhydrine</i> .....	100
<i>Figure 29 : Formules des acides aminés identifiés par chromatographies sur couche mince dans les extraits éthanoliques des producteurs A, B et C.</i> .....	102
<i>Figure 30 : Chromatogrammes: A) de l'extrait éthanolique, B) des standards observés à 254 nm</i> .....	102
<i>Figure 31 : Teneur en polyphénols. A) en fonction des producteurs, B) en fonction des extraits. Les résultats sont la moyenne ± SEM (n=3 expériences indépendantes)</i> .....	104
<i>Figure 32 : Test de quelques molécules polaires avec le Folin Ciocalteu. En rouge : 1=acide linoléique, 2=céramide, 3=acide palmitique, 4=β-sitostérol, 5=ergostérol. En jaune : 1= α-tocophérol</i> .....	105
<i>Figure 33 : Activité antioxydante des extraits des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne ± SEM (n=3 expériences indépendantes). ***p&lt;0.001 pour producteur A versus producteur B; \$\$\$p&lt;0.001 pour producteur A versus producteur C; #p&lt;0.05, ###p&lt;0.001 pour producteur B versus producteur C.</i> .....	107

*Figure 34 : Valeurs ORAC des extraits des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne ± SEM (n=3 expériences indépendantes). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 pour producteur A versus producteur C; \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001; pour producteur B versus producteur C. 109*

*Figure 35 : Viabilité cellulaire de l'extrait aqueux des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne ± écart type (n=3 expériences indépendantes) ..... 110*

*Figure 36 : Effet de 2 et 4 heures de prétraitement des cellules J774 avec les extraits éthanoliques du Shiitake sur la production du NO induite par le LPS/IFN $\gamma$ . Les résultats sont la moyenne ± écart type (n=3 expériences indépendantes) ..... 111*

*Figure 37 : Effet des extraits éthanoliques des producteurs A, B et C sur la production de l'oxyde nitrique à 24 h et 48 h de stimulation. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3 expériences indépendantes). \*\*\* p<0,001, inhibition résultant de 50  $\mu\text{g}$  / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition; \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001, inhibition résultant de 25  $\mu\text{g}$  / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition; £ p = 0,01, inhibition résultant de 12,5  $\mu\text{g}$  / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition;  $\alpha$  p<0,05, inhibition résultant de 6,25  $\mu\text{g}$  / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition..... 112*

*Figure 38 : Effet des extraits aqueux des producteurs A, B et C sur la production de l'oxyde nitrique à 24 et 48 heures de stimulation. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3 expériences indépendantes)..... 113*

*Figure 39 : Effet des extraits éthanoliques des producteurs A, B et C sur la production du TNF $\alpha$ . Les résultats, exprimés en % d'inhibition de la production de TNF $\alpha$  correspondent à la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes..... 115*

*Figure 40 : Effet des extraits aqueux des producteurs A, B et C sur la production du TNF $\alpha$ . Les résultats, exprimés en % d'inhibition de la production de TNF $\alpha$  correspondent à la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. .... 116*

*Figure 41 : Comparaison entre les extraits éthanoliques et aqueux du même producteur sur la production de NO par les macrophages inflammatoires. .... 131*

## Liste des abréviations

<b>AAPH :</b>	2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride
<b>ABTS :</b>	2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)
<b>AFSSA :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AINS :</b>	Anti-inflammatoire Non Stéroïdienne
<b>ALAT</b>	Alanine amino-transférase
<b>ASAT</b>	lAspartate amino transférase
<b>ANOVA :</b>	Analyse de la variance
<b>AVC :</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>BAAE</b>	Butanol-Acetate d'éthyl-Acide acétique-Eau
<b>BAE</b>	Butanol-Acetate d'éthyl-Eau
<b>BHA :</b>	Butyl-hydroxy-anisole
<b>BHQ :</b>	Buty-hydroxy-quinone
<b>BHT</b>	Buty-hydroxy-toluène
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CLHP :</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>COV :</b>	Composés Organiques Volatils
<b>DAD :</b>	Diode Array Detector
<b>DAMP :</b>	Damage-Associated Molecular Pattern
<b>DMSO :</b>	Diméthylsulphoxyde
<b>DPPH :</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>ELISA :</b>	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
<b>ERO</b>	Espèce Réactive de l'Oxygène
<b>FAO :</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation
<b>FC</b>	Folin Ciocalteu
<b>FRAP :</b>	Ferric Reducing Antioxidant Power
<b>GAE :</b>	Equivalent d'Acide Gallique
<b>HAT :</b>	Hydrogen Atom Transfert
<b>HDL :</b>	Hight Density Lipoprotein
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration Inhibitrice de 50% de l'activité

<b>IFN :</b>	Interféron
<b>IκB :</b>	Inhibitor kappa B
<b>iNOS :</b>	Oxyde Nitrique Synthétase inductible
<b>LC-MS</b>	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
<b>LEM :</b>	<i>Lentinula edodes</i> Mycelia
<b>LDL :</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharides
<b>MAMP :</b>	Microbial Associated Molecular Pattern
<b>MTS :</b>	Sel de tétrazolium
<b>MTT :</b>	bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NFκB :</b>	Nuclear Factor-kappa B
<b>NO :</b>	Nitrique Oxide
<b>OH· :</b>	Radical Hydroxyle
<b>ONOO· :</b>	Peroxynitrite
<b>ORAC :</b>	Oxygen Radical Absorbance Capacity
<b>PAMP :</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PG :</b>	Prostaglandine
<b>PMS :</b>	phenazine methosulfate
<b>ROOH :</b>	Radical peroxyde
<b>RPMI :</b>	Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute
<b>SEM :</b>	Standard Error of the Mean
<b>SET :</b>	Single Electron Transfert
<b>SNP :</b>	Sodium nitroprusside
<b>SOD :</b>	Superoxyde Dismutase
<b>TEAC :</b>	Trolox Equivalent Antioxydant Capacity
<b>TG :</b>	Triglycéride
<b>TNFα :</b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>UV :</b>	Ultraviolet

## Introduction

Au cours de son fonctionnement, l'organisme a besoin de façon indispensable de l'oxygène par la mise en place d'un système capable de le métaboliser et de produire de l'énergie pour alimenter l'ensemble des cellules et des organismes vivants (**Sanchez, 2017**). L'oxygène est une molécule indispensable à la vie chez l'homme ; elle est également à l'origine d'une toxicité car elle est capable de générer dans la cellule des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (**Haleng *et al.*, 2007**), ou le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (**Bakasso, 2009**). Ces ERO sont réputées pour avoir un rôle à double facette dans les organismes vivants (**Valko *et al.*, 2004**), car bénéfiques, lorsqu'elles participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction des cellules tumorales par apoptose (**Favier, 2003**). Cependant, lorsqu'elles sont produites en quantité excessive et non contrôlée, les ERO peuvent devenir toxiques pour les composants de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques (**Sanchez, 2017**) et par conséquent conduit au stress oxydatif (**Evans & Halliwell, 1999 ; Valko *et al.*, 2004**).

Ce phénomène oxydatif est défini comme un déséquilibre entre le système antioxydant et la production d'oxydants (EROs) (**Gutteridge, 1993 ; Delattre *et al.* 2005**) ; il est largement impliqué dans le vieillissement et dans l'apparition de certaines pathologies telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'ostéoporose, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires (**Avci *et al.*, 2014 ; Sanchez, 2017**).

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes puissant (**Haleng *et al.*, 2007**). On distingue deux sources d'antioxydants. L'une est endogène et se compose d'enzymes notamment : la superoxyde dismutase capable de contribuer à la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire ; la catalase destinée à catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire et la glutathion peroxydase, qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (**Kozarski *et al.*, 2015b ; Ighodaro et Akinloye, 2018**). L'autre est exogène non enzymatique et est apportée par l'alimentation. Ce sont les caroténoïdes, les oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium, magnésium et manganèse), les polyphénols ainsi que les vitamines A, C et E (**Favier, 2003 ; Haleng *et al.*,**

**2007 ; Fofana, 2011).** Ces antioxydants agissent en bloquant ou inhibant à la fois la formation et la propagation des radicaux libres (**Shah et Modi, 2015**).

A cela s'ajoute les antioxydants synthétiques, notamment le butyl-hydroxy-toluène (BHT), le butyl-hydroxy-anisole (BHA) et le tertio-butylhydroquinone (TBHQ) utilisés comme additifs depuis des années dans l'industrie alimentaire comme inhibiteurs potentiels de l'oxydation des lipides. Mais il s'est avéré récemment que ces molécules possèdent des effets indésirables sur la santé de l'homme. Plusieurs études ont montré que ces antioxydants synthétiques sont toxiques voire cancérigènes (**Kahl & Kappus, 1993 ; Panicker et al., 2014**). Au vu de leur impact sur la santé leur utilisation est donc compromise ; pour cela de nombreuses équipes de recherche s'orientent vers l'identification et la valorisation d'antioxydants ayant le label naturel (**Shah et Modi, 2015**).

De plus, face à l'émergence de nouvelles maladies chroniques notamment les maladies inflammatoires et aux multiples effets indésirables de certains traitements chimiques médicamenteux plusieurs chercheurs se sont intéressés à de nouvelles alternatives thérapeutiques comme la phytothérapie, l'aromathérapie, la supplémentation alimentaire et la mycothérapie (**Coste, 2015 ; Piatte, 2016 ; Cassar, 2016**) en fondant leur démarche sur les savoirs ancestraux (**Ngo, 2011; Le gouill, 2012 ; Guissou et al., 2014**). Il est admis que certains champignons peuvent être à la fois comestibles ou non, et présenter des propriétés médicinales et fonctionnelles très importantes (**Haimed, 2007**). Autrefois considérés comme des aliments à faible valeur nutritive, les champignons suscitent à ce jour un intérêt particulier et présentent à l'image des plantes médicinales des propriétés bénéfiques sur la santé humaine dont entre autres les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-hypocholestérolémiant, neuroprotectrice etc (**Friedman, 2016 ; Gunawardena et al., 2014 ; Ezzudin et al., 2018 ; Čilerdžić et al., 2019 ; Gomes et al., 2019**) immuno-modulation (**Yin et al., 2007**). Désormais, les champignons sont considérés comme des aliments « santé » (**Cho et al., 2003 ; Cassar, 2016**); les consommateurs n'hésitent pas à les inclure dans une diète visant notamment une bonne santé cardiovasculaire (**Yu et al., 2016**).

Parmi ces champignons, on peut citer :

- ✓ *Agaricus bisporus* (champignon de paris)
- ✓ *Grifola frondosa* (Maitake)
- ✓ *Lentinula edodes* (Shiitake ou Lentin du chêne) qui fait l'objet de cette étude.

En effet, Le Lentin du chêne (*Lentinula edodes*) est un champignon comestible cultivé et aussi commercialisé comme complément alimentaire. Ce champignon fait l'objet d'une culture

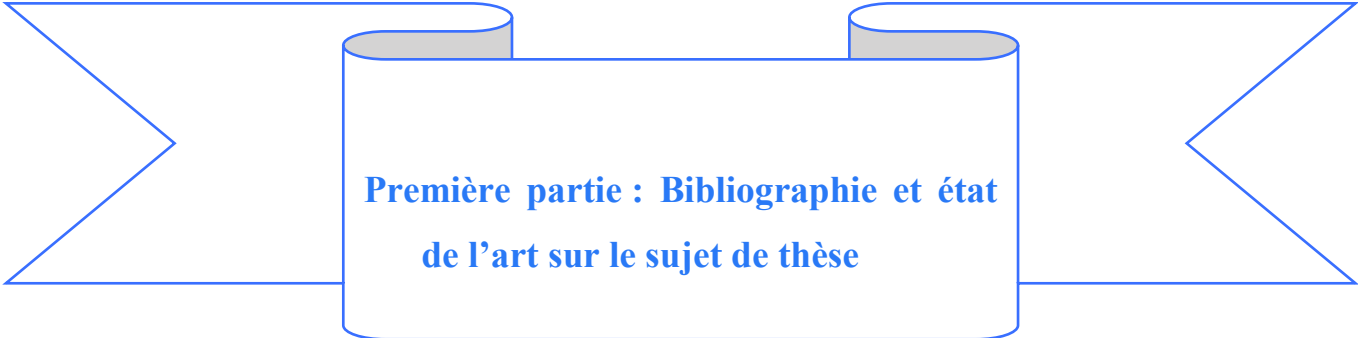
intensive en Asie (notamment en Chine, au Japon et en Inde), aux Etats-Unis mais aussi en Europe et particulièrement en France. Très apprécié pour son goût parfumé, il est vendu frais ou sec sous le nom de Lentin du chêne ou Shiitake (**Zhang et al., 2013 ; Finimundy et al., 2014**). Il est sans doute le champignon le plus connu et le plus cultivé après le champignon de paris et représente 25 % de la production mondiale des champignons. D'un point de vue nutritionnel, le Lentin du chêne a, comme les autres champignons comestibles, une richesse élevée en protéines (**Krittalak et al., 2018**) allant de 16 à 22,8 g/100g de poids sec (**Regula et al., 2007 ; Biesen et al., 2010; Heleno et al., 2015**). De même, il contient des fortes teneurs en éléments minéraux, oligoéléments et vitamines. Ce qui en fait un aliment diététique de qualité. Sa faiblesse en calories est tout à fait appréciée pour certains régimes.

Outre sa valeur nutritionnelle et son goût très recherché par les consommateurs (**Mleczek et al., 2017**), le Shiitake constitue une source importante d'agents bioactifs (**Diallo et al., 2017c**) ayant plusieurs propriétés biologiques (**Borchers et al., 1999 ; Poucheret et al., 2006 ; De Silva et al., 2012 ; De Silva et al., 2013 ; Diallo et al., 2017c**). Parmi ces principes bioactifs, l'ergostérol (**Mattila et al., 2002 ; Ruiz-Rodriguez et al., 2009**), l'ergothioneine, l'éritadénine (**Enman et al., 2007 ; Yoshino et al., 2016**), les polysaccharides (**Chihara et al., 1970a; Mah-Lee et al., 2002 ; Yin et al., 2007; Ya, 2017**) et les composés phénoliques (**Reis et al., 2012 ; Yildiz et al., 2015 ; Heleno et al., 2015**) ont reçu une attention particulière de la part des chercheurs œuvrant dans le domaine alimentaire, pharmaceutique et biomédical.

Les aptitudes de guérison prêtées au Shiitake s'avèrent-elles exactes ? Pour y répondre, depuis quelques années, des nombreux scientifiques ont lancé des recherches, afin de déterminer l'éventuel secret des pouvoirs légendaires au Lentin du chêne. Malheureusement peu d'études approfondies ont été menées sur ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires en fonction des conditions de cultures.

D'où le sujet intitulé : **Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture.**

L'objectif de ce doctorat, consistera à analyser l'effet de plusieurs producteurs de la région Occitanie (utilisant une même souche), sur les profils chimiques (composés phénoliques) et pharmacologiques (capacité antioxydante et anti-inflammatoire) du Shiitake. La corrélation entre composition chimique et effets santé sera évaluée par la mesure de l'activité antioxydante et de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par différents tests complémentaires.

A decorative banner with a central rectangular box. The banner has a blue outline and a light blue fill. The central box has a blue outline and a light blue fill. The text is centered within the box.

**Première partie : Bibliographie et état  
de l'art sur le sujet de thèse**



# Chapitre I : Généralités sur *Lentinula edodes*

## 1.1 Introduction à la mycologie

### 1.1.1 Définition

La mycologie est définie comme une science, qui s'occupe de l'étude des champignons. Les champignons sont apparus sur terre il y a environ 4,5 milliards d'années (**Kerfez et al., 2015**). Le Crétacé et le Tertiaire marque la date de leur apparition, et on peut voir leurs traces dans certains fossiles et surtout dans l'ambre (**Bouchet et al., 1999**). Les premiers fossiles ressemblant aux champignons actuels datent du Silurien, soit environ 410 millions d'années. Certains ascomycètes ont été reconnus du Carbonifère. On dénombre actuellement plus de 400 genres issus des fossiles trouvés sur notre planète (**Ramirez, 1982**).

### 1.1.2 Règne des fungi

Le règne des *Fungi*, appelé aussi Mycètes regroupe des organismes eucaryotes (c'est-à-dire possédant un noyau qui est entouré par une membrane nucléaire dans laquelle se trouve la plus grande partie du matériel génétique nécessaire à la vie) (**Cassar, 2016**). « *Ce règne constitue un groupe complexe et diversifié, englobant les organismes unicellulaires (levures) ou pluricellulaires (moisissures) microscopiques, invisibles à l'œil nu, jusqu'aux « champignons supérieurs » composés le plus souvent d'un pied et d'un chapeau supportant la partie fertile* » (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Fungi>).

Contrairement au règne végétal, les *Fungi* ne peuvent pas utiliser directement l'énergie du soleil, donc incapable d'effectuer la photosynthèse. C'est pour dire que l'alimentation des *Fungi* est donc puisée en absorbant les substances nutritives du matériel organique préformé dans ou sur lequel ils vivent (**Kerfez, 2015**). Le mycélium qui est la partie végétative des *Fungi* est constitué principalement de filaments appelés hyphes mycéliennes. Il produit des exoenzymes qui peuvent lui faciliter la dégradation des substances nutritives présentes dans son environnement (**Bramki et al., 2016**). La partie mycélienne, pérenne, est souterraine ou à l'intérieur de divers substrats (bois, animaux...). Dans des conditions idéales de température et d'humidité convenables, les hyphes sexuellement compatibles de certaines espèces fusionnent et deviennent par la suite un sporophore, éphémère. C'est la partie que l'on remarque le plus dans la nature : elle constitue une « fructification ». L'ensemble formé par le mycélium souterrain et par le sporophore (anciennement appelé carpophore), le plus souvent érigé est appelé champignon (**Bramki et al., 2016 ; Cassar, 2016**).

Actuellement, le règne fongique s'articule principalement autour de cinq grandes divisions qui sont :

- a) ***Chytridiomycota*** : Ce sont des espèces aquatiques et microscopiques avec des spores uniflagellés. Ils sont considérés comme étant les ancêtres des champignons.
- b) ***Zygomycota*** : Cet embranchement contient des espèces microscopiques à spores non flagellées, possédant une reproduction sexuée. Il y a deux classes : les Trichomycètes et les Zygomycètes avec les Mucorales, saprotrophes auxiliaires de l'industrie (chimique ou pharmaceutique) ou parasites de plantes ou de l'homme (zygomycoses), et avec les Entomophthorales, parasites de plantes et d'animaux parfois utilisés dans la lutte biologique contre des insectes réputés nuisibles (vecteurs de maladies parasitaires).
- c) ***Glomeromycota*** : Espèces peu connues, à spores non flagellées, elles jouent un rôle crucial dans l'écologie. Ces espèces vivent en symbiose avec certaines plantes.
- d) ***Ascomycota*** : Dans l'embranchement des Ascomycota souvent appelé Ascomycètes, on regroupe des champignons très différents d'aspect, mais dont le mode de reproduction présente une homogénéité. Les champignons de ce groupe produisent des ascospores contenues dans un asque. Parmi les Ascomycètes, on trouve de nombreuses espèces utiles à l'Homme comme les levures du genre *Saccharomyces* utilisées dans la panification et dans la technologie de la bière.
- e) ***Basidiomycota*** : Il constitue un groupe plus important que les Ascomycètes pour les espèces à grande taille (Macromycètes). Les Basidiomycota présentent une grande diversité morphologique avec des spores non flagellées, à mycélium cloisonné ; ces champignons produisent des basidiospores portées par des basides (**Courtecuisse, 2011; Blandeau, 2012**).

### 1.1.3 Modes de vie des champignons

Parlant des champignons, on distingue généralement trois modes de vie (**Ngo, 2011**) à savoir ;

- Les champignons saprophytes : Ils se nourrissent spécifiquement de la matière organique morte en décomposant les tissus d'origine afin d'en absorber les nutriments. Ils sont donc considérés à cet effet très utile dans la nature.
- Les champignons parasites : ce mode de vie réunit l'ensemble des champignons qui ne vivent qu'aux dépens d'un autre organisme vivant (plantes, animaux dont l'homme). En attaquant l'homme, ils développent souvent des infections appelées mycoses (**Saintot, 2017**).

- Les champignons symbiotiques : Ils mènent leur vie en relation étroite (en harmonie) avec leurs hôtes. Comme exemple, on peut citer l'association mutualisée entre les racines d'une plante qui est l'hôte et le mycélium du champignon. Dans cette vie commune entre les deux, le champignon a pour mission de mobiliser certains nutriments comme le phosphore au bénéfice de la plante. A son tour, la plante fournit au champignon la quantité de carbone dont il a besoin (Ngo, 2011).

## 1.2 Aspect mycologique du Shiitake

Sur le plan mycologique, il faut rappeler que les champignons sont des organismes hétérotrophes, caractérisés par l'absence du pigment chlorophyllien comme les végétaux (Cassar, 2016 ; Taithe, 2016). De ce fait, ils sont incapables de produire eux-mêmes leurs éléments énergétiques sous forme d'hydrates de carbone. Leur énergie est directement puisée dans les composants d'organismes vivants ou de débris morts, ce qui permet de les décomposer et de les transformer en matière organique assimilable grâce à de nombreux systèmes enzymatiques.

Le Shiitake est un basidiomycète, saprophyte. En participant à la décomposition des organismes morts, il permet leur élimination et le recyclage de la matière organique qu'ils contiennent. En participant au mécanisme d'humification et à la fertilisation des sols indispensable pour les plantes, ils constituent un maillon fondamental de la chaîne alimentaire : ils sont donc indispensables dans l'écosystème végétal (Taithe, 2016).

### 1.2.1 Historique

Le Shiitake nom commun japonais de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, est l'un des champignons comestibles les plus cultivés et les plus consommés au monde (Kitzberber *et al.*, 2007). Le nom Shiitake est dérivé de deux mots : « Shii » désigne l'arbre sur lequel il pousse (*Castanopsis cuspidata*) et « Take » signifie champignon (Taithe, 2016). Le Shiitake est un champignon présentant un pied pelucheux clair et un chapeau brun foncé et a été cultivé comme un champignon comestible depuis des siècles (Traore, 2005).

En l'an 199 avant Jésus-Christ (J.-C.), on notait les premières traces rapportant l'existence du Shiitake. A cette époque, une tribu indigène du Japon appelée (Kjusuyu) offrit à l'empereur Chai un champignon Shiitake. Sa consommation fut également mentionnée dans les pratiques alimentaires du livre « Wang zhen nong shu », en Chine, sous la dynastie des Han (202 av. J.-

C.). Sa culture a commencé et a été améliorée au Moyen âge, dans tout le sud-est asiatique grâce aux Chinois et aux Japonais (**Hobbs, 1995**)

L'histoire et la légende attribuent à Wu San Kwung de la dynastie Song l'origine de la culture du Shiitake. Presque tous les villages producteurs de champignons en Chine ont un temple en son honneur (**Miles et al., 1997**). En 1313, l'auteur chinois Wang Cheng dans son livre sur l'agriculture, mentionnait également les techniques de culture de Shiitake en décrivant comment choisir le site et les outils appropriés pour la culture de ce champignon (**Przbylowicz et al., 1990 ; Laurent, 2004**).

Au cours de la dynastie Ming (1368-1644), Wu Ri (un célèbre médecin chinois) affirma que le Shiitake était un aliment possédant des propriétés bénéfiques sur la longévité, les performances énergétiques et sexuelles. De ce fait, plusieurs empereurs chinois le consommèrent de façon quotidienne pour ralentir le début du vieillissement. Il fut surnommé l'« Elixir de vie » (**Traore, 2005 ; Taithe, 2016**) ou encore « champignon de longévité » (**Pouyat, 2015**).

Les scientifiques découvrent aujourd'hui que les anciens guérisseurs et médecins chinois connaissaient bien les champignons médicinaux et que le Shiitake pourrait contribuer à combattre un ensemble de maladies, notamment les maladies cardiaques, le cancer et les maladies virales mortelles (**Ying et al., 1987 ; Hobbs, 2000**).

### 1.2.2 Description mycologique

Nous allons décrire ici les différentes parties du sporophore du Shiitake (figure 1).



**Figure 1** : Champignon Shiitake, crédit photos : F.FONS (**Diallo et al., 2018**).

#### 1.2.2.1 La chair

*Lentinula edodes* est un champignon parfumé, sa chair est blanche, ferme, caoutchouteuse et épaisse. Elle possède une saveur légèrement acide et dégage une odeur aromatique agréable lors de la cuisson (**Thérouanne-Allard, 2002 ; Laurent, 2004**).

#### 1.2.2.2 Le chapeau

Le chapeau est convexe, il possède une dimension de 5 à 20 cm de diamètre, la cuticule est sèche, brun-fauve couverte d'écailles (squamules) concentriques blanches et devenant fugaces avec l'âge (**Laurent, 2004 ; Pacheco sanchez, 2006 ; Taithe, 2016**). Les lames de couleur blanche, constituent l'hyménophore (partie fertile du sporophore) ; elles sont serrées et leur arrête est légèrement denticulée. Les lames peuvent descendre sur le pied : on dit que les lames sont légèrement décurrentes. Elles se tachent de brun au contact (**Benamar, 2016**). Les lames sont recouvertes d'une surface fertile : l'hyménium constitué par des basides qui sont les cellules productrices des basidiospores.

#### 1.2.2.3 Les basidiospores

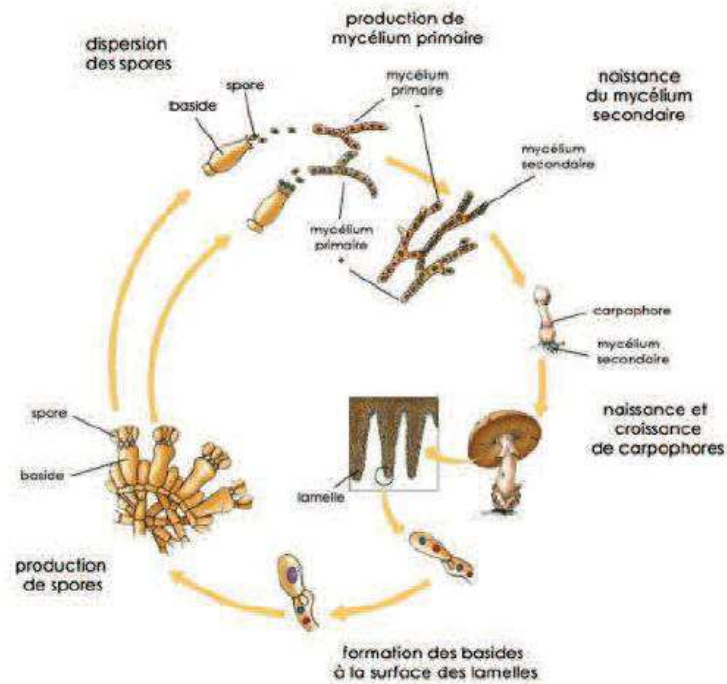
Elles mesurent  $5,8 - 6,4 \times 2,8 - 3,3 \mu\text{m}$ . Elles sont blanches, lisses, subcylindriques et non amyloïdes à parois fines (**Laurent, 2004**).

#### 1.2.2.4 Le pied

De couleur blanchâtre (**Laurent, 2004**), il mesure de 3 à 5 cm de hauteur avec une épaisseur de 8 à 12 mm. Il est solide, cylindrique et très étroit à la base. Généralement le pied comporte un anneau laineux et courbé selon son implantation ; il est considéré comme un peu pelucheux et prend au fur et à mesure de son développement la couleur du chapeau (**Taithe, 2016**).

### 1.2.3 Cycle de reproduction

Chaque baside du Shiitake porte quatre basidiospores, haploïdes qui à maturité seront emportées par le vent ou l'eau (**Bisen et al., 2010**). Sur un substrat adéquat pour leur développement, les spores germent pour donner un mycélium primaire monocaryotique. Deux mycéliums primaires monocaryotiques sexuellement compatibles fusionnent alors pour former un mycélium secondaire dicaryotique : lors de cette fusion entre les deux myceliums, seule a lieu la fusion des cytoplasmes ou plasmogamie. Dans des conditions idéales de température et d'humidité, plusieurs hyphes mycéliens secondaires dicaryotiques vont se regrouper pour former un primordium, qui va donner un sporophore (**Taithe, 2016**). La caryogamie aura lieu dans les basides situées au niveau de l'hyménophore, donnant ainsi naissance aux futures basidiospores haploïdes (Figure 2).



**Figure 2 : Cycle de reproduction du Shiitake (Taithe, 2016)**

#### 1.2.4 Taxonomie (Classification)

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler est un champignon connu sous différentes appellations à travers le monde. Au Japon par exemple, il est appelé Shiitake, ce qui signifie « qui pousse vite sur l'arbre shii » Le shii est un arbre des forêts humides des côtes Sud du Japon et de la Corée du Sud dont aucun spécimen n'est retrouvé en Europe, mais qui est relativement proche du chêne ou du châtaignier (Taithe, 2016). En France, il est connu sous le nom de Lentin du chêne et aux États-Unis, il est utilisé sous l'appellation de champignon noir des forêts. En Chine, plusieurs formes de Shiitake sont connues sous divers noms tels que : le xiang-gu (le champignon odorant), le dong-gu (le champignon d'hiver) et le hua-gu (le champignon ou le champignon panaché) (Chen, 2001). Cette abondance de noms communs locaux différents d'un pays à un autre pour la même espèce illustre l'importance et la nécessité d'avoir un nom universel accessible à tous (Chen, 2001). Certains cultivateurs de champignons l'appelaient aussi pendant plusieurs années *Lentinus edodes* et ont continué à utiliser cette appellation jusqu'en 1980. Mais déjà en 1975, suite à des études microscopiques et morphologiques ainsi que d'autres critères, comme l'analyse de l'ADN, un nom scientifique a été retenu pour ce champignon (Shiitake) qui est : *Lentinula edodes*. C'est un champignon saprophyte appartenant à l'embranchement des Basidiomycota qui constitue un groupe plus nombreux que les Ascomycètes (Chen, 2001 ; Malika, 2016).

Selon (Courtecuisse & Duhem, 2011 ; Cassar, 2016) la taxonomie du Shiitake (Tableau 1) est :

*Tableau 1: Taxonomie du Shiitake*

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Basidiomycota</i>
Classe	Homobasidiomycètes
Sous-classe	<i>Agaricomycetideae</i>
Ordre	Tricholomatales
Famille	<i>Marasmiaceae</i>
Genre	<i>Lentinula</i>
Espèce	<i>edodes</i>

### 1.3 Composition chimique

Les champignons comme le Shiitake possèdent une excellente valeur nutritive, car il est très riche en protéines, avec un contenu important en acides aminés essentiels et des fibres (Chang & Miles, 2004 ; Rathore *et al.*, 2017 ; Diallo *et al.*, 2017c). Les fibres alimentaires présentes dans *L. edodes* (Shiitake) sont constituées de fibres solubles et insolubles. Parmi les fibres solubles, on trouve les  $\beta$ -glucanes et dans les fibres insolubles on peut citer essentiellement la chitine (Regula & Siwulski, 2007 ; Bak *et al.*, 2014). Ces substances (fibres) ont la capacité d'abaisser le taux du cholestérol total dans le sang, ce qui explique en partie leur importance dans le traitement ou la prévention des maladies cardiovasculaires (Rathore *et al.*, 2017). Le Shiitake contient également une teneur non négligeable en vitamines hydrosolubles (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>12</sub>) (Bak *et al.*, 2014 ; Finimundy *et al.*, 2014).

Le Shiitake séché renferme 58 à 60 % de glucides, 20 à 23 % de protéines (digestibilité de 80 à 87 %), 9 à 10 % de fibres, 3 à 4 % de lipides et 4 à 5 % de cendres.

Il est intéressant de noter que les quantités de nutriments et de composés biologiquement actifs diffèrent selon les souches, la provenance, la période de récolte, les facteurs environnementaux, les conditions et les méthodes de culture (Zhang *et al.*, 2013 ; Bakir *et al.*, 2018). Du point de vue énergétique, le shiitake séché en est plus riche (tableau 2), mais dans l'ensemble c'est un champignon qui pauvre est en calories.

**Tableau 2:** Composition nutritionnelle en macronutriments du Shiitake pour 100 g de champignon selon (USDA National Nutrient Database et ANSES)

Nutriments	USDA National Nutrient Database		ANSES : Table Ciqual 2016	
	Shiitake Cru	Shiitake séché	Shiitake Cru	Shiitake séché
<b>Eau</b>	89,74 g	9,50 g	83,5 g	9.50 g
<b>Energie</b>	34 kcal	296 kcal	60,9 kcal	316 kcal
<b>Protéines</b>	2,24 g	9,58 g	1,56 g	9,58 g
<b>Lipides</b>	0,49 g	0,99 g	0,22 g	0,99 g
<b>Carbohydrates</b>	6,79 g	75,37 g	12,30 g	63,90 g
<b>Fibres totales</b>	2,5 g	11,5 g	2,5 g	11,5 g
<b>Sucres totaux</b>	2,38 g	2,21 g	3,84 g	2,21 g

### 1.3.1 Macronutriments

#### 1.3.1.1 Glucides

Chez *Lentinula edodes*, on trouve des glucides assimilables par l'organisme humain et ceux non assimilables. Les glucides assimilables représentent environ 69 % du poids sec du champignon (Taithe, 2016). Parmi eux, le Shiitake contient entre 30 à 60 % d'alditol (polyol non cyclique), 2 à 8 % de tréhalose (diholoside), 1 à 4 % de glucose (hexose), ainsi que des pentoses (xylose et ribose) ou méthyl pentose (rhamnose), d'autres hexoses (fructose, galactose et mannose), des diholosides (saccharose), des sucres aminés (glucosamine et N-acétylglucosamine), d'autres polyols (inositol), des acides uroniques (acide glucuronique et acide galacturonique), etc. (Ales *et al.*, 2013 ; Taithe, 2016).

La chitine fait partie de la famille des glucides non assimilables ; il s'agit d'un polysaccharide azoté (polymère de N-acetylglucosamine) représentant le constituant essentiel de la paroi cellulaire. Elle est très impliquée dans la solidité du champignon et participe à sa protection contre les agressions extérieures (Taithe, 2016).

Notons qu'on peut trouver également d'autre groupe de polysaccharides très bénéfiques pour la santé de l'homme dans la paroi cellulaire des champignons. Ces molécules polysaccharidiques sont appelées des « glucanes » et sont, essentiellement des  $\beta$ -glucanes. Ils sont constitués de molécules de glucoses liées par des liaisons bêta. Ces liaisons peuvent être  $\beta$  (1→3) ou  $\beta$  (1→6)

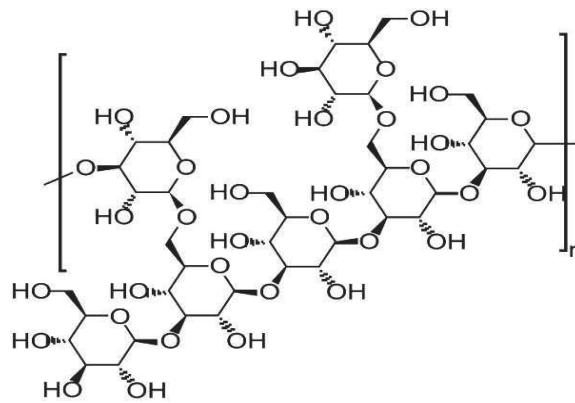


**(Bak et al., 2014).** Ils sont connus pour leur activité anti-tumorale, anti-inflammatoire, antioxydante et antivirale **(Chang & Miles, 2004 ; Rathore et al., 2017).** En plus de leur effet dans le système immunitaire, les  $\beta$ -glucanes peuvent participer aux processus physiologiques liés au métabolisme des graisses dans l'organisme. Leur utilisation entraîne une nette diminution de la teneur en cholestérol dans le sang et contribuerait également à une réduction du poids corporel **(Rop et al., 2009).**

Les  $\beta$ -glucanes sont retrouvés aussi dans la composition de la paroi cellulaire de certaines bactéries, ainsi que dans les céréales comme (avoine, seigle, orge) **(Maheshwari et al., 2017 ; Pengkumsri et al., 2017).** Chez le Shiitake, la teneur en  $\beta$ -glucanes est estimée environ à 22 mg/100g de matière sèche **(Rop et al., 2009)** avec  $20,06 \pm 1,76\%$  à  $44,21 \pm 0,13\%$  dans le sporophore et de  $29,74 \pm 1,40\%$  à  $56,47 \pm 4,72\%$  dans la section du stipe et varie en fonction des parties du champignon et de la souche utilisée **(Bak et al., 2014).** Une récente étude Allemande a montré aussi que la teneur en  $\beta$ -glucanes dans Shiitake se situe dans l'intervalle de 19 à 25 g de matière sèche **(Sari et al., 2017).** Le stipe contient des quantités plus élevées que le chapeau, qui en contient lui-même plus que le mycélium **(Bak et al., 2014 ; Taithe, 2016).**

### **Lentinane**

Le lentinane (figure 3) est un polysaccharide appartenant aux  $\beta$ -glucanes, extrait à partir du carpophore du Shiitake **(Chihara et al., 1970b ; Bisen et al., 2010).** Il possède un poids moléculaire variant généralement entre 600 et 1400 KDa avec des liaisons  $\beta$  (1-3) et  $\beta$  (1-6). C'est un polysaccharide capable de tuer les cellules cancéreuses et ayant des puissantes propriétés immuno-modulatrices **(Chan et al., 2009).** Il est aussi largement impliqué dans la production des médiateurs inflammatoires **(Suzuki et al., 2013 ; Crespo et al., 2017).** Depuis quelques années, le lentinane est souvent utilisé en chimiothérapie dans certains pays notamment le Japon comme coadjuvant dans le cadre du traitement de certains cancers notamment : le cancer du côlon, de l'estomac, du poumon, du sein, ou de la prostate **(White et al., 2002 ; Oba et al., 2009 ; Hazama et al., 2009 ; Suzuki et al., 2013; Del Buono et al., 2016).**



**Figure 3 : Structure chimique du Lentinane (Bisen et al., 2010)**

### 1.3.1.2 Lipides

Pour le Shiitake, les acides gras représentent 3,38 % des lipides totaux (Mizuno, 1995). Leur composition est la suivante : acide myristique (14:0), 0,1 % ; acide tétradénoénique (14:1), 1,6 % ; acide palmitique (16:0), 14,7 à 19,2 % ; acide stéarique (18:0), 0,9 à 2,7 % ; acide oléique (18:1), 3,0 à 8,3 % ; acide linoléique (18:2), 68 à 72,8 % ; (Mizuno, 1996 ; Bisen et al., 2010). Le contenu en acide gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés est de 15,1 %, 8,9 % et 82 % des lipides totaux, respectivement (Reis et al., 2012a).

La fraction lipidique des champignons contient aussi du tocophérol (vitamine E) qui est un antioxydant (Rathore et al., 2017). Elle contient également des stérols et le principal stérol trouvé dans le Shiitake est l'ergostérol, celui-ci est le précurseur de la provitamine D<sub>2</sub> jouant un rôle important dans la régulation de l'absorption du phosphore et du calcium (Ying et al., 1987 ; Pedneault, 2007). Sa teneur est environ 44 à 85 mg/100g de champignon frais (Barreira et al., 2014 ; Phillips et al., 2011). Notons que les stérols sont des molécules dérivées des phytostérols et naturellement présents dans la fraction lipidique des champignons et des plantes. Ils sont très impliqués dans la réduction de l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. L'homme et l'animal n'ont pas le pouvoir de les synthétiser, ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation (Muanda, 2010).

### 1.3.1.3 Protéines

La consommation du lentin du chêne donne un important apport en protéines fongiques car il renferme 17,5 % de son poids sec en protéines (Tableau 3) (Diallo et al., 2017c). Dix-sept (17) acides aminés ont été trouvés dans le Shiitake y compris tous les acides aminés essentiels (Mattila et al., 2002 ; Ales et al., 2009 ; Taithe 2016 ; Li et al., 2017). Il s'agit principalement de : isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, cystéine, tryptophane,

tyrosine, proline, sérine, alanine, acide aspartique, acide glutamique et valine (tableau 3) (Ying *et al.*, 1987 ; Balbi *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2017).

**Tableau 3 : Composition en acides aminés dans le Shiitake (Mattila *et al.*, 2002; Balbi *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2017).**

Acides aminés		Teneurs exprimées en		
		mg/g de poids sec	mg/100g de poids frais	mg/g de protéines brutes
Acides aminés essentiels	Thréonine	ND	98	45
	Valine	22,84	124	95,6
	Isoleucine	5,18	79	70
	Leucine	9,66	133	104
	Phénylalanine	14,78	95	-
	Lysine	35,18	122	91
	Histidine	8,54	56	33
	Arginine	30,49	ND	ND
	Méthionine	0,68	29	31
Cystéine	5,61	24		
Acides aminés non essentiels	Acide aspartique	2,32	190	
	Alanine	38,48	104	ND
	Sérine	17,51	103	ND
	Glutamine	16,42	ND	ND
	Glycine	22,61	ND	ND
	Acide glutamique	ND	355	ND
	Tyrosine	ND	265	-

Les acides aminés les plus abondants sont l'alanine et la lysine qui sont suivis par l'arginine et la tyrosine (Manzi *et al.*, 1999 ; Mattila *et al.*, 2002) Ces molécules ne peuvent pas être synthétisées par l'organisme humain, elles doivent nécessairement être apportées par l'alimentation (Ales *et al.*, 2009 ). On les retrouve dans la viande, les œufs, le lait et certaines

légumineuses. Dans le cadre de la supplémentation, le Shiitake peut être une alternative efficace en apport protéique pour les régimes végétariens (**Mattila et al., 2002 ; Ales et al., 2009**).

Selon la FAO, le besoin de l'organisme en histidine et en isoleucine est de 10 mg/kg/j et 20 mg/kg/j respectivement (**Tomé, 2009**). L'examen du tableau 4 montre que la consommation régulière du Shiitake pourrait couvrir le besoin quotidien de l'organisme en acides aminés compte tenu de leur diversité et de leur quantité dans le champignon.

**Tableau 4 : Besoin de l'organisme en acides aminés**

Acides aminés	Besoin en mg/kg/j	
	FAO	AFSSA
Histidine	10	11
Isoleucine	20	18
Leucine	39	39
Lysine	30	30
Méthionine	10	-
Cystéine	4	-
Phénylalanine + Tyrosine	25	27
Thréonine	15	16
Tryptophane	4	4
Valine	26	18

### 1.3.2 Micronutriments

#### 1.3.2.1 Vitamines

Les champignons comme *Lentinula edodes* sont une bonne source de vitamines, spécialement les vitamines du groupe B : B<sub>1</sub> (thiamine), B<sub>2</sub> (riboflavine), B<sub>3</sub> (niacine), B<sub>5</sub> (acide pantothénique) et la vitamine D (**Ying et al., 1987 ; Bisen et al., 2010 ; Bak et al., 2014 ; Diallo et al., 2017c**). La fraction lipidique des champignons contient aussi du tocophérol (vitamine E) qui est un antioxydant (**Rathore et al., 2017**). La teneur total en tocophérol (y compris  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérol est environ 27,63  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de poids sec (**Heleno et al., 2015**). Par contre **Reis et al. (2012a)** ont trouvé une teneur d'environ 11  $\mu\text{g}/100\text{g}$  du champignon frais en tocophérols

totaux. Plusieurs études ont indiqué que lorsqu'ils sont exposés à la lumière UV dans certaines conditions, certains champignons dont *Lentinula edodes* et *Agaricus bisporus* produisent de la vitamine D<sub>2</sub> en quantités supérieures à celles des besoins quotidiens (Roberts *et al.*, 2008 ; Phillips *et al.*, 2011). Le processus de formation de la vitamine D<sub>2</sub> s'effectue via une réaction photochimique dans laquelle le stérol fongique, l'ergostérol, est converti en vitamine D<sub>2</sub> à travers une série de réactions photochimiques et thermiques catalysées par des ultraviolets (UV) provenant de la lumière du soleil (Simon *et al.*, 2011).

### 1.3.2.2 Sels minéraux

Le Shiitake est riche en potassium, calcium, phosphore et magnésium (tableau 5). Le sodium est relativement moins présent dans les champignons et, par conséquent, ils sont considérés comme une bonne alternative parmi les autres aliments pour les personnes présentant de l'hypertension artérielle (Rathore *et al.*, 2017).

Ces nutriments sans aucune valeur énergétique sont indispensables à l'organisme et actifs à de très faibles doses. Les apports quotidiens recommandés en micronutriments (vitamines et sels minéraux) sont de l'ordre du milligramme ou du centième de milligramme (Taithe, 2016).

**Tableau 5 : Composition nutritionnelle en micronutriments**  
(USDA National Nutrient Database)

Nutriments	Shiitake Cru	Shiitake séché
<b>VITAMINES</b>		
<b>Thiamine</b>	0,015 mg	0,300 mg
<b>Riboflavine</b>	0,217 mg	1,270 mg
<b>Niacine</b>	3,877 mg	14,100 mg
<b>Vitamine B<sub>6</sub></b>	0,293 mg	0,965 mg
<b>Vitamine D (D<sub>1</sub> +D<sub>2</sub>)</b>	0,4 µg	3,9 µg
<b>ELEMENTS MINERAUX</b>		
<b>Calcium</b>	2 mg	11 mg
<b>Fer</b>	0,41 mg	1,72 mg

Nutriment	Shiitake Cru	Shiitake séché
Magnésium	20 mg	132 mg
Phosphore	112 mg	294 mg
Potassium	304 mg	1534 mg
Sodium	9 mg	13 mg
Zinc	1,03 mg	7,66 mg
Sélénium	5.7µg	46.1 µg

### 1.3.3 Les composés organiques volatiles

Les composés organiques volatils (COV) regroupent une large gamme de substances chimiques constitués par des atomes du carbone et ayant pour point commun d’être volatils à température ambiante (Cicolella, 2008). Il est évident que l'arôme de *Lentinula edodes* est l'une des raisons pour lesquelles ce champignon est très prisé en Asie et en Europe (Mata *et al.*, 2014).

Les composés organiques volatils (COV) contenus dans *Lentinula edodes* sont d’une grande diversité et plus de 120 molécules volatiles ont été identifiées dans le Shiitake (Cho *et al.*, 2003 ; Tian *et al.*, 2016). Leur concentration dans le Shiitake frais est de 4308 µg/100g du champignon séché (Politowicz *et al.*, 2018). Les composés majeurs sont : le 1-octène-3-ol, le 3-octanol, 3-octanone, 2 octanone et le 4-octène-3-one. Ils sont suivis par le 1, 2, 4-trithiolane, 1, 2, 4, 5-trithiolane et le disulfure de diméthyle qui sont en faible quantité (Mata *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2019). Toutes ces molécules volatiles du Shiitake peuvent être regroupées dans les familles chimiques suivantes: composés soufrés, alcools, hydrocarbures, acides, esters, aldéhydes, composés azotés et cétones. (Cho *et al.*, 2003 ; Mata *et al.*, 2014 ; Politowicz *et al.*, 2018 ; Tian *et al.*, 2016 ; Costa *et al.*, 2019). La composition chimique des matières volatiles dépend en générale de l’origine et des conditions climatiques (Politowicz *et al.*, 2018). Lorsque le Shiitake est séché, il dégage souvent une odeur spécifique qui est absente dans le Shiitake frais, ce qui donne à ce champignon une empreinte particulière par rapport aux autres champignons. Des études ont prouvées que le 1, 2, 4, 5, 6-pentathiépane, appelé aussi lenthionine, est responsable de ce parfum spécifique (Hiraide, 2006 ; Dermiki *et al.*, 2013 ; Politowicz *et al.*, 2018).

La chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (GC / MS) et la chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) sont largement utilisées dans l'identification des composants volatils des champignons. La technique de la GC-MS est une technique rapide utilisant un nombre réduit d'échantillons. Elle offre une haute sensibilité et peut mettre en évidence les composés aromatiques spécifiques de *Lentinula edoes* (Costa *et al.*, 2019).

#### 1.3.4 Les acides organiques

Le Shiitake renferme des acides organiques qui participent fortement à ses propriétés sensorielles olfactives et gustatives. Ce sont entre autre : l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide fumarique, l'acide quinique, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide succinique et l'acide glycolique (Yoshida *et al.*, 1987 ; Rahman et Choudhury, 2012 ; Heleno *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2017). La formation de ces molécules est liée à la synthèse et au métabolisme des acides aminés, des esters, des composés aromatiques et des phénols. Le composé majeur est l'acide tartrique (68,3 mg / g de poids sec). Il est suivi par l'acide citrique (31,04 mg / g de poids sec), acide acétique (8,33 mg / g de poids sec) (Li *et al.*, 2017).

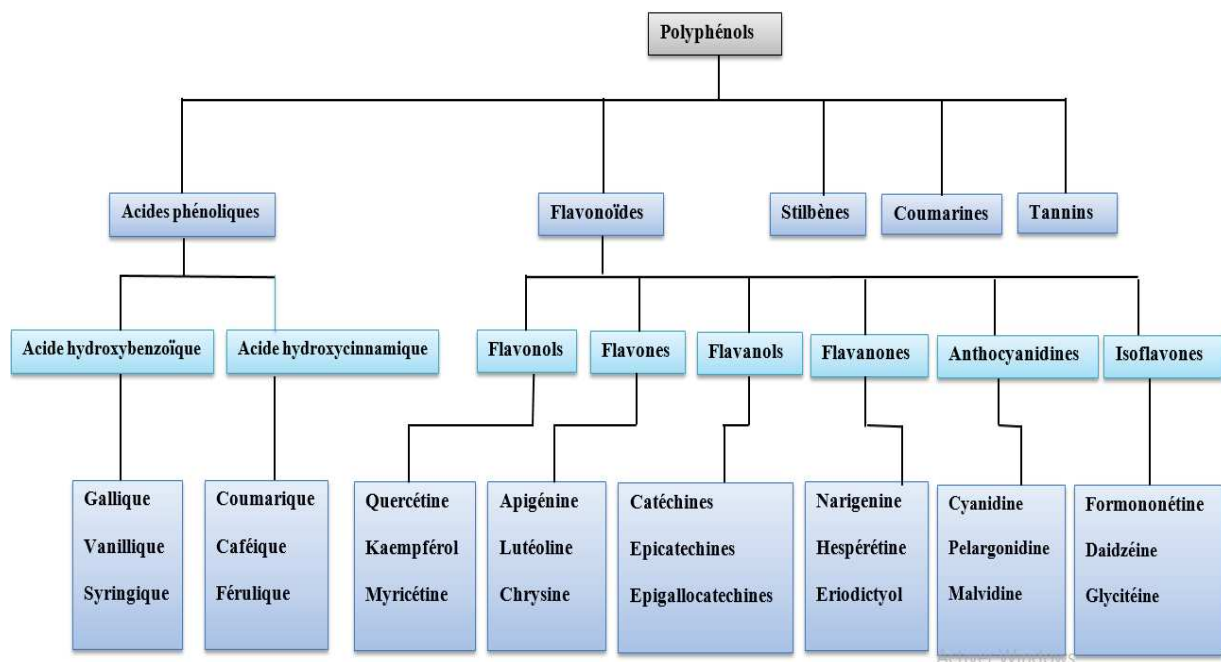
#### 1.3.5 Les polyphénols

Les polyphénols (figure 4) sont des molécules produites par le métabolisme secondaire des végétaux et des champignons (Manallah, 2012). Ils possèdent au moins deux groupements phénoliques, avec parfois la présence d'autres fonctions (alcoolique, carboxylique...) (Muanda, 2010). A ce jour, environ 9 000 structures connues se regroupent dans cette famille de molécules, allant des substances phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques (Manallah, 2012) à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh *et al.*, 2004). Ils sont assez présents dans l'alimentation humaine et animale (Martin & Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols sont des véritables molécules antioxydantes et sont très abondants dans certains aliments (Kozarski *et al.*, 2015b), notamment le thé (Hashimoto *et al.*, 2003 ; Khan & Mukhtar, 2007), l'huile d'olive (Meroune *et al.*, 2014 ; Benlemlih & Ghanam, 2016), les champignons, les fruits et légumes. Depuis des années, plusieurs chercheurs ont concentré l'essentiel de leurs efforts sur l'impact de la consommation des polyphénols dans la santé de l'homme (Scalbert *et al.*, 2005a). La diversité des composés identifiés et le large spectre de leurs activités biologiques constituent la principale difficulté d'élucidation des effets santé des polyphénols (Kuntz *et al.*, 1999 ; Kozarski *et al.*, 2015b).

Au-delà du rôle fondamental que jouent les polyphénols dans la santé de l'homme, ces molécules sont également impliquées dans l'amélioration de la qualité sensorielle, organoleptique et nutritionnelle des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons notamment le café, le cacao ou le thé (**Kozarski et al., 2015b**). On estime que l'homme consomme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (**Scalbert et al., 2005b**). L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif (**Kozarski et al., 2015b**), telles que le cancer (**Chen & Dou, 2008**), les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Rahman et al., 2006 ; Rossi et al., 2008 ; Perez-Vizcaino & Duarte, 2010**).

Ces composés peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques et les éléments structurels qui lient ces anneaux les uns aux autres. Ainsi, on distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes.



**Figure 4 : Classification des polyphénols (Kumar et al., 2019)**

Les principaux composés phénoliques présents dans les champignons sont pour la plupart des acides phénoliques et des flavonoïdes (**Ferreira et al., 2009**). Cependant, il est possible de trouver aussi des tanins et des lignanes (**Pavithra et al., 2016 ; Yilmaz et al., 2016**).



### 1.3.5.1 Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques (figure 5) peuvent être divisés en deux groupes principaux, les acides hydroxybenzoïques (acide gallique, acide salicylique, acide vanillique et l'acide protocatéchique) et les acides hydroxycinnamiques (acide coumarique, acide cinnamique, acide caféique, acide férulique) (Kozarski *et al.*, 2015b) dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Manach *et al.*, 2004 ; Choi *et al.*, 2012). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque se rencontrent généralement sous la forme liée et sont typiquement un composant des lignines et les tanins hydrolysables. Ils peuvent également être trouvés liés à des sucres ou à des acides organiques (Kozarski *et al.*, 2015b). Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique sont principalement présents sous la forme liée. Généralement ils sont liés aux composants structurels de la paroi cellulaire, tels que la cellulose, la lignine et les protéines, ainsi que les acides organiques (Kozarski *et al.*, 2015b). La composition du contenu phénolique des champignons dépend généralement de facteurs génétiques, environnementaux, du substrat de culture utilisé, de la méthode de traitement de l'échantion et de la méthode d'extraction (Yildiz *et al.*, 2015 ; Ezzudin *et al.*, 2018).

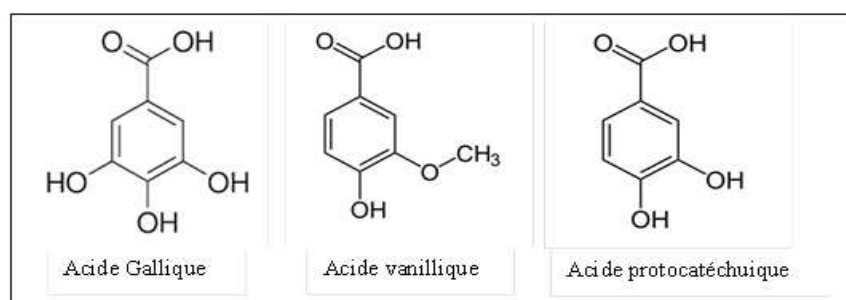


Figure 5 : Quelques molécules phénoliques (El Rayess *et al.*, 2014)

Peu d'auteurs ont cherchés à déterminer le profil phénolique du Shiitake. Le tableau N°6 montre les acides phénoliques identifiés dans le champignon Shiitake.

Selon la littérature, les acides phénoliques trouvés dans ce champignon sont : l'acide cinnamique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide coumarique, l'acide vanillique, l'acide caféique et l'acide abscissique (Mattila *et al.*, 2001 ; Reis *et al.*, 2012 ; Yildiz *et al.*, 2015 ; Heleno *et al.*, 2015). Seul Yildiz *et al.*, (2015) ont pu mettre en évidence presque tous les composés cités ci haut, sauf l'acide protocatéchique et l'acide caféique. En terme de quantité, l'étude de (Mattila *et al.*, (2001) montre des teneurs en acide hydroxy benzoïque (790 µg/100g de poids sec), cinnamique (160 µg/100g de poids sec) et protocatéchique (139 µg/100g de poids sec) plus élevées que celles

trouvées par les autres. Les extraits les plus utilisés dans la mise en évidence des composés phénoliques sont les extraits alcooliques, aqueux et hydro-alcooliques car ces molécules y sont très solubles (**Reis *et al.*, 2013 ; Carnero *et al.*, 2013 ; Heleno *et al.*, 2015 ; Yildiz *et al.*, 2015**).

**Tableau 6 : Acides phénoliques identifiés dans le Shiitake**

Composés phénoliques	Teneur exprimée en µg/100g de poids sec							
	Matilla <i>et al., 2001</i>	Kim <i>et al., 2008</i>	Reis <i>et al., 2012</i>	Heleno <i>et al., 2015</i>	Yildiz <i>et al., 2015</i>	Carneiro <i>et al., 2013</i>	Islam <i>et al., 2016</i>	Woldegiorgis <i>et al., 2014</i>
Acide cinnamique	160	ND	2	70	17,8	200	na	na
Acide p-hydroxybenzoïque	790	ND	157	190	243,9	420	533	158
Acide protocatéchique	139	1600	36	140	ND	na	na	na
Acide gallique	ND	1300	ND	na	1,24	na	22037	6120
Acide syringique	ND	ND	na	na	97,3	na	ND	na
Acide p-coumarique	ND	ND	ND	ND	5,4	ND	ND	ND
Acide vanillique	ND	ND	na	na	209	80	ND	na
Acide caféique	< 50	ND	na	na	ND	na	ND	79
Acide abscissique	ND	ND	ND	na	0,43	na	na	na
Acide férulique	ND	ND	na	na	ND	na	na	89
Acide chlorogénique	ND	ND	na	na	ND	na	na	ND
Acide ascorbique	na	ND	na	na	ND	na	na	na
Acide gentisique	ND	ND	na	na	na	na	ND	na
Acide benzoïque	na	ND	na	na	ND	na	na	na
acide sinapique	ND	ND	na	na	na	na	na	na
Acide vétratrique	na	ND	na	na	na	na	na	na
5 Acide Sulfosalicylique	na	ND	na	na	na	na	na	na
<b>Méthode de dosage</b>	<b>GC-MS</b>	<b>Chromatographie en phase liquide avec un détecteur UV photodiode</b>						

ND = Non détecté, na = non analysé, GC-MS = chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

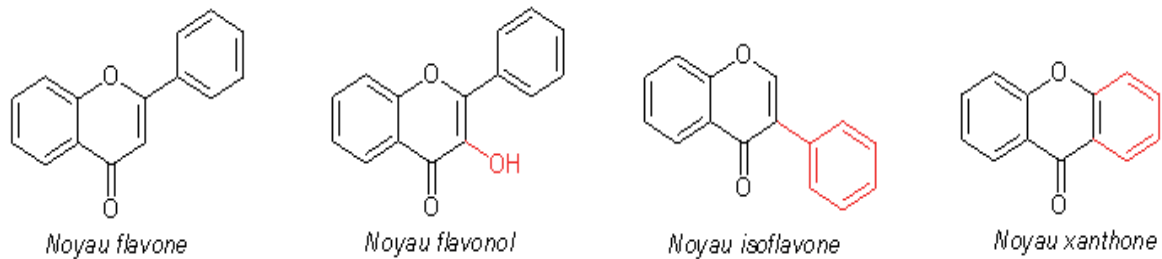
On observe dans ce tableau une variabilité des molécules et de leurs teneurs trouvées en fonction des équipes de recherches.

### 1.3.5.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (Figure 6) sont des molécules phénoliques et représentant une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (**Muanda, 2010**). Ils sont responsables de la coloration des fruits, des fleurs et des feuilles. Ils sont dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Muanda, 2010**). On dénombre actuellement près de 6500 flavonoïdes et compte tenu des découvertes, leur nombre ne cesse de s'accroître encore (**Stöckigt et al., 2002**). La structure de base des flavonoïdes est un noyau de 15 atomes de carbone formé par deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné C, hexa- ou pentagonal (**De Rijke et al., 2006 ; Muanda, 2010**). Les six sous-classes communes de flavonoïdes sont les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanidines et les flavanols (**Manach et al., 2004 ; Farkas et al., 2004 ; Perez-Vizcaino & Duarte, 2010**).

De façon générale, on estime que seules les plantes possèdent la capacité de synthétiser ou de produire des flavonoïdes, alors que les animaux et les champignons n'en contiennent pas (**Ferreira et al., 2009**). Cependant, selon une étude Coréenne de 2008 et une autre réalisée en 2015 à l'université de Belgrade (Serbie) montrent la présence effective de certains flavonoïdes comme : la catéchine, la chrysin, l'hespéridine, la myricétine, et la naringénine dans plusieurs champignons (**Kim et al., 2008 ; Kozarski et al., 2015a**). La même année aussi, l'analyse de l'extrait méthanolique de *Cantharellus cibarius* a montré que les acides phénoliques étaient ses principaux composants antioxydants mais ils étaient suivis par les flavonoïdes (**Kozarski et al., 2015a**).

Pour le Shiitake, les recherches menées ont montré la présence d'une teneur non négligeable en flavonoïdes. Parmi les flavonoïdes identifiés, on peut citer la rutine et les catéchines (**Kim et al., 2008 ; Yildiz et al., 2015**). D'autres auteurs (**Mujić et al., 2010 ; Khaund et al., 2015**) ont trouvé respectivement 1,98 mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait sec de champignon et 0,91 mg par gramme d'équivalent quercétine dans le *Lentinula edodes*. Ces flavonoïdes jouent un rôle très important dans l'organisme. Ils sont des véritables molécules antioxydantes capables de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Perez-Viscaino et al., 2010**). Ils participent également à la prévention des maladies cardiovasculaires. Selon **Scalbert et al. (2005a)**, les flavonoïdes agissent aussi dans l'organisme en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères.



**Figure 6 : Structure chimique des flavonoïdes**

### 1.3.5.3 Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques d'origine végétale, largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes, ...) (**Hemingway, 1989 ; Muanda, 2010**). Ils ont la propriété de se lier à des macromolécules, notamment des protéines. En contact avec la salive, les tannins provoquent une sensation désagréable pour la bouche en développant un goût âpre et dissuasif (le goût astringent). Ce qui fait qu'ils sont considérés comme un moyen de défense vis-à-vis des prédateurs (**Foley et al., 1999**).

Ils sont divisés essentiellement en deux groupes, qui sont : les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (polymères de flavan-3-ols) et les tanins hydrolysables (esters des acides galliques et ellagique) (**Hemingway, 1989 ; Zucker, 1983**).

#### a) Les tannins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines, sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes par chauffage en milieu acide (**Heller & Forkmann, 1994**). En se fixant aux parois végétales, les tannins condensés jouent le rôle de défense au niveau des membranes cellulaires contre les attaques des pathogènes et empêchent ou retardent la décomposition des tissus (**Zucker, 1983**). Parmi eux, on peut citer les catéchines (dihydroxylées) et les gallocatéchines (trihydroxylées).

#### b) Les tannins hydrolysables

Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase) en oses (généralement le glucose) et en acides phénols (**Muanda, 2010**). Selon la nature de l'acide phénol on distingue : les gallotannins, pour lesquels l'unité de sucre centrale est estérifiée avec plusieurs acides galliques, et les ellagitannins, pour lesquels l'unité de base est de l'acide ellagique (**Lee et al., 2012 ; Azofeifa, 2013**).

## 1.4 Culture du Shiitake

### 1.4.1 Exigences nutritionnelles et facteurs environnementaux pour sa culture

Les besoins nutritionnels (source de carbone, source d'azote, minéraux, vitamines et oligo-éléments) et environnementaux (température, humidité, oxygène-air, lumière et pH du substrat) sont des facteurs déterminants dans la culture du Shiitake (**Ting et al., 1994**).

#### 1.4.1.1 Besoins nutritionnels

##### a. Source de carbone

On sait que les champignons saprophytes comme *Lentinula edodes* obtiennent leur énergie et leurs nutriments à partir de la décomposition des substances insolubles présentes dans le bois sous forme de sucres simples après action des enzymes (**McCoy & Bruhn 2005**). Les sources de carbone telles que la lignine, le glucose et le fructose sont essentielles pour l'approvisionnement en énergie du Shiitake (**Chen et al., 2005 ; Aji, 2009**). Le carbone est l'élément nutritif le plus important pour le Shiitake, car il est un élément constitutif pour les protéines, les acides nucléiques et les sucres dans les cellules vivantes. Il provient généralement des composés organiques tels que les sucres, les acides organiques, les alcools, l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (**Chen et al., 2005**).

##### b. Source d'azote

L'azote est un élément indispensable pour la synthèse des protéines et d'autres composés essentiels et les éléments structuraux cellulaires dans le champignon. Ses principales sources sont les composés azotés organiques et inorganiques, y compris l'urée et les protéines (**Aji, 2009**). L'écorce des arbres contient de 3,8 à 5 % d'azote, tandis que le xylème n'en contient que 0,4 à 0,5 %.

Les substrats ayant un rapport carbone / azote de 25:1 sont considérés meilleurs pour la croissance mycélienne (phase végétative) alors que les milieux avec un C / N de 40:1 sont les plus bénéfiques pour la phase de production de sporophores. Trop d'azote peut permettre au mycélium du Shiitake de croître de façon rapide, mais il ne permet pas de produire de champignons de qualité (**Chen et al., 2005**). La concentration d'azote donc la plus appropriée est de 0,016 à 0,064 % et 0,02 % respectivement pour la phase végétative et celle reproductive. L'optimum de la concentration en azote ne doit pas dépasser 0,03-0,064 %.

### *c. Minéraux et oligo-éléments*

Les éléments minéraux jouent un rôle important pour le champignon car ils participent à la construction des composants cellulaires. Il s'agit du phosphore, du soufre, du calcium et du magnésium. Le phosphore et le potassium sont utiles non seulement pour la croissance mycélienne, mais favorisent également une bonne fructification (**Chen *et al.*, 2005**). Beaucoup de minéraux comme le magnésium ont pour rôle d'activer certaines enzymes spécialisées à la décomposition des substances ligno-cellulosiques (**Chang & Miles, 2004**). On note aussi les composés inorganiques, tels que le dihydrogène phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) le gypse, le phosphate de magnésium, qui sont généralement utilisés lors de la fabrication de substrats dans l'objectif de stabiliser le pH (**Chen *et al.*, 2005**).

### *d. Vitamine B<sub>1</sub>*

Généralement la croissance optimale du champignon et sa fructification demandent nécessairement un apport en vitamine comme la thiamine (B<sub>1</sub>). Cette vitamine, considérée comme une coenzyme de la carboxylase, est connue pour son rôle dans la régulation du métabolisme des glucides par la conversion de l'acide pyruvique en acétaldéhyde et en dioxyde de carbone (**Chang & Miles, 2004**). La vitamine B<sub>1</sub> est sensible à la chaleur ; elle se décompose à des hautes températures. Donc, le chauffage prolongé à des températures très élevées est à éviter pendant la stérilisation du substrat (**Chen *et al.*, 2005**).

#### *1.4.1.2 Facteurs environnementaux*

La croissance mycélienne du Shiitake et le développement du sporophore sont nettement influencés par certains facteurs environnementaux comme : la température, l'humidité, l'air, la lumière et le pH (**Aji, 2009**).

##### *a) Température*

La température joue un rôle primordial dans l'initiation, le développement des fructifications et le rendement. Pour induire la fructification des champignons il est souvent nécessaire de provoquer un changement brusque de température (**Taithe, 2016**).

Lorsque les températures sont trop élevées, les enzymes sont inactivées. Conséquence, le métabolisme (donc la croissance) est ralenti (**Chang & Miles, 2004**). Aussi, lorsque les températures sont trop basses, l'absorption des nutriments devient difficile et la croissance mycélienne diminue (**Chen *et al.*, 2005**). La température optimale pour la croissance du mycélium du Shiitake est de 24-27°C. Cependant d'autres espèces peuvent être adaptées pour croître dans une large gamme de températures de 5 à 32°C (**Aji, 2009**).

### *b) L'humidité*

Il est important de fournir et de maintenir l'humidité optimale dans le substrat pour la culture de Shiitake. L'eau est importante et nécessaire pour la croissance et le développement du Shiitake, car elle permet de dissoudre les nutriments avant qu'ils ne soient absorbés par le mycélium (**Chen et al., 2005**). Lorsque l'humidité est inférieure à 50% le sporophore se développe difficilement, par contre, lorsqu'elle est supérieure à 70% le sporophore risque de pourrir avant la récolte (**Chen et al., 2005**) L'humidité doit être comprise entre 80 à 90% (**Hall et al., 2003**).

### *c) L'air*

L'air est un des facteurs les plus importants dans la culture du Shiitake car c'est un champignon aérobic. Au cours de son développement, les composés organiques sont oxydés, l'énergie ainsi libérée est stockée dans l'ATP pour être utilisée pour la croissance mycélienne et la fructification. Les différentes étapes de la production de Shiitake nécessitent différentes quantités d'oxygène. La phase de reproduction nécessite plus d'oxygène que celle de la croissance mycélienne. Pendant la formation des fructifications, les besoins en oxygène sont plus élevés et les concentrations de dioxyde de carbone libérées sont également plus élevées. Un champignon peut libérer environ 0,06 g de CO<sub>2</sub> par heure (**Chen et al., 2005**).

### *d) La lumière*

La lumière est nécessaire pour la formation des basidiospores ainsi que pour la formation et le développement du sporophore (**Leatham et Stahmann, 1987 ; Aji, 2009**). Pendant la phase de fructification, le niveau optimal de la lumière est de 50-100 lux (**Chen, 2001 ; Chen et al., 2005**). Cependant, le mycélium peut pousser et croître dans l'obscurité ou avec une lumière faible mieux que sous une forte lumière directe qui inhibe la croissance mycélienne. Une exposition prolongée à la lumière très intense peut réduire le nombre de sporophores, tandis qu'un manque de lumière diminue le diamètre et la longueur des stipes (**Aji, 2009**).

### *e) Le pH*

Pour la culture du Shiitake, il a besoin d'un milieu acide. La meilleure plage de pH pour la formation des sporophores est de 3,5 - 4,5. Au cours du développement du mycélium, des acides organiques se forment, ce qui entraîne une diminution du pH du substrat. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sont habituellement ajoutés au substrat pour tamponner et stabiliser le pH. Le bois et la paille utilisés pour la culture du Shiitake sont connus pour avoir généralement un pH approprié et



n'ont pas besoin d'être ajustés. Par contre une attention particulière doit être accordée lorsque l'eau disponible est de nature alcaline (**Chen et al., 2005**).

## 1.4.2 Les types de cultures

### 1.4.2.1 Culture traditionnelle (sur billots)

Le Shiitake (*Lentinula edodes*) est un champignon comestible qui a été cultivé pendant des siècles en Chine, en Corée, au Japon, à Singapour, en Thaïlande et dans d'autres pays asiatiques en raison de ses propriétés nutritionnelles et pharmacologiques (**Diallo et al., 2017b**). Il pousse à l'état sauvage sur les troncs d'arbres feuillus en décomposition (**Aji, 2009 ; Singh et al., 2008**). Actuellement il est cultivé dans de nombreux pays notamment : le Brésil, le Canada, les Etats Unis, la France, les Pays Bas (**Chen, 2001 ; Aji, 2009 ; Pouyat, 2015**). Il est sans doute le champignon le plus cultivé et le plus commercialisé après le champignon de Paris et le *Pleurotus spp.*

La culture sur billot est une méthode ancienne qui s'est inspirée du développement naturel du champignon, pratiquée en Asie il y a environ 2000 ans (**Taithe, 2016**). Elle a eu un essor important vers le XIème siècle au Japon et a conduit à une augmentation de la consommation du Shiitake par la population (**Chen et al., 2005**). La méthode traditionnelle de culture Shiitake permet d'obtenir des champignons de meilleure qualité surtout du point de vue concentration en lentinane et en polysaccharides. Elle permet au champignon de développer des propriétés sensorielles olfactives et gustatives spécifiques (**Tabata et al., 2006 ; Pouyat, 2015**). Les étapes de productions sont :

#### a) Choix du substrat

Le développement du mycélium et du sporophore sont clairement influencés par l'espèce d'arbre utilisée, la taille de l'arbre, et la méthode d'inoculation. Le bois notamment le chêne (*Quercus*) est la principale ressource nécessaire à la culture traditionnelle du Shiitake (**Chen, 2001 ; Hall et al., 2003 ; Pouyat, 2015**). Chaque espèce d'arbre a des caractéristiques particulières qui peuvent influencer la croissance du mycélium, le développement et le rendement du champignon sous forme de sporophores (**Aji, 2009**). Il est donc important de choisir une essence d'arbre appropriée à la culture. Bien que le Shiitake ne soit pas originaire d'Europe, il possède la capacité de se développer sur un large spectre d'espèces d'arbres européennes et américaines parmi lesquelles on peut citer : hêtre, peuplier, aulne, bouleau, chêne, Charme saule érable, frêne, orme, châtaigner etc (**Hall et al., 2003 ; Pouyat, 2015 ; Taithe, 2016**) qui peuvent tous faire l'objet d'un bon support pour sa culture. De façon générale, les arbres feuillus sont mieux

adaptés que les résineux qui peuvent posséder des substances inhibitrices de croissance dans leur résine. Les arbres sélectionnés doivent être sains, ne possédant pas de champignons parasites et devront être coupés en tronçons d'une longueur d'un mètre environ pour 10 à 20 cm de diamètre (**Singh *et al.*, 2008 ; Aji, 2009**).

#### **b) Inoculation**

Après la coupe et la perforation des buches de bois, débute alors l'ensemencement des souches de bois ou des billots de bois par le mycélium du champignon. Cette opération doit se réaliser environ deux mois après la coupe et avant la saison de fructification de champignons indésirables (**Taithe, 2016**). Chaque orifice (perforation) doit être obturé à l'aide d'un bouchon de bois ou de la cire pour éviter l'évaporation et l'attaque des insectes (**Théroutte –Allard, 2002**).

#### **c) Incubation**

Les buches inoculées sont empilées de façon spécifique et placées dans un endroit idéal pendant 6 à 18 mois de façon à favoriser la croissance mycélienne (**Pouyat, 2015**). Le site choisi pour l'incubation doit être bien aéré et bien ventilé avec un taux d'humidité minimal de 25 % et une température de 24-28 °C. Cependant, un taux d'humidité trop élevé est également néfaste car il favorise le développement d'autres espèces fongiques, capable de contaminer la culture. Inversement, un taux d'humidité trop bas conduit à la mort du mycélium. Seule la phase de fructification du Shiitake nécessite un environnement humide important (**Taithe, 2016**).

#### **d) La fructification**

Après un envahissement convenable du mycélium (80%) et l'apparition des premiers primordia, la fructification du Shiitake débute vraiment. Pour cela, les buches initialement entassées sont entrecroisées (c'est-à-dire disposées en X). Rappelons que l'enclenchement de la fructification nécessite aussi des stress d'origine mécanique et thermique (variations importantes de températures) (**Taithe, 2016**). Après la récolte, il est possible d'avoir un rendement maximum d'environ 2 kg de shiitake à partir d'une bûche avec un poids frais initial d'environ 11 kg (**Hall *et al.*, 2003**).

#### **1.4.2.2 Culture sur substrats artificiels**

La culture sur substrats artificiels est une technique qui consiste à produire le Shiitake en utilisant la sciure de bois, de paille et de différents additifs d'origine agricole (céréales, farines, amidon, son de riz, son de blé, la bagasse de canne etc.) (**Chen, 2001 ; Da eira *et al.*, 2005 ;**

**Singh et al., 2008 ; Gaitán-Hernández et al., 2017).** D'autres suppléments peuvent être utilisés en moindre quantité tels que le carbonate de calcium, le gypse ou le sucre de table. Ces additifs fournissent des nutriments et créent un milieu de croissance optimal (**Chen, 2001 ; Gupta et al., 2015 ; Cisáriková, 2016**). Il est aussi possible d'utiliser d'autres substrats comme les coques de coton mélangées avec une suspension de 2% d'hydroxyde de calcium, 2% de sulfate de calcium et 2 à 5% de phosphate naturel broyé dans l'eau. Le mélange est ensuite recouvert de polyéthylène transparent et laissé au soleil environ cinq jours pour être séché (**Hall et al., 2003**). La composition du substrat est connue pour son influence sur la composition nutritionnelle du champignon (**Gaitán-Hernández et al., 2017**). Cette méthode fut développée en 1983 en Chine (**Chen et al., 2005**) puis progressivement améliorée, afin de produire le Shiitake à plus grande échelle ; elle a été introduite en France quelques années plus tard (**Taithe, 2016**). Cette technique culturale présente deux (2) avantages majeurs par rapport à la méthode traditionnelle à savoir : le temps et le rendement en sporophores (**Ramírez-Carrillo & Leal-Lara, 2002**)

Lorsque les conditions sont réunies : température, hygrométrie et présence d'azote dans les substrats, il est possible de produire le Shiitake en grande quantité et toute l'année (**Chen, 2001**). Comme elle est soumise à d'éventuelles sources de contaminations, cette production nécessite le suivi strict d'un certain nombre de règles (**Taithe, 2016**). L'environnement de la culture est à maîtriser pour éviter le développement de maladies (**Cassar, 2016**). Les étapes les plus importantes sont :

- **La pasteurisation du substrat:** Elle se fait à 65 °C pendant 24 heures ce qui permet d'éviter que des moisissures ou des microorganismes pathogènes se développent à la surface du substrat (**Taithe, 2016**). Pour certains auteurs, la stérilisation peut se faire à 121°C pendant 2 heures (**Cisáriková, 2016**).
- **L'inoculation et le développement :** Après pasteurisation, le substrat est ensuite rempli dans des sacs en polypropylène micro perforés permettant la respiration puis on procède à l'ensemencement (**Cisáriková, 2016**). Avec une température régulée entre 20 et 30 °C en fonction de la souche de champignon utilisée (**Cassar, 2016**), suivie d'un éclairage approprié, le mycélium colonisera le substrat ou le compost en se nourrissant des différents nutriments proposés (**Taithe, 2016**).
- **Fructification :** A l'image de la culture ancestrale la fructification nécessite des stress d'origine mécanique et thermique lorsque le mycélium s'est correctement développé (**Taithe, 2016**).

## 1.5 Conservation

Pour pouvoir conserver plus longtemps le Shiitake et bénéficier de sa saveur tout au long de l'année, plusieurs méthodes de conservation sont utilisées : le séchage, la congélation, la conservation par le vinaigre ou par l'huile.

### 1.5.1 Séchage

Il permet de diminuer la teneur en eau dans le champignon et s'effectue dans un endroit sec et bien aéré. Les chapeaux sont disposés les uns à côté des autres sur une plaque en inox sans trop de contact entre eux. L'opération peut durer quelques jours. Après cette étape, le produit séché est mis dans des bocaux en verre hermétiques, et conservé dans un endroit sec en évitant l'humidité qui est source de développement de moisissures.

La lyophilisation peut être aussi utilisée du point de vue industriel. Elle consiste à congeler d'abord le champignon dans une chambre froide puis procéder à la déshydratation par sublimation **(Taithe, 2016)**.

### 1.5.2 Congélation

Le lentin du chêne peut être congelé cuit ou cru. Mais si c'est le Shiitake cuit, il doit être préalablement cuit quelques minutes dans de l'huile **(Taithe, 2016)**.

A grande échelle, le champignon doit être brusquement mis à -40°C et maintenus, tout au long de la conservation, dans une chaîne de froid à -18°C.

### 1.5.3 Dans le vinaigre

Avant tout, les champignons doivent être ébouillantés quelques minutes dans de l'eau vinaigrée, puis égouttés et placés dans un récipient hermétique en verre stérilisé. Pour éviter l'apparition des bulles d'air, il est nécessaire de compléter le contenant par du vinaigre, avant la fermeture **(Taithe, 2016)**.

### 1.5.4 Dans l'huile

Cette technique est identique à la conservation du Shiitake dans le vinaigre. Seulement, dès après l'égouttage, le contenant est rempli par des huiles comme d'huile d'olive, de tournesol ou bien de colza **(Taithe, 2016)**.

## 2 Chapitre II : Propriétés biologiques

### 2.1 Activité antioxydante

Le Shiitake est un champignon cultivé et utilisé dans le monde depuis des millénaires, non pas uniquement pour ses qualités culinaires mais également pour ses vertus médicinales et thérapeutiques (Greeshma *et al.*, 2016 ; Grotto *et al.*, 2016 ; Kupcová *et al.*, 2018) qui reposent sur de nombreuses substances actives comme, l'ergostérol, l'éritadénine, le lentinane et l'ergothioneine (Enman *et al.*, 2007 ; Alemu, 2014). En raison de ces molécules, les scientifiques attribuent au Shiitake d'innombrables propriétés bénéfiques contre les grandes pathologies actuelles.

Parmi ses propriétés biologiques les plus connues (Figure 7), on peut citer : les propriétés hypocholestérolémiantes, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antimicrobiennes, antioxydantes, et antitumorales (Chihara *et al.*, 1970a ; Gao *et al.*, 2005 ; Borchers *et al.*, 1999 ; Wasser & Weis, 1999 ; Wasser, 2002 ; Grotto *et al.*, 2016 ; Diallo *et al.*, 2017a ; Diallo *et al.*, 2017c).

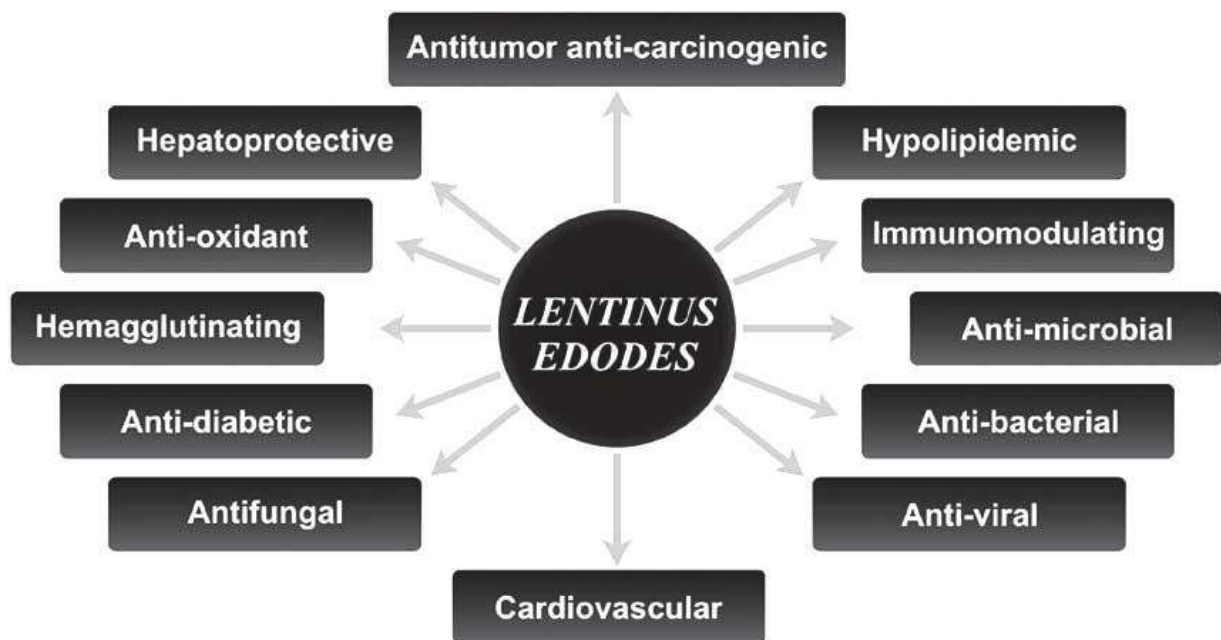


Figure 7 : Les activités biologiques connues du shiitake (Bisen *et al.*, 2010)

#### 2.1.1 Bref rappel du stress oxydant

##### 2.1.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs origines

Lors des processus physiologiques, l'organisme produit en permanence des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont capables de jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire

(Migdal et Serres, 2001 ; Morel *et al.*, 2018) et le système immunitaire (Rathore *et al.*, 2017). Ces ERO sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) (Haleng *et al.*, 2007), et le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ), soit des molécules à savoir : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Bakasso, 2009 ; Ighodaro et Akinloye, 2018 ; Islam *et al.*, 2019).

Elles sont issues des différents mécanismes physiologiques tels que la chaîne respiratoire mitochondriale et l'intervention du complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires (Migdal et Serres, 2001 ; Forrester *et al.*, 2018). La production des espèces radicalaires peut provenir également de notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, mauvaises habitudes alimentaires, exercice physique inexistant), des irradiations ou de la pollution (figure 8) (Migdal et Serres, 2001 ; Islam *et al.*, 2019). A long terme, ces ERO vont surpasser les défenses antioxydantes de l'organisme et conduire au stress oxydatif.

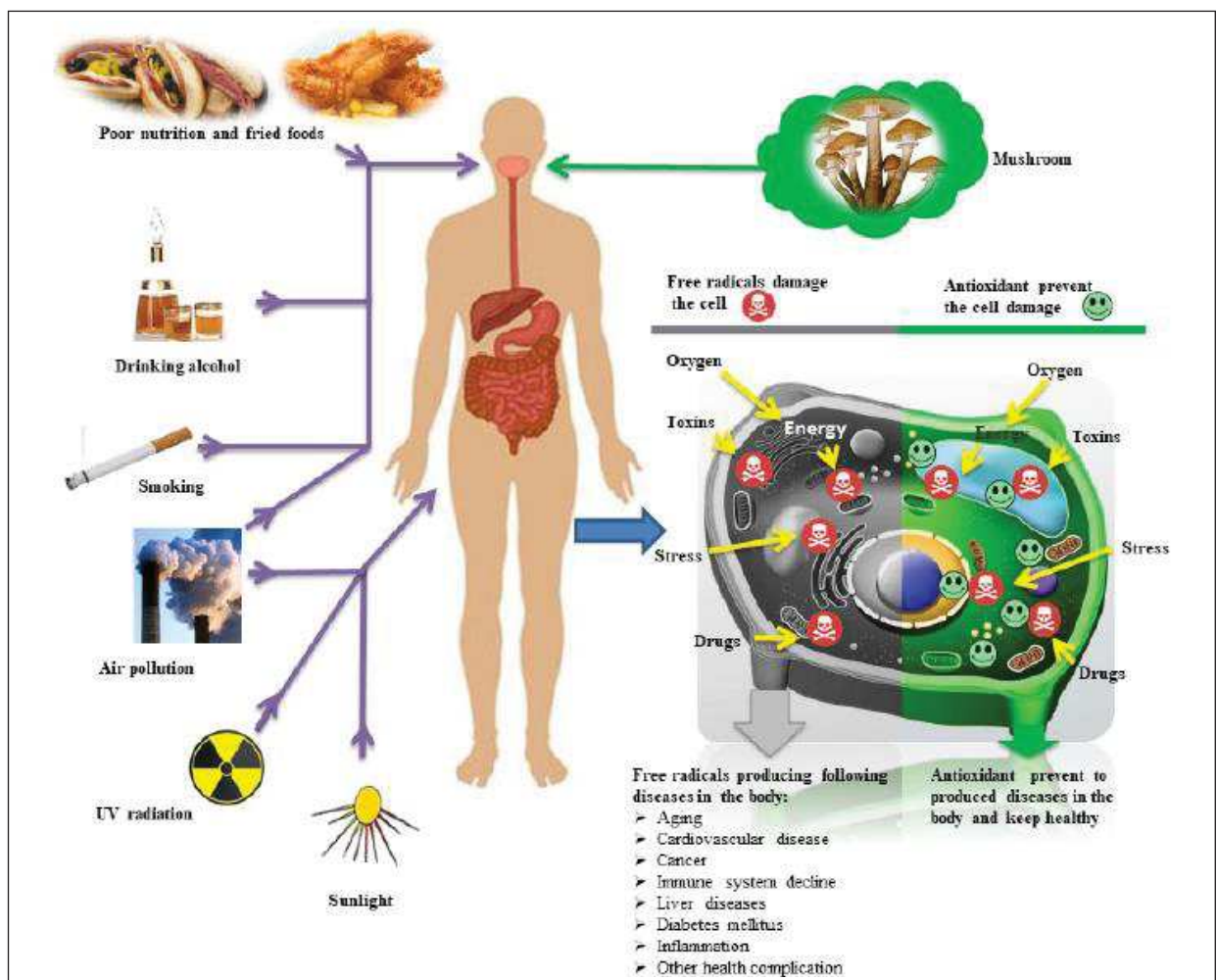


Figure 8 : Différents facteurs du stress oxydatif (Islam *et al.*, 2019)

### 2.1.1.2 Conséquence du stress oxydatif

Le déficit en antioxydant et/ou la surproduction et la non maîtrise des ERO n'est pas sans conséquences néfastes dans l'organisme, car elle aboutit souvent à un stress oxydatif qui est défini comme un déséquilibre entre le système antioxydant et la production d'oxydants (ERO) (Gutteridge, 1993 ; Delattre *et al.* 2005). Le principal danger de ces molécules oxygénées vient du fait des dommages qu'elles causent aux différents composants cellulaires tels que les lipides, les protéines l'ADN etc... , la dégradation des cellules et des tissus (Favier, 2003 ; Sanchez, 2017 ; Ighodaro et Akinloye, 2018).

Hormis ces effets délétères dans tout l'organisme (Evans & Halliwell, 1999; Valko *et al.*, 2004), le stress oxydant est largement impliqué dans le vieillissement et dans l'apparition de certaines pathologies (figure 9) telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'ostéoporose, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires (Haleng *et al.*, 2007 ; Rahman et Choudhury, 2012 ; Avci *et al.*, 2014 ; Sanchez, 2017 ; Forrester *et al.*, 2018).

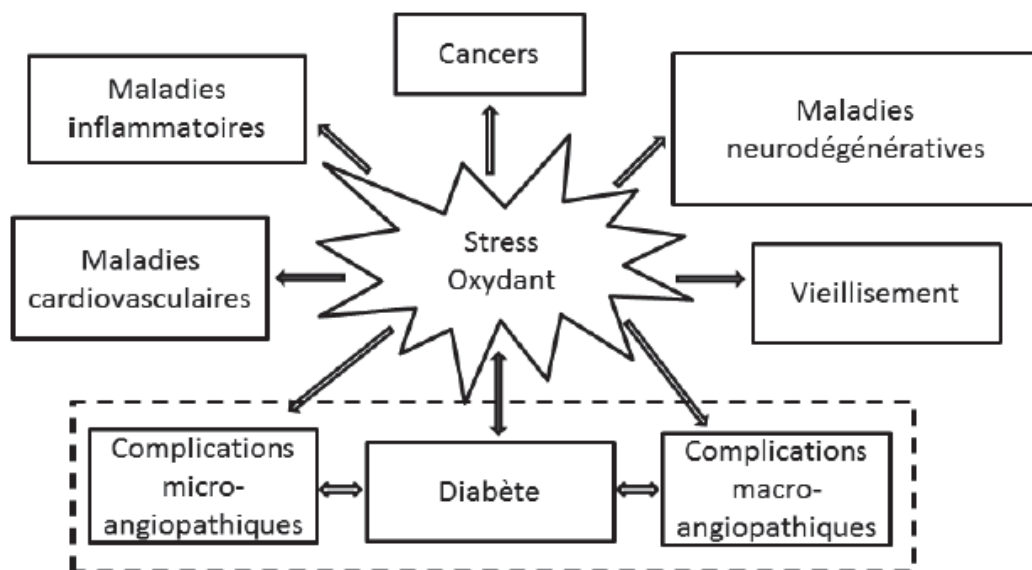


Figure 9 : Conséquences du stress oxydatif (Favier, 2006 ; Tan *et al.*, 2018)

### 2.1.1.3 Les systèmes antioxydants de l'organisme

Les antioxydants sont des substances qui sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat oxydable en agissant à faible concentration. Alors, pour se protéger des effets délétères des EOR, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défense antioxydante qu'on peut diviser en 2 systèmes.

#### a) *Les systèmes enzymatiques*

Il existe plusieurs molécules enzymatiques endogènes majoritaires dans l'organisme pouvant lutter contre les ERO. Il s'agit de la superoxyde dismutase capable de contribuer à la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Ighodaro et Akinloye, 2018) ; la catalase destinée à catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire et la glutathion peroxydase, qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (Kozarski *et al.*, 2015b ; Ighodaro et Akinloye, 2018 ; Islam *et al.*, 2019). Ce système est considéré comme la première ligne de défense de l'organisme contre le stress oxydant.

#### b) *Les systèmes non enzymatiques*

Ils sont généralement apportés par l'alimentation. Ce sont les caroténoïdes, les oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium, magnésium et manganèse), les polyphénols ainsi que les vitamines A, C et E (Favier, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Fofana, 2011 ; Islam *et al.*, 2019). Ces antioxydants agissent en bloquant ou inhibant à la fois la formation et la propagation des radicaux libres (Shah et Modi, 2015). A cela s'ajoute les antioxydants synthétiques, notamment le butyl-hydroxy-toluène (BHT), le butyl-hydroxy-anisole (BHA) et le tertio-butylhydroquinone (TBHQ) utilisés comme additifs depuis des années dans l'industrie alimentaire comme inhibiteurs potentiels de l'oxydation des lipides (Sajon *et al.*, 2018).

#### 2.1.2 Shiitake et activité antioxydante

Il arrive souvent que l'organisme ne soit pas à lui seul capable de lutter ou de prévenir les dommages causés par le stress oxydatif (Ganeshpurkar *et al.*, 2010 ; Finimundy *et al.*, 2014). Alors recourt peut être fait aux produits naturels de diverses origines : bactériennes, fongiques et végétales (Ngo, 2011 ; Coste, 2015 ; Carmona, 2016 ; Castan, 2016 ; Piatte, 2016) qui renferment des molécules bioactives connues pour leurs capacités à neutraliser les radicaux libres et éviter les dommages oxydatifs. Certains champignons comme le Shiitake en raison de sa teneur en composés phénoliques et autres molécules à haute activité biologique, fait l'objet de nombreuses études concernant son potentiel antioxydant (Kitzberger *et al.*, 2007 ; Chowdhury *et al.*, 2015 ; Acharya *et al.*, 2015 ; Diallo *et al.*, 2017b).

Plusieurs études *in vitro* attribuent à ce champignon la capacité d'inhiber ou de ralentir la production des radicaux libres et de protéger les lipides contre la peroxydation en raison de son contenu en molécules antioxydantes (Cheung *et al.*, 2003 ; Kitzberger *et al.*, 2007 ; Mujic *et*



*al.*, 2010 ; **Zhang et al.**, 2013 ; **Acharya et al.**, 2015). Parmi ces molécules antioxydantes on peut citer : l'ergostérol, l'ergothioneine et les acides phénoliques (**Shao et al.**, 2010 ; **Benson et al.**, 2012 ; **Heleno et al.**, 2015 ; **Carneiro et al.**, 2013).

L'activité antioxydante des molécules phénoliques issues du Shiitake s'explique par leur capacité à donner un atome d'hydrogène au radical libre ou à chélater les ions métalliques impliqués dans la formation des radicaux (**Choi et al.**, 2016 ; **Diallo et al.**, 2017b). D'ailleurs, les travaux de **Cheung et al.**, (2003) ont montré une corrélation positive entre l'activité antioxydante et le contenu en polyphénols de *Lentinula edodes*.

Une diversité des extraits du Shiitake (aqueux, alcoolique, hydro-alcoolique, éther diméthylque...) a été testé dans l'étude de son pouvoir antioxydant (tableau 7). La majeure partie des études porte sur ses extraits aqueux et alcooliques (**Cheung et al.**, 2003 ; **Ramirez-Anguiano et al.**, 2007 ; **Zhang et al.**, 2013 ; **Khaud et Joshi**, 2016 ; **Choi et al.**, 2016 ; **de Melo Macoris et al.**, 2017). S'agissant de leur efficacité, les extraits polaires présentent la plus forte activité contre les radicaux DPPH (diphényl-picryl-hydrazyl), hydroxydes et superoxydes avec un effet chélateur des ions ferreux très puissant (**Mujic et al.**, 2010 ; **Kozarski et al.**, 2012 ; **Ferrari et al.**, 2012 ; **Da Silva et al.**, 2011 ; **Diallo et al.**, 2019). Cependant, les extraits aqueux semblent être plus efficaces dans le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (**Boonsong et al.**, 2016 ; **Diallo et al.**, 2019). Des polysaccharides purifiés à partir du Shiitake ont été aussi utilisés par certains auteurs ; ils ont montré un effet inhibiteur sur les radicaux hydroxyles, superoxydes et sur les métaux pro-oxydants (**Chen et al.**, 2012).

Plusieurs méthodes (DPPH, FRAP, inhibition de la peroxydation lipidique, chélation des métaux, ABTS) ont été utilisées pour l'étude du potentiel antioxydant du *Lentinula edodes*, mais pratiquement peu parmi elles ont abordé l'étude de l'activité antioxydante du Shiitake avec la méthode d'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), (**Ramirez-Anguiano et al.**, 2007 ; **Kalyoncu et al.**, 2010 ; **Kozarski et al.**, 2012 ; **Shah et Modi**, 2015 ; **Diallo et al.**, 2019).

Selon les recherches de **Shah et Modi.** (2015) sur des extraits aqueux du mycélium du champignon, la méthode du DPPH est préférable par rapport au FRAP et à l'ABTS à cause du pourcentage des radicaux inhibés, de sa reproductibilité et de sa rapidité (**Shah et Modi**, 2015). A 1 mg/ml, environ 30 % des radicaux libres ont été inhibés, cependant pour l'ABTS, uniquement 21,66 % des radicaux ont été inhibés à la même concentration (**Shah et Modi**, 2015). Les résultats des tests étant exprimés à des unités différentes, il est difficile de faire une

comparaison entre les études et les méthodes utilisées dans l'investigation de l'activité antioxydante du Shiitake.

Parmi les méthodes de conditionnement du champignon (séchage) avant extraction des molécules antioxydantes, les résultats sont controversés. **Choi et al. (2006)** ont démontré que le contenu polyphénolique et les activités antioxydantes des extraits augmentent à mesure que la température de chauffage et le temps augmentaient. Par contre une étude de **Zhang et al. (2009)** montre que la lyophilisation est plus efficace par rapport aux autres méthodes de séchage pour préserver les propriétés antioxydantes du Shiitake. Le séchage thermique (séchage au four à micro-ondes, au four et au soleil) entraîne quant à lui des baisses significatives de son pouvoir antioxydant et de la teneur des composés phénoliques.

Par ailleurs, des recherches se sont orientées sur la différence entre le mycélium et le sporophore du *Lentinula edodes* du point de vue activité antioxydante. Les résultats révèlent que le sporophore possède une capacité antioxydante (DPPH et peroxydation lipidique) significativement plus importante que celle du mycélium. Par contre, la teneur en composés phénoliques reste plus élevée dans le mycélium que chez le sporophore (**Reis et al., 2012b**).

*Tableau 7 : Les extraits et les méthodes utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante de Shiitake*

Extraits utilisés	Concentrations	Méthodes	Résultats	Auteurs
Hydro-alcoolique	-	DPPH et ABTS	L'effet du traitement thermique du Shiitake sur les changements dans l'activité antioxydante globale de l'extrait du champignon a été étudié. Les résultats ont montré que le contenu polyphénoliques et les activités antioxydantes des extraits ont augmenté à mesure que la température de chauffage et le temps augmentaient.	<b>Choi <i>et al.</i>, 2006</b>
- Aqueux - Hydro-alcoolique - Diméthyle éther	500 µg/ml	DPPH, Reducing power Chélation des métaux Inhibition OH et O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Parmi les trois (3) extraits utilisés (aqueux, hydro-alcoolique, et ether diéthylique), l'étude montre que l'extrait hydro-alcoolique présente la plus forte activité de piégeage des radicaux DPPH et de piégeage des radicaux superoxydes et un effet chélateur des ions ferreux plus important à 500 µg/ml. Par contre, la teneur en TPC et le FRAP sont plus considérables dans l'extrait aqueux	<b>Boonsong <i>et al.</i>, 2016</b>
Aqueux	0,25 - 4mg/ml	OH, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> et Fe <sup>2+</sup>	Les polysaccharides extraits et purifiés à partir du Shiitake possèdent une activité antioxydante ayant un effet puissant sur les radicaux hydroxyles, superoxyde et sur les métaux pro-oxydants.	<b>Chen <i>et al.</i>, 2012</b>
Hydro-alcoolique	-	DPPH	La lyophilisation est meilleure par rapport aux autres méthodes de séchage pour préserver les propriétés antioxydantes du Shiitake. Le séchage thermique (séchage au four à micro-ondes, au four et au soleil) entraîne quant à lui à des baisses significatives du TPC, du TAC et du DSA.	<b>Zhang <i>et al.</i>, 2009</b>

Extraits utilisés	Concentrations	Méthodes	Résultats	Auteurs
Aqueux	0,5 - 1 - 2 – 5	DPPH, ABTS et FRAP	Le but de l'étude consistait à comparer trois méthodes spectrophotométriques (DPPH, ABTS et FRAP) de détermination de l'activité antioxydante du <i>Lentinula edodes</i> . A toutes les concentrations testées, la méthode de DPPH montre un pourcentage d'inhibition des radicaux significativement plus importante que celui d'ABTS et de FRAP.	<b>Shah et Modi, 2015</b>
Méthanolique	4,9	DPPH et FRAP	Une activité antioxydante avec un EC <sub>50</sub> = 4,99 mg/ml, 124,50 µmol de trolox/100g du poids sec respectivement pour le DPPH et le FRAP.	<b>Yildiz et al., 2015</b>
Méthanolique	-	DPPH, Reducing power, β-carotène peroxydation lipidique	Tous les extraits du <i>Lentinula edodes</i> montrent une faible activité pour les quatre (4) tests antioxydants avec des EC <sub>50</sub> nettement supérieurs à 3mg/ml.	<b>Heleno et al., 2015</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aqueux</li> <li>✓ Alcoolique</li> <li>✓ Hydro-alcoolique</li> </ul>		DPPH et β-carotène	A 0.5 à 2mg/ml, les extraits hydro-alcooliques montrent un pouvoir inhibiteur des radicaux libres du DPPH plus élevés que les autres extraits. S'agissant de la peroxydation lipidique (système β-carotène /acide linoléique), les extraits hydro-alcooliques et alcooliques sont plus actifs que ceux aqueux et cette activité n'est observée qu'à partir de 4mg/ml.	<b>Da Silva et al., 2011</b>
Méthanolique	EC <sub>50</sub>	DPPH et Peroxydation lipidique	Les résultats ont prouvé que le sporophore possède une capacité antioxydante (DPPH et lipide peroxydation) significativement plus importante que celle du mycélium. Par contre, la teneur en composés phénoliques reste plus élevée dans le mycélium que chez le sporophore.	<b>Reis et al., 2012b</b>

Extraits utilisés	Concentrations	Méthodes	Résultats	Auteurs
Méthanolique	400; 600 et 800 µg/ml	DPPH	Les extraits du Shiitake présentent une activité de piégeage des radicaux libres dose dépendante. Par exemple à 800 µg/ml, le pourcentage d'inhibition des radicaux libres est de 24,3%	<b>Fu et al., 2002</b>
Méthanolique	350 ; 1000 et 1500 µg/ml	DPPH	Une activité antioxydante appréciable avec une valeur de EC <sub>50</sub> égale à 1,25 mg / ml.	<b>Acharya et al., 2015</b>
Aqueux	-	DPPH Ferric Reducing power Peroxydation lipidique Chélation ions ferreux	Les activités antioxydantes l'extrait de polysaccharides du Shiitake utilisé dans les applications médicales a été évalué à travers quatre (4) méthodes différentes. Les résultats de l'étude indiquent l'extrait de polysaccharides du Shiitake est un véritable inhibiteur des radicaux du DPPH avec un EC <sub>50</sub> < 0,1. Ils ont aussi une action sur la peroxydation lipidique, la chélation des ions ferreux et la réduction des ions ferriques en ion ferreux avec un EC <sub>50</sub> respectivement de 8,12 ; 8,26 et 5,37.	<b>Kozarski et al., 2012</b>
Acétone-Eau		DPPH ORAC FRAP	Les résultats montrent que la cuisson influence le pouvoir antioxydant du shiitake.	<b>Kettawan et al., 2011</b>
Aqueux	2 ; 4 et 8 mg/ml	DPPH ABTS	L'activité antioxydante d'extraits aqueux de Shiitake a été évaluée en utilisant les radicaux DPPH et ABTS. Les extraits ont montré une capacité relativement forte à piéger les deux radicaux à 2-8 mg/ml.	<b>Kupcová et al., 2018</b>

## 2.2 Activité anti-inflammatoire

### 2.2.1 Rappel sur l'inflammation

Les barrières anatomiques et physiologiques à savoir la peau et les muqueuses forment une barrière physique qui protège efficacement l'organisme des agressions extérieures. Cette barrière est parfois franchie par des corps étrangers suite à une blessure, une brûlure, une attaque microbienne, virale ou fongique ou un dysfonctionnement des cellules de l'organisme. En se faisant, l'organisme fait recours à des acteurs capables de combattre l'ennemi. En effet, les cellules de l'immunité qui sont en garde détectent automatiquement l'envahisseur et une série de réactions biochimiques est déclenchée pour empêcher l'agent agresseur de se propager en lançant une réparation. C'est l'inflammation ou réaction inflammatoire.

L'inflammation est donc une réaction de défense immunitaire de l'organisme qui se met en place suite à une menace, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (**Geng *et al.*, 2014 ; Haioun et Zohra, 2015 ; Du *et al.*, 2018**). Elle est souvent suivie par une dilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration de cellules et de certaines molécules du sang vers les tissus où l'agression a été localisée, favorisant ainsi rougeur, chaleur, œdème et douleur (**Pacheco-Sanchez *et al.*, 2006 ; Geng *et al.*, 2014**). C'est la première ligne de défense de l'organisme.

### 2.2.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation

Les premières cellules immunitaires à entrer en jeu sont les mastocytes, les cellules dendritiques et les macrophages tous appelés cellules sentinelles résidentes. A celles-ci s'ajoutent les plaquettes et les lymphocytes (**Crea & Biasucci, 2012 ; Newton & Dixit, 2012 ; Hirayama *et al.*, 2017**). Ces cellules possèdent à la surface de leur membrane des récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors) notamment les TLR (Toll like receptors) capables de reconnaître le type d'agresseur. Quant aux bactéries, elles sont munies des motifs PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui sont immédiatement reconnus par les PRR dès qu'elles pénètrent dans les tissus (**Normand, 2009 ; Patel *et al.*, 2017 ; Newton & Dixit, 2012 ; Liu *et al.*, 2017 ; Amarante-Mendes *et al.*, 2018**) Cette reconnaissance conduit à l'activation des cellules résidentes et va initier la réaction inflammatoire (**Sterka *et al.*, 2006 ; Rubartelli *et al.*, 2007 ; Medzhitov, 2008**).

On assiste ainsi à une libération des médiateurs inflammatoires véritables signaux d'alerte pour l'ensemble du système immunitaire (IL-1, TNF $\alpha$ ...). Certains médiateurs comme l'histamine et

la sérotonine sécrétés par les mastocytes agissent sur la paroi des vaisseaux sanguins augmentant ainsi la vasodilatation et la perméabilité des vaisseaux à proximité des zones lésées (**Nathan, 2002**). Cela facilite le passage des polynucléaires (granulocytes et monocytes) du milieu sanguin vers les tissus : c'est la diapédèse. Il s'ensuit rougeur, douleur, chaleur et œdème caractéristiques principales de la réaction inflammatoire. D'autres médiateurs comme les cytokines et les chimiokines émis par les cellules sentinelles (IL-1, IL-6 et le TNF $\alpha$ ) peuvent recruter d'autres cellules en renfort comme les macrophages qui ont un pouvoir phagocytaires leur permettant de neutraliser l'agresseur (**Le Thi Thu et al., 2014 ; Patel et al., 2017**).

Cependant, bien qu'efficace, la réponse immunitaire innée n'est pas toujours capable d'éliminer les agents pathogènes l'agent agresseur peut persister et dans ce cas, il se fait aider par le système immunitaire adaptatif grâce à l'activation des lymphocytes (**Normand, 2009 ; Scrivo et al., 2011**).

Idéalement, l'inflammation est un processus physiologique souhaité et bénéfique pour l'organisme car, elle permet de combattre, d'éliminer l'agent pathogène et un retour à l'homéostasie des tissus endommagés (**Medzhitov, 2008 ; Hajjaj, 2017**). Il arrive souvent que l'inflammation soit mal contrôlée, non régulée et qu'elle dégénère, dans ce cas, elle peut conduire à des pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn. C'est l'inflammation chronique (**Pacheco-Sanchez et al., 2006 ; Alessandri et al., 2013 ; Hajjaj, 2017**).

Un grand nombre de substances sont impliquées dans le processus inflammatoire. Il s'agit entre autres des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6), des prostaglandines (PGs) et de l'oxyde nitrique (NO), mais aussi de plusieurs types de cellules, dont les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes T, jouant également un rôle important (**Revillard, 2001 ; Kapoor et al., 2005 ; Xiaojuan Xu et al., 2012**). Toutes ces molécules sont obligées de jouer une action synergique efficace et complexe pour que la réaction inflammatoire remplisse toutes ses fonctions de protection. Dans le cas contraire, la réaction inflammatoire pourrait dépasser ses objectifs et devenir délétère pour les tissus favorisant ainsi l'apparition de différentes pathologies (**Revillard, 2001 ; Garcia-Moll & Kaski, 2005 ; Kapoor et al., 2005 ; Licastro et al., 2005**).

### 2.2.3 Types d'inflammation

#### 2.2.3.1 L'inflammation aigue

C'est une réponse inflammatoire immédiate suite à une agression par un agent pathogène, de courte durée et d'installation brutale. Dans les conditions normales, l'inflammation aigue guérit

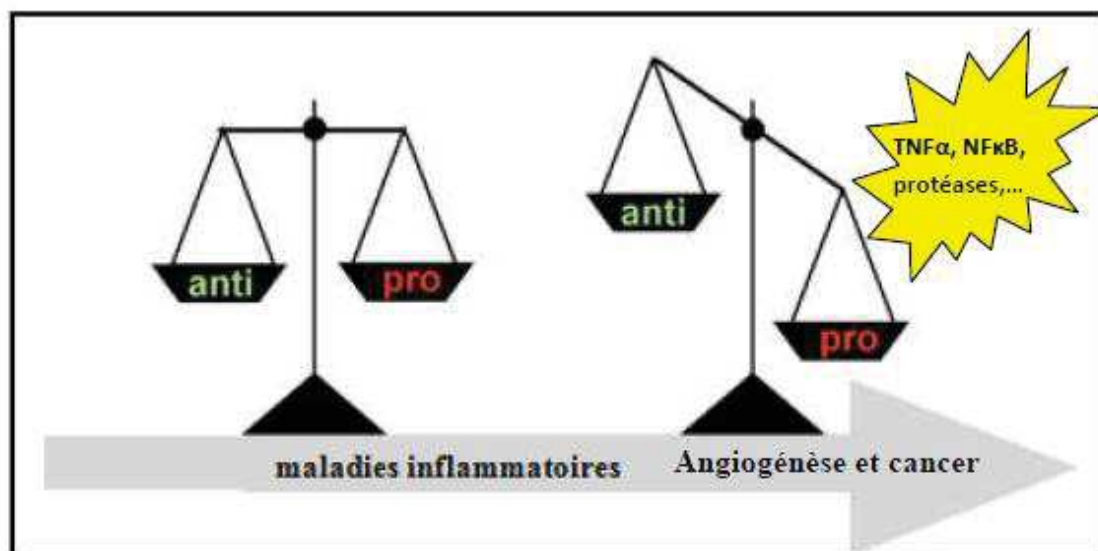
spontanément ou avec un traitement. Par contre, des séquelles de la réaction peuvent exister si la destruction a été significative (**Haïoun et Zohra, 2015**). Elle évolue en 3 phases qui sont :

- **La phase vasculaire** : Elle commence par une vasoconstriction de courte durée causée par l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse. Cette douleur s'explique par la libération d'histamine, de sérotonine, des prostaglandines et de kinine. L'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux (**Bony, 2010 ; Haïoun et Zohra, 2015**). La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité et de l'élévation de la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire. La diapédèse s'ensuit, après l'adhérence des cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins (**Hajjaj, 2017**).
- **La phase cellulaire** : Correspond à l'arrivée au foyer inflammatoire des leucocytes. Elle débute avec les polynucléaires neutrophiles, qui sont remplacés progressivement par les cellules mononucléées, principalement les macrophages. La libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires et le pouvoir phagocytaire des macrophages permettent la destruction de l'agent pathogène (**Hajjaj, 2017**).
- **La phase de résolution** : C'est la phase de l'élimination du pathogène, des neutrophiles morts et des produits de la dégradation tissulaire, donc du retour à l'homéostasie. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines (IL-4 et IL-10), des fibroblastes et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire douloureuses (**Carip, 2010; Mebirouk, 2017**).

#### 2.2.3.2 L'inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à la persistance de l'agent pathogène à cause de l'échec de la réponse inflammatoire aiguë ou d'une réponse inappropriée (**Hajjaj, 2017**). La balance entre les molécules pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13 et TGF $\beta$ ) est perturbée (figure 10), ce déséquilibre conduisant à des nombreuses pathologies et à la destruction des tissus enflammés (**Mebirouk, 2017**).





**Figure 10** : Déséquilibre entre molécules pro et anti-inflammatoires (Mebirouk, 2017).

#### 2.2.4 Les médiateurs inflammatoires

Le processus inflammatoire implique une diversité de molécules appelée médiateurs inflammatoires. Parmi elles, on peut citer : les cytokines, l'oxyde nitrique, les médiateurs lipidiques et même des radicaux libres oxygénés.

##### 2.2.4.1 Les cytokines

Les cytokines sont des molécules protéiques de faible poids moléculaires appartenant à la famille des messagers solubles. Elles sont produites par plusieurs cellules du système immunitaire principalement par les macrophages et les mastocytes en réponse à divers stimuli (**Liu et al., 2017**). Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et est capable d'agir sur plusieurs cibles différentes. La diversité de leurs sources et de leurs cibles, ainsi que leurs nombreuses interactions entre elles permettent de parler de réseau de cytokines. Ces molécules jouent plusieurs rôles dans la réponse inflammatoire, notamment l'activation de l'endothélium et des leucocytes, l'induction de la réponse en phase aiguë et la stimulation des terminaisons nerveuses tissulaires pour informer le système nerveux de l'évolution de l'inflammation (**Medzhitov, 2008 ; Carip, 2010 ; Patel et al., 2017; Yahfoufi et al., 2018**).

Il existe des cytokines inflammatoires qui amplifient et entretiennent l'inflammation. Elles orchestrent une cascade de médiateurs qui contribuent directement au processus inflammatoire. Ce sont par exemple l'IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  (**Adib-Conquy & Cavillon, 2012 ; Mao et al. 2018**) et les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th17 : IL-17 et IL-22. Parallèlement à ces molécules, il y'a des cytokines anti-inflammatoires (cytokines impliquées dans l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires en s'opposant aussi à leurs effets délétères)

comme l'IL-4, l'IL-10, le TGF $\beta$  et l'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) (**Le Thi Thu, 2014 ; Wojdasiewicz et al., 2014**).

Dans la section suivante, nous nous intéresserons uniquement au TNF $\alpha$  qui a fait l'objet d'un dosage dans cette thèse.

#### ❖ *Le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )*

Le TNF $\alpha$  est la première cytokine produite par les cellules activées du système immunitaire notamment les macrophages, les mastocytes, les lymphocytes T lors de la réaction inflammatoire. Découverte depuis 1975 par des chercheurs américains, le TNF $\alpha$  est synthétisé sous la forme d'un précurseur protéique inactif, ancré dans la membrane plasmique. Cette forme inactive va être clivée par l'enzyme TACE (TNF alpha converting enzyme) qui va libérer la forme biologique active du TNF $\alpha$ . Cette cytokine agit en se fixant sur deux types de récepteurs à savoir : TNF-R1 (appelé p55) et TNF-R2 (appelé p75) (**Paquet, 2010 ; Madore, 2013 ; Wojdasiewicz et al., 2014**). Le TNF-R1 est le plus abondamment exprimé et est indexé comme étant la principale voie de signalisation permettant la médiation des effets délétères du TNF $\alpha$ , alors que le TNFR2 joue un rôle de protection (**Laviolle & Bellissant, 2006**).

Le TNF $\alpha$  participe à une large gamme d'activités biologiques dont entre autres :

- le recrutement des globules blancs (neutrophiles, éosinophiles et monocytes) vers le lieu de l'infection ;
- l'activation du potentiel microbicide des phagocytes permettant d'éliminer l'agresseur ;
- la stimulation de la production de certaines cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-6.

Au cours de ce processus inflammatoire, il arrive souvent que la production du TNF $\alpha$  soit exagérée et non maîtrisée par l'organisme, cela peut poser divers effets chez l'hôte ce qui peut conduire à des œdèmes généralisés, des dommages tissulaires, des effets cytotoxiques et un choc septique souvent fatal qui se caractérise par une hypotension (**Laviolle & Bellissant, 2006 ; Adib-Conquy & Cavillon, 2012**). Le TNF- $\alpha$  est un acteur impliqué dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque chronique, de l'athérosclérose, ainsi que la polyarthrite rhumatoïde (**Laviolle & Bellissant, 2006; Scrivo et al., 2011**). Il a aussi sa part dans le désordre métabolique (diabète de type 2, insuffisance rénale et obésité) et le développement de la maladie de Crohn (**Clemenzi et al., 2018**).

#### 2.2.4.2 *L'oxyde nitrique (NO)*

L'oxyde nitrique est un médiateur inflammatoire produit par les macrophages, les cellules endothéliales et neuronales suite à une réponse à divers stimuli. Il est un des éléments

participant à la régulation de bon nombre de processus physiologiques et physiopathologiques de l'organisme. C'est une molécule instable, qui se transforme rapidement en nitrite et nitrate dans la cellule (**Guzik et al., 2003 ; Korhonen et al., 2005 ; Choi et al., 2018**). Contrairement au  $\text{TNF}\alpha$ , le NO ne possède pas de récepteurs cellulaires, mais il peut agir sur sa cellule cible de manière autocrine (NO endogène) ou paracrine (NO exogène) (**Douguet, 2015**).

Le NO est synthétisé à partir d'un acide aminé appelé L-arginine. Cette réaction s'effectue par l'action de l'enzyme oxyde nitrique synthétase (NOS) en présence d'oxygène moléculaire, de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), de la flavine et d'autres enzymes (**Bogdan, 2015 ; Choi et al., 2018**).

Parlant de la NOS, trois (3) isoformes sont connus à ce jour et sont largement décrits dans la littérature, ce sont : la NOS neuronale ou NOS1, présente principalement dans les cellules nerveuses et agit comme neurotransmetteur. La NOS inductible ou NOS2 produite par les macrophages et les neutrophiles activés, il est un agent cytotoxique contre les bactéries et les cellules tumorales et enfin la NOS endothéliale ou NOS3, exprimée par les cellules endothéliales et est considéré comme un véritable régulateur de la pression sanguine en empêchant l'agrégation plaquettaire à la surface endothéliale et induit une relaxation des muscles (**Guzik et al., 2003 ; Hussain et al. , 2008**).

La NOS neuronale et NOS endothéliale sont des enzymes constitutives. Elles produisent de faibles quantités de NO tandis que la NOS inductible permet de produire des quantités de NO plus importantes (**Hussain et al. , 2008 ; Douguet, 2015**).

Lorsque la production du NO par les cellules du système immunitaire spécialisées est maîtrisée et bien régulée, il joue un rôle bénéfique pour l'organisme en se comportant comme un véritable médiateur pro-inflammatoire (**Pacheco sanchez, 2006**). Il induit un effet cytotoxique puissant contre les bactéries, les champignons et les virus. Il participe au recrutement des neutrophiles et provoque également une relaxation des muscles (**Guzik et al., 2003 ; Korhonen et al., 2005 ; Dahboul, 2013**).

Par contre, à des taux élevés de NO, il possède des effets néfastes vis-à-vis des cellules de l'organisme allant de la cytotoxicité à des lésions cellulaires conduisant à la mutagenèse. L'oxyde nitrique réagit avec l'oxygène et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) pour former des espèces réactives de l'azote comme les peroxyde nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) qui est un puissant agent oxydant provoquant ainsi un stress oxydatif qui conduit à des dommages de l'ADN à de l'altération des

molécules protéiques et des lipides. D'où son implication dans des pathologies telles que : le cancer, le diabète les maladies auto-immunes, neurologiques et cardiovasculaires (Scrivo *et al.*, 2011).

#### 2.2.4.3 Les médiateurs lipidiques

Les médiateurs de l'inflammation ont des effets biologiques et des origines diverses (tableau 8). Ces médiateurs sont produits par les macrophages, les mastocytes et les cellules endothéliales. Ils sont dérivés des phospholipides des membranes cellulaires via la phospholipase, et comprennent pour la plupart des métabolites de l'acide arachidonique (Ricciotti & FitzGerald, 2011 ; Takeuchi & Amagase, 2017 ; Yahfoufi *et al.*, 2018).

Il existe deux principales voies métaboliques de l'acide arachidonique :

- a) *Voie de la cyclooxygénase* qui conduit aux principaux médiateurs lipidiques suivants :
  - ✓ **thromboxane A2** : un puissant agrégant plaquettaire et vasoconstricteur ;
  - ✓ **prostacyline** : un antiagrégant plaquettaire (par inhibition de la synthèse du thromboxane) et vasodilatateur ;
  - ✓ **prostaglandines PGD2, PGE2, etc..**: Ces médiateurs jouent parfois des rôles variables et antagonistes dans le processus inflammatoire, car ont le pouvoir de limiter la production du TNF. Ils sont connus pour leurs implication dans l'agrégation plaquettaire, la neurotransmission et dans les réactions vasculaires causant ainsi douleur et fièvre (Carip, 2010 ; Gomez *et al.*, 2013).
- b) *Voie de la lipoxygénase* : Elle conduit à la formation des **leucotriènes**, qui ont une action chimiotactique et vasoconstrictrice.

**Tableau 8** : Résumé succinct des effets biologiques et origines des principaux médiateurs de l'inflammation

Médiateurs	Origine	Effets biologiques
Histamine	Mastocytes, Basophiles, Plaquettes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, activation endothéliale et douleur
Cytokines (IL-1, IL-6)	Macrophages	

Médiateurs	Origine	Effets biologiques
	Mastocytes et neutrophiles	Activation endothéliale, diapédèse
Cytokines IL-4, IL-10	Macrophages Mastocytes et neutrophiles	Inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et leurs effets délétères
Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	Macrophages et Mastocytes	Recrutement des globules blancs, diapédèse, effet microbicide et élimination de l'agent pathogène
Oxyde nitrique (NO)	Macrophages et Mastocytes	Effet cytotoxique sur l'agresseur et induction d'effet cytotoxique et relaxation des muscles
Prostaglandines, prostacylines et thromboxanes	Acide arachidonique	Vasodilatation, augmentation perméabilité vasculaire, douleur, fièvre, agrégation plaquettaire

### 2.2.5 Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogènes. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation (**Hajjaj, 2017 ; Orliquet et al., 2013**). Elles sont utilisées lorsque la réaction inflammatoire se prolonge de façon anormale (inflammation chronique) et entraîne des dommages aux tissus. Ces molécules sont classées en anti-inflammatoires stéroïdiens (cortisone et dérivés), anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et anti-inflammatoires naturels.

#### 2.2.5.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

C'est une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgique, antipyrétique (contre la fièvre) et antiagrégant plaquettaire pour certains (**Haioun et Zohra, 2015**). C'est une catégorie de médicaments renfermant des nombreuses molécules telles que le diclofénac, l'ibuprofène, l'aspirine et l'indométacine (**Erdogan et al., 2019 ; Hassan et al., 2019 ; Katsinelos et al., 2019**).

Leur mode d'action repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase 1 et/ou 2, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette propriété commune à tous les AINS conduit à une diminution de

la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), des prostacylines et des thromboxanes, importants médiateurs de l'inflammation (**Grandin, 2013 ; Katsinelos et al., 2019**). Malheureusement, ils sont également associés à de nombreux effets délétères car leur utilisation prolongée provoque des troubles gastro-intestinaux (comme les saignements intestinaux) et le dysfonctionnement plaquettaire (**Mebirouk, 2017 ; Capet et al., 2001 ; Orliaguet et al., 2013**). D'autres effets secondaires comme l'hypertension associée au dysfonctionnement rénal ont été également mentionnés

#### **2.2.5.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens constituent une classe des médicaments qui sont des dérivés synthétiques de la cortisone (**Coutinho et Chapman, 2011**). Parmi eux, on peut citer : le méthylprednisolone, le bêtaméthasone, la prednisone et la prednisolone (**Dworski et al., 1994 ; Bourbon et al., 2004 ; Becker, 2013 ; Danielson et al., 2018**). Ce sont des puissants anti-inflammatoires très utilisés doués également de propriétés immuno-modulatrices et antiallergiques (**Coutinho et Chapman, 2011**).

Parlant de leur mécanisme d'action, les glucocorticoïdes ont, à l'image des AINS, une action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines qui s'exerce spécifiquement sur la phospholipase A2, au début du métabolisme de l'acide arachidonique. Ils ont une action à la fois cytoplasmique et génomique, ayant pour conséquences une modulation de la transcription et de l'expression des médiateurs (**Dejean C et Richard, 2013**).

En effet, les corticoïdes agissent par le biais d'un récepteur qui est composé de 3 domaines distincts : le premier domaine fixe les glycoprotéines (partie N-terminale), le second sert à l'ancrage du complexe glucocorticoïde- récepteur à l'ADN nucléaire (partie intermédiaire), le troisième domaine va activer ou bloquer le promoteur des gènes (partie C-terminale). Ce récepteur est localisé dans le cytoplasme des cellules sous forme inactive et lié à un complexe protéique dont la « heat-shock protein » HSP 90 (protéine de choc thermique) et des immunophilines (protéines facilitant l'association d'autres protéines) (**Dejean C et Richard, 2013 ; Mitre-Aguilar et al., 2015**). Lorsque les glucocorticoïdes se fixent à leur récepteur, ils l'activent, ceci induit automatiquement une modification de la conformation du complexe protéique (protéines chaperonnes) dans le cytoplasme. Conséquence, migration de l'ensemble ligand-récepteur dans le noyau (translocation nucléaire) pour se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques appelés : les séquences GRE (Glucocorticoid Response Element). Ces séquences sont présentes sur le promoteur des gènes de nombreux médiateurs de la réponse inflammatoire

(Orliaguet *et al.*, 2013 ; Roquilly et Asehnoune, 2019). Les glucocorticoïdes en se fixant donc sur le promoteur des gènes vont soit bloquer l'action des facteurs de transcription nucléaire qui jouent un rôle important dans le cadre de la réponse à l'agression tels que NF- $\kappa$ B, soit stimuler la transcription des gènes (par exemple la lipocortine-1, thymosine,...). En bref, les glucocorticoïdes se fixent sur le promoteur des gènes des médiateurs pro-inflammatoires et bloquent leur action (Roquilly et Asehnoune, 2019).

Il est à noter que l'utilisation de ces corticostéroïdes a des inconvénients. Ils sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections et des troubles psychiatriques (Capet *et al.*, 2001 ; Mebirouk, 2017).

### 2.2.5.3 Les anti-inflammatoires naturels

Les composés phytochimiques issus du règne végétal et fongique sont très nombreux avec une gamme variée d'activités biologiques (Dhingra *et al.*, 2018). Certains parmi eux, possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles particulières la COX-1 et -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2), etc. Ces molécules présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires (Maroon *et al.*, 2010 ; Mebirouk, 2017 ; Dhingra *et al.*, 2018).

On trouve parmi les molécules anti-inflammatoires d'origine naturelle, la ciclosporine A, composé isolé du champignon *Tolypocladium inflatum*. Elle est capable d'inhiber l'IL-2. La curcumine isolée de *Curcuma Zongu* L. qui montre cliniquement une efficacité comparable à celle de la phénylbutazone. L'oléorésine de diverses espèces de *Copuiferu* L. (*Fabaceae*), la magnoshinine et la magnosaline, isolées des fleurs de *Magnolia salicifolia*, dont les essais pharmacologiques réalisés confirment l'utilisation en médecine traditionnelle des fleurs contre l'inflammation chronique des sinus.

Par ailleurs, au cours de ces dernières années, de nombreux composés pharmacologiquement actifs avec une activité anti-inflammatoire ont été isolés aussi à partir d'organismes marins (des éponges, des mollusques, des algues, des échinodermes et des bactéries) (Hajjaj, 2017; Mebirouk, 2017).

### 2.2.6 Shiitake et activité anti-inflammatoire

Une des stratégies possibles permettant de supprimer l'inflammation, est l'utilisation d'aliments possédant des hautes activités biologiques favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires telles que Il-4, Il-10 ou encore Il-13. A cet effet, les champignons comestibles attirent de plus en plus l'attention en tant qu'aliments fonctionnels car ils sont riches en

composés à activités anti-inflammatoires (**Gunawardena et al., 2014 ; Muszyńska et al., 2018**).

Parmi ces champignons le Shiitake montre, dans plusieurs études, une activité anti-inflammatoire satisfaisante à cause de certaines de ses molécules bioactives comme les polysaccharides, l'ergostérol et les polyphénols qui inhibent la production de l'oxyde nitrique (NO) (**Carbonero et al., 2008 ; Xu et al., 2012 ; Gunawardena et al., 2014**).

Les travaux de **Pacheco-Sanchez et al., (2006)** sur des cellules RAW 264.7, ont démontré clairement l'effet inhibiteur des polysaccharides issus du champignon *Collybia dryophila* sur la production de NO (oxyde nitrique) induite par le LPS (lipopolysaccharide) et IFN $\gamma$  (interféron gamma) chez les macrophages. A 250  $\mu\text{g/ml}$  de l'extrait, 90.5% de la production du NO est inhibée. Ces recherches ont permis de démontrer que la diminution de la production de NO induite par le LPS et l'IFN chez les macrophages était associée à une diminution de l'expression de l'enzyme inductible responsable de la synthèse de NO (iNOS). Cette diminution de l'expression d'iNOS observée par Western blot était elle-même associée à une inhibition de l'expression de l'ARNm du gène codant pour iNOS (**Pacheco-Sanchez et al., 2006**).

D'autres auteurs mentionnent que la diminution de la production du NO pourrait s'expliquer par l'inhibition des cyclooxygénases (**Zhang et al., 2011 ; Gunawardena et al., 2014**).

En 2012, pour tester les effets anti-inflammatoires du Shiitake, douze sujets humains souffrant de douleurs articulaires, ont consommé pendant six semaines un complément alimentaire contenant de la L-ergothioneine (molécule aminée se trouvant dans le Shiitake),

Après une semaine de traitement, les résultats montrent une diminution nette de la sensibilité à la douleur. Il a été constaté une reprise des douleurs 6 semaines après l'arrêt de la consommation du complément alimentaire (**Benson et al., 2012**). Une autre étude sur des modèles *in vitro* et *in vivo* menée au Japon en 2013 sur l'effet anti-inflammatoire du lentinane dans le cas des maladies intestinales inflammatoires, comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse a montré des résultats satisfaisants. Sur le modèle *in vivo*, le lentinane a été quotidiennement administré chez des souris, par voie intra-gastrique à différentes doses (50, 100 et 200  $\mu\text{g}$  par souris). Les résultats suggèrent que l'administration de lentinane possède une activité inhibitrice sur la perte de poids corporel. On observe également une réduction de l'inflammation de la muqueuse intestinale. Dans le modèle *in vitro* de la même étude, des macrophages de type RAW 264.7 sont stimulés par un lipopolysaccharide afin d'induire la formation des cytokines inflammatoires IL-8 et du facteur TNF- $\alpha$ . Les résultats montrent que le lentinane supprime l'augmentation de



facteurs de transcription nucléaires via la réduction d'un type de récepteurs spécifiques (Nishitani *et al.*, 2013).

## 2.3 Autres activités

### 2.3.1 Activité hypocholestérolémiante

Les maladies cardiovasculaires constituent aujourd'hui un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays. Elles sont considérées comme étant la première cause de mortalité dans le monde avec un nombre de décès qui va augmenter de 17.1 millions en 2004 à 23,4 millions en 2030 (Ortega, 2006). L'un des facteurs de risque les mieux établis est le taux élevé de cholestérol sanguin. Lors de la circulation dans le sang, le cholestérol bouche la paroi des artères et diminue le flux sanguin qui conduit à de graves problèmes cardiaques (Enman *et al.*, 2007). Le champignon Shiitake est connu comme solution naturelle à ces pathologies. De nombreuses publications scientifiques attribuent à ce champignon la capacité de réduire les taux plasmatiques de lipides et de prévenir la prise de poids grâce à l'éritadénine qu'il contient (Enman *et al.*, 2007 ; Bisen *et al.*, 2010). L'éritadénine est une molécule alcaloïdique dérivée de l'adénosine possédant une action hypocholestérolémiante. Sa teneur dans le shiitake est estimée entre 3,2 et 6,3 mg/g de shiitake sec (Enman *et al.*, 2007). Cependant pour certains auteurs, la quantité d'éritadénine trouvée dans le sporophore de ce champignon à travers les méthodes chromatographiques est de 0,5 à 0,7 mg/g de Shiitake sec (Vitanyi *et al.*, 1998).

En 2011, une étude australienne a examiné les effets du champignon Shiitake sur la prévention de l'altération des lipides plasmatiques, le dépôt des graisses, et sur l'augmentation du poids corporel induit par une alimentation riche en graisse chez des rats. Pour cela une quantité de 7, 20 et 60 g de poudre de shiitake a été ajoutée dans leurs régimes riches en matières grasses pendant 6 semaines. Les résultats ont révélé que les rats ayant reçu la plus grande quantité de poudre de shiitake (60 g) avaient un gain de poids corporel plus bas par rapport aux autres. Le dépôt total de graisse était assez faible chez les rats alimentés par un régime riche en teneur (60 g) de poudre de champignon que ceux supplémentés à 7 ou 20g seulement. De plus, leur taux de triglycérides était très réduit (55%), comparativement à ceux possédant un régime faiblement supplémenté en poudre de *Lentinula edodes* (Handayani *et al.*, 2011).

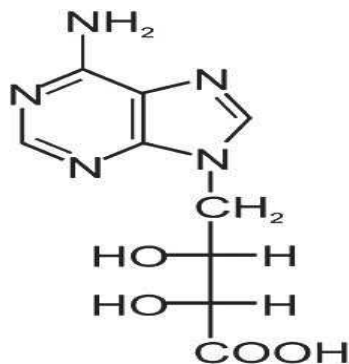
Les effets du *Lentinula edodes* ont été aussi étudiés dans un modèle de souris atteint d'hypercholestérolémie induite par un régime riche en matières grasses. Après quatre semaines, le taux de cholestérol sérique total, les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les triglycérides (TG) ont été augmentés chez les souris ayant une alimentation riche en graisse par rapport à

ceux possédant un régime normal. Cependant, les niveaux de lipoprotéines de haute densité (HDL) n'ont pas été modifiés de manière significative. Chez les souris traitées avec le Shiitake, le taux du cholestérol, LDL et TG ont été réduits. Les résultats de cette étude montrent clairement que le Shiitake peut aider à réguler le métabolisme lipidique, améliorer l'hypercholestérolémie chez la souris en régulant et stimulant l'expression de l'enzyme CYP7A1 dans le foie (**Yang et al., 2013**). Le CYP7A1 est la principale enzyme régulatrice de la synthèse des acides biliaires, jouant un rôle crucial dans le métabolisme du cholestérol. Elle est aussi suspectée d'être impliquée dans l'apparition de l'athérosclérose (**Lambrinoudaki et al., 2008**).

Dans le même ordre d'idée, récemment, l'utilisation d'un extrait aqueux de Shiitake inclus dans le régime d'un modèle murin, montre que ce champignon inhibe la HMG-CoA réductase, enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Il a été également constaté une diminution du taux des triglycérides dans le foie chez des souris hypercholestérolémiques avec une modification du profil transcriptionnel de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol de la même manière que chez des souris traitées par un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, la simvastatine (**Gil-Ramirez et al., 2016**).

En plus des tests sur des modèles animaux, d'autres laboratoires ont également démontré chez des sujets humains, le rôle et l'efficacité du Shiitake dans l'abaissement du taux de cholestérol plasmatique (**Bisen et al., 2010**). Une étude de **Suzuki et al. (1976)** a démontré qu'une consommation journalière de 9 g de Shiitake séché, 90 g de Shiitake frais et 9 g de Shiitake séché par les radiations UV pendant 7 jours, abaisse de façon significative chez les jeunes femmes les taux moyens de cholestérol sérique de 12 ; 7 et 6% respectivement (**Suzuki et al., 1976**). Cette propriété hypocholestérolémiant du Shiitake grâce à son éritadénine (figure 11), pourrait s'expliquer par sa contribution à la modification du métabolisme des phospholipides hépatiques (**Sugiyama et al., 1995 ; Sugiyama et al., 1997 ; Shimada et al., 2003 ; Yang et al., 2013**).

Le lentin du chêne ayant une action hypocholestérolémiant semblable à celle de la simvastatine est considéré comme une alternative éventuelle et efficace dans le cadre de la lutte et de la prévention des maladies cardio-vasculaires.



**Figure 11 : Molécules d'éritadénine (Bisen *et al.*, 2010)**

### 2.3.2 Activités hypoglycémiantes

Le diabète sucré est un groupe de maladies chroniques, métaboliques, caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (Kitagawa *et al.*, 1994 ; Beck-Nielsen *et al.*, 1995 ; Kuzuya *et al.*, 2002 ; Kawasaki *et al.*, 2004 ; Chen & Raymond, 2008 ; Stadler *et al.*, 2009 ; De Silva *et al.*, 2012 ; Islam *et al.*, 2014). L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (Drouin *et al.*, 1999 ; Hajzadeh *et al.*, 2011). Face à la perpétuelle recherche de nouvelles thérapeutiques pour traiter cette pathologie, de nombreuses recherches entamées depuis quelques années ont prouvé que certains champignons comme le lentin du chêne possèdent des propriétés hypoglycémiantes (Handayani *et al.*, 2011) et antidiabétiques à cause de leur teneur élevée en fibres et en protéines avec une faible teneur en matières grasses (Molitch *et al.*, 2000).

Yang *et al.* (2002) ont examiné l'effet d'un exo- polymère issu du *Lentinula edodes* dans le contrôle du diabète induit par la streptozocine chez des rats. En administrant un extrait de 200 mg/kg de poids corporel, les résultats ont montré une réduction du taux de glucose plasmatique de 21,5 % et une augmentation du taux de l'insuline plasmatique de 22,1 % chez les rats diabétiques induits par la streptozocine par rapport au groupe témoin. Il a également abaissé les taux plasmatiques du cholestérol total et les triglycérides de 25,1 et 44,5 % respectivement. L'analyse de l'extrait par chromatographie sur gel a révélé la présence d'une glycoprotéine ayant un poids moléculaire de 52 kDa. Elle contenait 83,5% de glucides et 16,5% de protéines. Cette molécule pourrait être responsable de cette activité hypoglycémiante. Le Shiitake pourrait avoir la capacité d'alléger dans une certaine mesure le dommage des cellules  $\beta$  pancréatiques,

favoriser la synthèse de l'insuline et ainsi abaisser les taux de glucose plasmatique (**Yang et al., 2002**).

Dans une autre étude, l'activité anti-hyper-glycémique d'un extrait éthanolique de *Lentinula edodes* a été testé chez des souris présentant un diabète induit par l'alloxane. Cet extrait éthanolique de *Lentinus edodes* à la dose de 200, 400, 600 et 800 mg/kg de poids corporel a été administré par voie orale une fois par jour aux souris diabétiques pendant 3 jours. Puis la glycémie à jeun a été déterminée. Les résultats ont montré que la glycémie a considérablement été réduite ( $p < 0,05$ ) chez les souris diabétiques traité par l'extrait éthanolique de shiitake par rapport aux groupes témoins (**Islam et al., 2014**).

### 2.3.3 Activités anti-cancéreuses

Face aux multiples effets indésirables de certains traitements chimiques et à la diminution importante de la qualité de vie des personnes atteintes de cancers, plusieurs chercheurs se sont intéressés à de nouvelles alternatives thérapeutiques (Tableau 9). Autrefois considérés comme des aliments à faible valeur nutritive, les champignons comme le shiitake, revêt à ce jour un intérêt particulier et présentent à l'image des plantes médicinales des propriétés bénéfiques sur la santé humaine dont entre autre l'activité anti-tumorale (**Pedneault, 2007, Diallo et al., 2018**). En 1970, grâce à des méthodes de fractionnement et de purification de polysaccharides, Chihara et ses collaborateurs qui ont été parmi les premiers scientifiques à étudier les propriétés anti-tumorales du champignon shiitake, ont isolé un polysaccharide anti-cancéreux à partir du carpophore du Shiitake, soluble dans l'eau. Cette molécule fut nommée "lentinane" (**Chihara et al., 1969 ; Chihara et al., 1970a ; Chihara et al., 1970b**). Ce polysaccharide est extrait du carpophore du champignon, de formule chimique  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Sa structure est en triple hélice. Son squelette glycosidique a une chaîne principale de type bêta-(1->3)-glucane avec une chaîne latérale de type bêta-(1->6)-Glucane. Son degré de branchement est de 2/5 (**Mizuno, 1995 ; Wasser et al., 1997 ; Borchers et al., 1999 ; Wasser, 2000**).

Depuis, de nombreuses études *in vitro* et sur des modèles animaux (tableau 9) ont pu démontrer le rôle potentiel du *Lentinula edodes* dans le traitement ou la prévention du cancer, en se focalisant sur l'inhibition de la croissance de cellules cancéreuses humaines comme le cancer gastrique (**Oba et al., 2009 ; Ina et al., 2013 ; Yoshino et al., 2016**), le cancer du sein (**Suzuki et al., 2013 ; Nagashima et al., 2013**), le cancer de la prostate (**White et al., 2002**) le cancer du côlon (**Wu et al., 2007 ; Wang et al., 2017**).

Déjà en 1969, **Ikekawa *et al.* (1969)** ont constaté que l'injection d'un extrait aqueux de *L. edodes* inhibait fortement à 81% la croissance des tumeurs issus des cellules d'ascite de sarcome 180 implantées chez des souris albinos suisses.

Les effets anti-tumoraux du lentinane sont plus importants que les polysaccharides issus d'autres champignons et il est très actif contre certains types de tumeurs (**Diallo *et al.*, 2018**). Cette activité a été confirmée en utilisant le Sarcoma-180 transplanté dans des souris. Il a été constaté une régression complète des tumeurs et sans toxicité (**Chihara *et al.*, 1987**). Une étude *in vitro* de 2006 qui portait sur deux lignées cellulaires de carcinome mammaire humain, une lignée de cellules saines et deux lignées cellulaires de myélome a tenté d'explorer le rôle potentiel d'un extrait d'acétate d'éthyle du Shiitake. Les résultats montrent que cet extrait possède une activité antiproliférative des cellules tumorales avec une concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) se situant entre 179 et 477 µg/ml. L'extrait analysé par LC-MS sans pouvoir identifier les structures des composés bioactifs a induit aussi le processus de mort cellulaire programmée (l'apoptose) de 50 % des cellules à 50 µg/ml) pour toutes les lignées cancéreuses (**Fang *et al.*, 2006**). En 2009 également, l'effet du lentinane issu de *Lentinula edodes* associé à une chimiothérapie (5-FU + mitomycine) a été testé sur un groupe de 650 personnes atteintes d'un cancer gastrique. Les résultats de cette méta-analyse ont révélés que l'association du lentinane au traitement possède un effet important et significatif ( $p < 0,01$ ) sur la qualité de vie des patients (**Oba *et al.*, 2009**).

Une autre recherche Japonaise a exploré, l'influence de l'extrait du *Lentinula edodes* mycelia (LEM) sur la qualité de vie et la réponse immunitaire chez vingt (20) patients atteints d'un cancer du sein et subissant une hormonothérapie adjuvante post-opératoire. Au cours des quatre premières semaines les patients n'ont reçu que des traitements hormonaux. Puis, une hormonothérapie et un traitement par LEM (ingestion de 1800 mg par jour) ont été administrés au cours des huit semaines suivantes. Les tests de laboratoire, le score de la qualité de vie et les niveaux de production de cytokines ont été évalués au cours de la période d'étude (**Suzuki *et al.*, 2013**). Les résultats ont montrés qu'aucun changement de la qualité de vie ou de cytokines n'a été noté après les 4 premières semaines. Au contraire, le niveau de production de certaines cytokines comme l'IL10, l'IFN $\gamma$  avait baissé. Par contre, au cours de la période de thérapie combinée, des améliorations significatives ont été observées sur la qualité de vie notamment : la vitalité, la santé mentale, les douleurs, le contrôle émotionnel et sur les fonctions immunitaires des patients (**Suzuki *et al.*, 2013**). Ces données suggèrent ainsi, que l'utilisation

concomitante de LEM avec un traitement hormonal adjuvant postopératoire est donc une modalité thérapeutique jouant un rôle majeur dans le pronostic des patientes.

Ces dernières années aussi, dans l'optique de bénéficier des effets synergiques des polysaccharides issus des champignons dans le traitement des tumeurs, un mélange de polysaccharide dans le rapport (1 :0,5 :0,5) extrait à partir de *Lentinula edodes*, de *Ganoderma lucidum* et de *Grifola frondosa* a été étudié en Chine. Pour ce faire, des souris femelles de la variété Kuming pesant  $20 \pm 2$  g, réparties en cinq groupes (10 animaux par groupe) et portant le sarcome 180 et un cancer de poumons de Lewis ont été traitées pendant 30 jours consécutifs avec le mélange de polysaccharides ajouté à leur nourriture quotidienne. Les concentrations utilisés ont été de : 0,17 ; 0,33 et 1 g/kg de poids corporel. Les résultats ont montré que les mélanges de polysaccharides pourraient remarquablement inhiber sans toxicité la croissance du S180 et du cancer des poumons de Lewis avec un taux d'inhibition de 42,2% et 49,3% respectivement. Le mélange a également augmenté l'activité des cellules tueuses naturelles de 63%. Les concentrations de 0,33 et 1 g/kg ont donné les meilleurs résultats (**Yin et al., 2007**). Récemment, pour étudier l'effet d'un extrait aqueux de polysaccharide du Shiitake dénommé « SLNT » sur la prolifération des cellules HT-29, des chercheurs chinois ont exposés ces cellules cancéreuses au SLNT à différentes concentrations pendant 48 h. Les résultats ont montrés que, la SLNT induit de manière significative l'apoptose des cellules de façon dose-dépendante, avec 20,26 %, 31,80 % et 48,50 % du taux apoptotique, respectivement pour les concentrations de 400, 800 et 1600  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , par rapport au témoin négatif (7,31%). La même étude a exploré l'effet du SLNT *in vivo* sur la croissance des tumeurs HT-29 chez les souris. De manière surprenante, l'étude a révélé que les tumeurs chez les souris recevant le SLNT étaient plus petites que celles des souris témoins (**Wang et al., 2017**).

**Tableau 9 : Quelques études sur l'activité anti-cancéreuse du Shiitake**

	Composé ou extrait	Modèle	Dose et durée	Résultats [Références]
<i>In vitro</i>	Fraction non polysaccharidique	2 lignées cellulaires de carcinome mammaire humain,  2 lignées de myélome et une lignée de cellules saines.	12,5-50-200-800 µg/ml  72 heures	Activité antiproliférative (IC <sub>50</sub> entre 179 et 477 µg/ml). Induction de l'apoptose (50 % des cellules à 50 µg/ml) pour toutes les lignées cancéreuses ( <b>Fang et al., 2006</b> ).
	Hétéropolysaccharide LEP1 (53 kDa)	Lignée cellulaire du cancer du col de l'utérus (HeLa).	100-200-400 µg/ml  72 heures	Activité antiproliférative (IC <sub>50</sub> = 100 µg/ml). Induction de l'apoptose (50 % des cellules à 100 µg/ml) ( <b>Ya, 2017</b> ).
Chez l'animal	Glucane L-II (homopolysaccharide) (203 kDa)	Souris portant le sarcome 180,  Groupes contrôle négatif (sans sarcome) et contrôle positif (cyclophosphamide).  10 souris / groupe	1-5-10 mg/kg  <u>Voie intrapéritonéale</u>  10 jours	Réduction de la taille des tumeurs de manière dose-dépendante. Activité immunomodulatrice de L-II ( <b>Zheng et al., 2005</b> ).
	β-glucane SLNT (623.5 kDa)	Souris athymiques avec xénogreffe (cellules cancéreuses humaines du colon HT-29),	0,2-1, 5 mg/kg  <u>Voie intraveineuse</u>  21 jours	Réduction de la taille des tumeurs chez les souris athymiques. Induction de l'apoptose <i>in vitro</i> ( <b>Wang et al., 2017</b> ).

	Composé ou extrait	Modèle	Dose et durée	Résultats [Références]
		Groupes contrôle négatif et contrôle positif (5-FU). 6 souris / groupe		
	Lentinane	6 lignées cellulaires de carcinome du colon humain chez la souris repartis en Groupes contrôle négatif et contrôle positif	3mg/jour 7 jours <u>Per os</u>	Réduction significative de la taille des tumeurs lorsque le lentinane est administré oralement ( <b>Mah-Lee et al., 2002</b> )
Chez l'Homme	Extrait de mycélium (essentiellement $\alpha$ -glucanes d'environ 5 kDa)	7 patients traités par chimiothérapie pour un adénocarcinome  <b><u>Essai non randomisé</u></b>	3 g/jour  <u>Per os</u>  1 mois	Augmentation des neutrophiles.  Diminution des lymphocytes et des monocytes ( <b>Del Buono et al., 2016</b> ).
	Extrait aqueux de mycélium LEM (polysaccharides, éritadénine, composés phénoliques)	20 patientes sous hormonothérapie après chirurgie pour cancer du sein  <b><u>Essai ouvert non randomisé</u></b>	600 mg, 3 fois par jour  <u>Per os</u>  8 semaines	Augmentation de la qualité de vie des patientes. Pas d'effets indésirables observés. Augmentation du ratio IFN $\gamma$ /IL-10 signifiant une amélioration de l'immunité <b>Suzuki et al., 2013</b> ).



	<b>Composé ou extrait</b>	<b>Modèle</b>	<b>Dose et durée</b>	<b>Résultats [Références]</b>
	Extrait de mycélium SEM (11-14 % de protéines, 8-10 % d'oligosaccharides, 4-5 % de polysaccharides)	62 hommes atteints d'un cancer de la prostate avec échec de traitement par hormonothérapie, radiothérapie ou traitement chirurgical (prostatectomie)  <b><u>Essai ouvert non randomisé</u></b>	8 ± 1 g/jour  <u>Per os</u>  6 mois	Réponse au traitement par SEM chez aucun patient (Pas de diminution significative des taux de PSA).  23 patients avec progression du cancer (augmentation du taux de PSA de plus de 50 %) ( <b>DeVere white <i>et al.</i>, 2002</b> )
	Lentinane (masse molaire non précisée)	Patients atteints d'un cancer gastrique : 146 traités par S-1 (tegafur-gimeracil-potassium oxonate) 149 traités par S-1 et LNT  <b><u>Essai multicentrique randomisé</u></b>	2 mg/semaine  <u>Voie intraveineuse</u>  60 mois	Pas de différences significatives entre le groupe traité par S-1 seul et celui par S-1 + LNT (survie, qualité de vie, effets indésirables) ( <b>Yoshino <i>et al.</i>, 2016</b> ).
	LEM	10 patientes atteintes d'un cancer de sein et sous chimiothérapie, traitées par LEM comme traitement adjuvant.  <b><u>Essai ouvert avec un seul groupe</u></b>	1800 mg/jour  21 jours	l'utilisation concomitante de LEM avec la thérapie FEC75 peut maintenir la qualité de vie de l'hôte et la fonction immunitaire ( <b>Nagashima <i>et al.</i>, 2013</b> )

Ce tableau N° 9 montre qu'*in vitro*, des extraits de Shiitake montrent une activité directe sur cellules tumorales. Néanmoins, on remarque que les extraits utilisés dans ces études ne sont pas composés que de  $\beta$ -glucanes. Chez l'animal, plusieurs études notent une induction de l'apoptose et une réduction de la taille des tumeurs en utilisant différents glucanes isolés du Shiitake, suggérant une activité directe sur les tumeurs. Chez l'Homme, les résultats sont difficiles à interpréter en raison d'une part, des différents types de cancers étudiés et, d'autre part, en raison de l'hétérogénéité des extraits testés. En effet, on peut remarquer qu'en fonction des études, des extraits comprenant des protéines, des oligosaccharides, des polysaccharides sont utilisés. On peut noter aussi que dans le cas de polysaccharides purifiés, la masse moléculaire des composés est importante à prendre en compte. Ainsi, un effet immunomodulateur sera maximal pour des glucanes de 500-800 kDa (**Chan et al., 2009**). Il est donc important de caractériser précisément les extraits ou molécules testés.

Bien que les extraits du Shiitake possèdent une activité anti-tumorale sur la plupart des cancers, leur mode d'action (mécanisme biologique) reste controversé. Pour certains auteurs, il ne provoque pas une attaque directe des cellules cancéreuses (**Ghosh, 2015**), mais il stimulerait le système immunitaire de l'hôte, en se liant à la surface de lymphocytes ou de protéines sériques spécifiques, provoquant ainsi l'activation des macrophages, des cellules T helper, de cellules NK ou encore d'autres cellules effectrices (figure 12) (**You et al., 2014 ; Ghosh, 2015**). C'est un véritable potentialisateur cellulaire permettant la production d'un grand nombre de cytokines comme IL-1, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , d'interférons (**Yap et al., 2003 ; Bisen et al., 2010 ; You et al., 2014 ; Wang et al., 2017**).

Pour d'autres, le Shiitake exerce ses effets anti-tumoraux de façon directe contre les cellules cancéreuses à travers deux voies qui sont: la voie intrinsèque médiée par la surproduction de ROS et la voie extrinsèque médiée par l'augmentation du TNF- $\alpha$ , l'inhibition de NF- $\kappa$ B et l'activation de caspase-8 et -3. Ce qui conduit à la suppression de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose (**Wang et al., 2017 ; Gomes et al., 2019**).

Ce champignon pourrait donc être un traitement « adjuvant » dans le cadre de la lutte contre certains cancers (**White et al., 2002 ; Del Buono et al., 2016 ; Diallo et al., 2018**). Par contre, en raison du nombre limité d'essais cliniques publiés, des études utilisant des extraits caractérisés et standardisés sont nécessaires pour évaluer les indicateurs de résultats obtenus (**Diallo et al., 2018**).

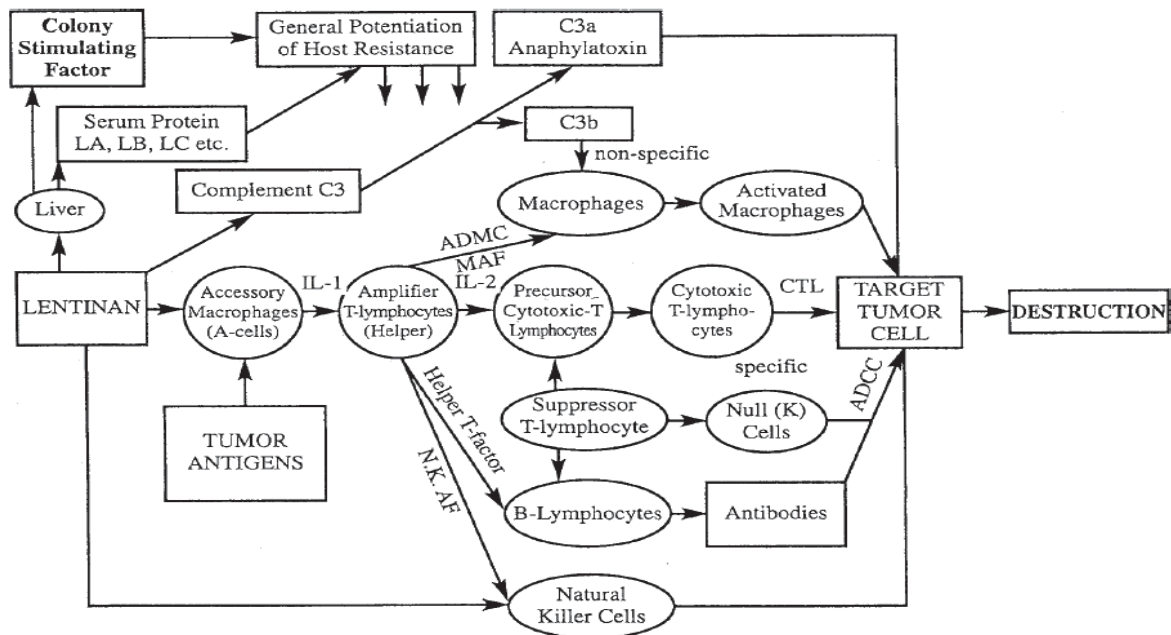


Figure 12 : Voies possibles de l'action du lentinane (Wasser, 2002)

#### 2.3.4 Activités antibactériennes et antifongiques

Selon l'organisation Mondiale de la Santé, l'émergence de nouvelles maladies infectieuses ces dernières années dans le monde (Morse, 1995 ; Spicuzza *et al.*, 2007) et le développement de résistances aux médicaments (Zhang & Yew, 2009) constituent aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement durable (OMS, 2018). A cela s'ajoutent l'apparition de virus mortels comme le virus Ebola qui a fait des ravages dans certains pays Africains notamment : la Guinée, le Libéria, la Sierra leonne et le Congo Démocratique et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques ainsi que les risques de toxicité associés à l'utilisation excessive des médicaments et des antibiotiques de synthèse (Saluzzo *et al.*, 2004). Face à ces menaces, les scientifiques sont emmenés à explorer différentes sources naturelles permettant d'obtenir de nouveaux médicaments, capables d'agir sans toxicité. Il a été prouvé que les champignons comme : *Agaricus bisporus*, *Amanita virosa*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* sont une source d'une grande diversité de métabolites secondaires ayant une activité anti-microbienne efficace (Gao *et al.*, 2005 ; Janes *et al.*, 2007 ; Hearst *et al.*, 2009 ; Akyuz *et al.*, 2010 ; Pauliuc & Daurica, 2013 ; Sharma *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016).

Le Lentin du chêne ou Shiitake qui est un champignon comestible, contient des substances telles que : le lentinane, la lenthionine et l'acide oxalique qui ont démontré des effets antimicrobiens, antibactériens et antiviraux (Hirasawa *et al.*, 1999 ; Hatvani, 2001 ;

**Muszyńska et al., 2017 ; Kupcova et al., 2018).** De façon générale, les études menées sur ce champignon dans l'évaluation de son potentiel antimicrobien sont réalisées avec ses extraits aqueux, alcooliques, éthyliques et chloroformiques sur une gamme variée de micro-organismes pathogènes dont entre autres : *Bacillus sp.*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, dans des milieux de cultures multiples.

D'autres travaux sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont donné des résultats satisfaisants (**Hirasawa et al., 1999 ; Ishikawa et al., 2001**). Dans ce contexte, Ishikawa et ses collaborateurs, à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Lentinus edodes*, ont testé son activité inhibitrice contre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Les résultats ont montré qu'une activité antibactérienne a été mise en évidence pour toutes les souches testées avec des diamètres d'inhibition, variant entre 3 à 207 mm (**Ishikawa et al., 2001**). Certains auteurs ont démontré aussi que *Streptococcus pyogenes* était très sensible à l'extrait chloroformique du *Lentinus edodes* (**Hatvani, 2001**). La capacité des extraits de *L. Edodes* à améliorer la santé bucco-dentaire a également fait l'objet d'une recherche approfondie, car elle a montré un fort effet bactéricide sur *Streptococcus mutans* fortement impliqué dans l'apparition de la carie dentaire. C'est dans cette même lancée qu'en 2011 à Londres, un groupe de chercheurs a testé les effets antimicrobiens du Shiitake sur la gingivite, une maladie évitable qui implique une inflammation des gencives due à l'accumulation d'un biofilm microbien à la marge gingivale. L'efficacité du champignon Shiitake a été comparée à celle du composant actif dans le traitement de la gingivite, contenant de la chlorhexidine. Les résultats indiquent clairement que l'extrait de champignon shiitake a abaissé le nombre de certains organismes pathogènes sans affecter les organismes associés à la santé, contrairement à la chlorhexidine, qui a eu un effet limité sur tous les organismes (**Ciric et al., 2011**).

Selon une étude réalisée au Japon en 1998 et publiée en 1999, parmi les extraits du shiitake testés pour leur potentiel antimicrobien, les extraits à base du chloroforme et d'acétate d'éthyle semblent être plus actifs que ceux aqueux à des concentrations minimales d'inhibition comprise entre 0,075 à 0,1 mg/ml, contre 10 à 50 mg/ml pour les extraits aqueux. Ceci pourrait se justifier par la présence de la lenthionine et des dérivés disulfures dans l'extrait du chloroforme et d'acétate d'éthyle respectivement (**Hirasawa et al., 1999**). Pour les extraits méthanoliques, la concentration minimale inhibitrice trouvée est de 1 à 4 mg/ml (**Chowdhury et al., 2015**). Ce résultat montre que ces extraits alcooliques ne sont pas actifs contre les bactéries. L'extrait

éthanolique du mycélium de *Lentinula edodes* possède également une activité antiprotozoaire contre *Paramecium caudatum* (Bender *et al.*, 2003).

Dans une étude menée par Hearst *et al.* (2009), sur plusieurs lots du champignon Shiitake qui ont subi une extraction aqueuse a démontré une activité antimicrobienne à une concentration de 1 mg / ml contre 33 des 39 espèces de microorganismes testés (soit 84,6%). En plus, 5 de 10 espèces de levure et de moisissures (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* et *Scedosporium apiospermum*) ont montré aussi une sensibilité aux extraits. Certaines espèces de micro-organismes pathogènes résistent à l'action inhibitrice de certaines souches de Shiitake. C'est le cas du : *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Lakshmi Priya et Srinivasan, 2013).

En 2015, une autre étude a évalué l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique contenant des composés phénoliques du Shiitake sur huit (8) souches microbiennes (tableau N°10). Après 24 heures d'incubation à 37°C, il a été possible de constater qu'avec une concentration minimale inhibitrice variant de 1 à 4 mg/ml, l'extrait a inhibé la croissance de toutes les souches testées avec un diamètre d'inhibition variant de  $7 \pm 0,2$  à  $20 \pm 0,1$  mm (Chowdhury *et al.*, 2015). Seul le *Pseudomonas aeruginosa* a montré une concentration minimale inhibitrice élevée (4 mg/ml) ce qui démontre que cette bactérie est plus résistante à l'extrait utilisé par rapport aux autres bactéries étudiées. Tout ceci a permis de prouver et de considérer que le Shiitake à part son intérêt nutritionnel possède un potentiel antibactérien et antifongique qui mérite d'être valorisé.

**Tableau 10 :** Concentration minimale inhibitrice et zone d'inhibition (en mm) de l'extrait de Shiitake (Chowdhury *et al.*, 2015).

Microorganismes	CMI en mg/ml	Zone d'inhibition en mm
<i>Bacillus subtilis</i>	3	$17 \pm 0,2$
<i>Candida albicans</i>	1	$18 \pm 0,2$
<i>Escherichia coli</i>	3	$14 \pm 0,1$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	$13 \pm 0,1$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	$12 \pm 0,2$
<i>Salmonella typhi</i>	2	$15 \pm 0,1$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	$13 \pm 0,1$

<i>Salmonella typhi</i>	2	15 ± 0,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	20 ± 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	16 ± 0,2

### 2.3.5 Activité hépatoprotectrice

Le foie est considéré comme la plus volumineuse des glandes du tube digestif. Sa richesse enzymatique et sa masse cellulaire lui permet d'effectuer de nombreuses fonctions biologiques notamment : la fonction de sécrétion, la fonction d'excrétion biliaire, la fonction métabolique et la fonction de détoxification.

Il est souvent exposé à diverses agressions qui conduisent parfois à l'apparition des pathologies comme : nécrose hépatocytaire et la cirrhose. Ces pathologies hépatiques constituent à l'image des autres anomalies métaboliques un problème majeur de santé publique dans nos sociétés (**Guillouza et al., 1989**). Pour protéger le foie contre ces maladies, l'utilisation des molécules naturelles à haute activité biologique issues des plantes ou du règne fongique reste une des solutions à explorer. A ce jour, peu d'études ont été initiées dans ce sens concernant le Shiitake, mais certaines révèlent des actions prometteuses.

Ainsi, un extrait aqueux et un extrait éthanolique issus du mycélium du Shiitake ont été étudiés pour leur effet hépatoprotecteur sur des souris. Des lésions hépatiques ont été induites par l'administration de la diméthylnitrosamine à 10 mg/kg de poids corporel. Pour mesurer le niveau de destruction des cellules hépatiques, les taux sanguins de deux enzymes à savoir : l'aspartate amino transférase (ASAT) et l'alanine amino-transférase (ALAT) ont été dosés. Les résultats montrent que les deux fractions diminuent fortement les taux sanguins d'ALAT et d'ASAT et suppriment la surexpression des gènes de l'actine musculaire lisse et/ou de la protéine de choc thermique 47 chez les souris. Les extraits ont également inhibé de manière dose dépendante et sans cytotoxicité la prolifération de cellules stellaires hépatiques des rats, qui jouent un rôle primordial dans la fibrose hépatique. L'interaction directe entre les extraits de Shiitake et les cellules stellaires hépatiques semble être la voie privilégiée pour l'activité hépatoprotectrice. Les polyphénols contenus dans les deux extraits du champignon sont considérés comme les molécules responsables des effets hépatoprotecteur enregistrés. La découverte d'une activité biologique de ce genre dans des extraits d'un champignon comestible devrait être utile et prometteuse dans le développement de médicaments contre les pathologies hépatiques n'ayant pas d'effets secondaires (**Akamatsu et al., 2004**).

Dans le même ordre d'idée, une étude menée en Malaisie en 2010 a montré que le Shiitake peut protéger les cellules du foie. L'objectif de l'étude était d'explorer les propriétés antioxydantes

et hépato-protectrices du Shiitake à travers ses extraits éthanoliques. Pour cela du paracétamol a été administré sur différents groupes de souris albinos, puis ils ont reçus une dose de champignon de 200 mg/kg pendant sept (7) jours. Les effets de l'extrait sur la diminution du taux des transaminases sériques, la phosphatase alcaline et la bilirubine ont été mesurés chez les souris induites par le paracétamol hépatotoxique. Les résultats ont montrés que les extraits étaient riches en composés phénoliques totaux (70.83 mg GAE/g d'extrait sec) et l'activité antioxydante était dépendante de la concentration des extraits administrés. Enfin, l'étude suggère que le *Lentinula edodes* pourrait avoir des effets protecteurs sur les cellules du foie grâce à l'effet antioxydant sur les hépatocytes (**Sasidharan *et al.*, 2010**).

**Tableau 11 : Récapitulatifs général des principes actifs du Shiitake, leurs activités biologiques et leurs modes d'actions**

Principes actifs	Définition	Activités biologiques	Mode d'action	Références
Polyphénols (acides phénoliques)	Molécules issue du métabolisme secondaire et possédant au moins deux groupements phénoliques, avec parfois la présence d'autres fonctions	<u>Activité anti-inflammatoire</u> : Diminution de la production de NO induite par le LPS et l'IFN chez les macrophages.  <u>Activité antioxydante</u> : Ces molécules sont capables de Piéger et d'inhiber les espèces réactives de l'oxygène.	Diminution de l'expression de l'enzyme inductible responsable de la synthèse de NO (iNOS).  Transfert d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons	Heleno et al., 2015 ; Kim et al., 2008 ; Carneiro et al., 2013 ; Chien et al., 2016
Polysaccharides ( $\beta$ -glucanes et lentinane)	Substances ayant un poids moléculaire élevée et extraits généralement à partir du carpophore du champignon	<u>Activité anti-inflammatoire</u> avec réduction de la production des médiateurs et cytokines inflammatoires telles que : NO, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6  <u>Activité anti-cancéreuse</u> : Ils induisent l'apoptose et réduisent la taille des tumeurs)	Inhibition de l'iNOS et Probablement avec suppression de la voie NF $\kappa$ -B ou de la MAP kinase.  Suppression de la voie NF- $\kappa$ B et activation de la caspase-8 et -3	Ren et al., 2018 ; Gunawardena et al., 2014 ; Xu et al., 2012 ; Wang <i>et al.</i> , 2017 ; Mah-Lee <i>et al.</i> , 2002 ; Fang <i>et al.</i> , 2006



Principes actifs	Définition	Activités biologiques	Mode d'action	Références
		<u>Activité hypolipémiante</u> : Contribuent à la réduction du taux de cholestérol dans le sang	Inhibition de la HMG-CoA réductase	Gil-Ramírez et al., 2106
Ergostérol	L'ergostérol est un stérol rencontré dans le règne des fungi et possède une structure voisine de celle du cholestérol	<u>Activité anti-inflammatoire</u> : L'ergostérol exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant la production de TNF $\alpha$ et l'expression de la COX-2.  <u>Activité antioxydante</u> : Inhibe fortement la production des radicaux libres	Suppression de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B	Shao <i>et al.</i> 2010 ; Kuo <i>et al.</i> , 2011 ; Boucher <i>et al.</i> , 2016 ; Koselny <i>et al.</i> , 2018
Eritadénine	Alcaloïde dérivé de l'adénosine	<u>Possède une action hypocholestérolémiante</u>	Expression du CYP7A1 dans le foie et réduction de l'activité de la HMG-Coa	Enman et al., 2007 Handayani et al., 2011
Ergothioneine	L'ergothioneine est un dérivé soufré de l'histidine rencontré dans le règne végétal et animal	<u>Activité anti-inflammatoire</u> : potentiel inhibiteur de la réponse inflammatoire chronique.  <u>Activité antioxydante</u> : Il possède un pouvoir de chélation des ions métalliques, de	Inhibition de l'activation de NF-KB	Antonicelli et al., 2003 ; Asahi et al., 2015 ; Cheah et al., 2012 ; Yoshida et al., 2017 ; Benson et al., 2012

Principes actifs	Définition	Activités biologiques	Mode d'action	Références
		piégeage des radicaux libres et limite la peroxydation lipidique		
Lenthionine.	Composé organo-sulfuré formant un cycle et présent dans le Shiitake	<u>Activité antibactérien et antifongique</u> : la lenthionine inhibe la croissance et l'activité des bactéries.	probablement dû à sa capacité à interférer avec la membrane de la bactérie, provoquant la lyse cellulaire	Hirasawa <i>et al.</i> , 1999 Chowdhury <i>et al.</i> , 2015 ; Kupcova <i>et al.</i> , 2018

Les principes actifs qui sont décrit dans le tableau 11, sont responsables des différentes activités biologiques du Shiitake mentionnées dans cette revue bibliographique.



**Deuxième partie : Travaux de thèse**

# 1 MATERIEL ET METHODES

## 1.1 Produits chimiques

Le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre (99,8%), l'acide protocatéchiq (97%) et la Ninhydrine ont été achetés chez Acros Organics (Geel, Belgique). Le Trolox (98%), le NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, le polyéthylène Glycol 400, le 2-amino-ethyl diphenyle borinate et l'acide acétique proviennent de Fluka Chemicals (Steinheim, Suisse). Les radicaux DPPH et AAPH (97%), l'acide gallique (97,5%), l'acide chlorogénique (95%), le cyclohexane (99,8%), l'acétonitrile, les lipopolysaccharides et le diméthylsulfoxyde (le DMSO (99,9%)) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). La fluorescéine, l'eau pour le HPLC, le Butanol (99,5%), l'acide formique, et le réactif de Folin Ciocalteu (F-C) ont été fournis par Panreac (Barcelone, Espagne). L'éthanol (96%), le méthanol (99,9%), l'acétate d'éthyle (99,9%) ont été achetés chez VWR (Radnor, PA). Le chloroforme (99%) et le Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99%) ont été obtenus à Riedel de Hanën. Le RPMI 1640 Medium (GlutaMAX™), le HBSS, les antibiotiques composés de (Penicillin-Streptomycin), le sérum de veau fœtal et l'IFN-γ proviennent de Gibco. Le kit *CellTiter 96 Aqueous non radioactive cell proliferation assay* a été fourni par Promega (France).

Acide abscissique, acide ascorbique, acide benzoïque, acide caféique, acide cinnamique, acide férulique, acide gallique, acide gentisique, acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchiq, acide p-coumarique, acide sulfosalicylique, acide syringique, acide vanillique, acide vétratrique ont été obtenus auprès de Legallais, l'ergostérol et les acides aminés (acide aspartique, acide glutamique, alanine, arginine, glycine, histidine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, sérine, thréonine et valine) et l'acide chlorogénique ont été obtenu chez Sigma Aldrich. La rutine (99%) a été obtenue chez Extra synthèse,

## 1.2 Matière fongique

La souche M-3782 de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, 1976) a été fournie par Mycelia, une société belge (<https://www.mycelia.be/fr>) pour l'achat de mycélium destiné aux professionnels. Les champignons étaient cultivés par trois producteurs situés en Occitanie (région administrative du sud de la France) sur des blocs de substrat stérilisés provenant de sa propre ingénierie (producteur de champignons biologiques B) ou fournis par des fournisseurs commerciaux (producteurs de champignons non biologiques A et C).

Le premier lot est issu du producteur A (11800 Fontiès-d'Aude), nommé M Loubet cultivant ses champignons sur un mélange de copeau de bois et de paille (culture non biologique) substrat d'Eurosubstrat ©) à des températures comprises entre 10 et 20°C et à 80% d'hygrométrie. Le

second lot (producteur B) (48240 Saint-André-de-Lancize) est issu de l'agriculture biologique, cultivé au cœur du Parc National des Cévennes par M Veenstra sur sciure de châtaigniers, son de blé et seigle avec des températures allant de 18 à 21°C et une hygrométrie de 60 à 70%. Le troisième est issu du producteur C (30460 Saint-Bonnet-de-Salendrinque) qui s'appelle M Lehnbach cultivant ses champignons sur un mélange de copeaux de bois, de sciures de chêne et de paille (culture non biologique) ; substrat de «Lentin de la buche» SA ©) et les températures varient de 15 à 17° C et à 100% d'hygrométrie). Chez chaque producteur une quantité de 5 kg a été achetée entre Janvier et Mai 2016.

### 1.3 Préparation des échantillons

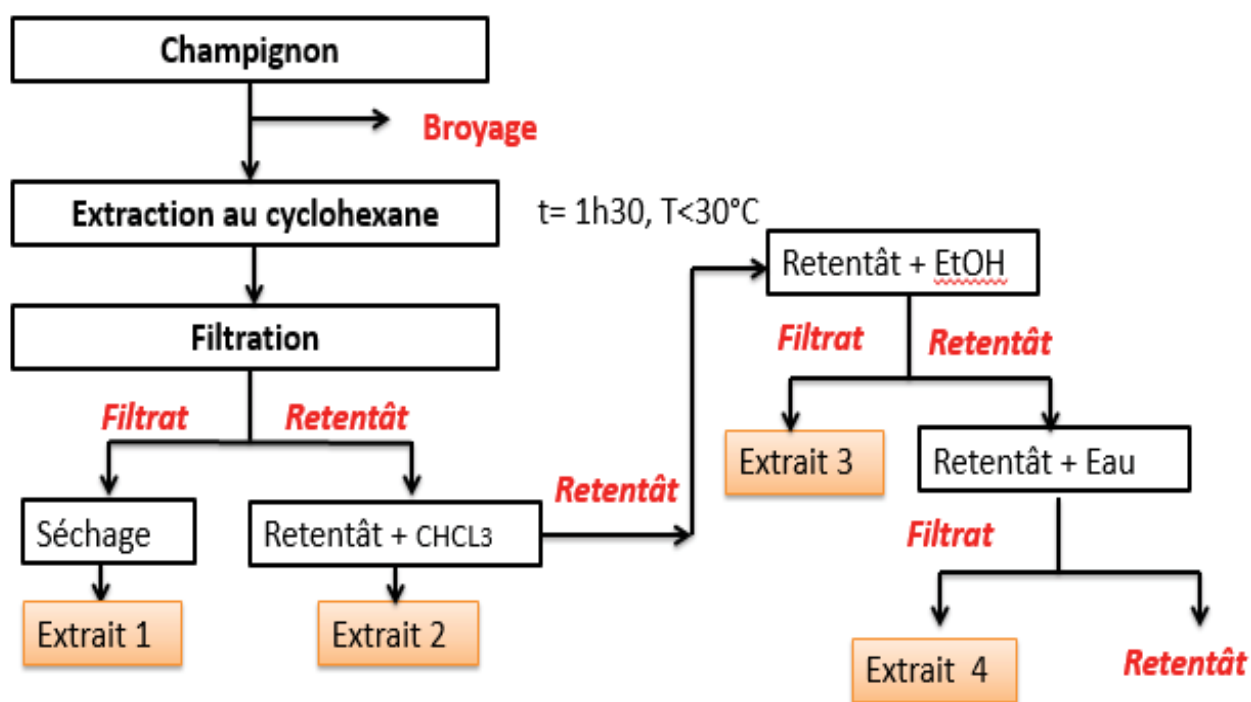
Les 5 kg de champignons achetés chez chacun des producteurs A, B et C ont été nettoyés, tranchés, calibrés, ensachés avec précautions dans des petits sacs en plastiques puis congelés. Ils ont été ensuite lyophilisés au *Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, Montpellier*, en utilisant un lyophilisateur RP2V (Sérail SAS, le coudray Saint Germer, France).

### 1.4 Procédure d'extraction des molécules

Afin d'extraire toutes les molécules d'intérêt (polaires et apolaires) du Shiitake, une extraction séquentielle (figure 13) utilisant des solvants de polarité croissante (cyclohexane, chloroforme, éthanol et eau) a été réalisée selon la méthode de **Morel *et al.*, (2018)**. Cette méthode a été choisie compte tenu de son efficacité à extraire et à préserver les molécules d'intérêts issus du matériel fongique.

Brièvement, une masse d'environ 50 grammes de champignons lyophilisés a été broyée dans un broyeur *Thermomix Vorwerk*. 5 g de poudre de champignon broyé ont été mis en solution dans 50 ml de cyclohexane dans le but de récolter les molécules lipidiques et apolaires. Le mélange a été mis dans la cuve à ultrasons pendant 90 minutes à une température maintenue en dessous de 30 °C. Sous l'effet des ultrasons, les molécules d'intérêt se solubilisent dans le solvant. Par la suite, le mélange a été filtré en utilisant le système de filtration Büchner le filtrat a été récupéré et stocké à température ambiante en attendant l'étape d'évaporation. Le retentât ou gâteau d'extraction restant dans la partie supérieure du filtre a été aussitôt remis en solution pour une deuxième extraction avec 50 ml de chloroforme afin de récolter les molécules non-extraites par le cyclohexane. Comme pour le premier solvant, l'extraction a été réalisée dans la cuve à ultrasons pendant 90 minutes avant la filtration. Une troisième extraction a été faite à partir du même gâteau d'extraction avec de l'éthanol pour extraire les composés phénoliques et les molécules polaires. Une quatrième avec de l'eau pour extraire les molécules polaires

restantes dont les sucres tout en suivant les mêmes étapes d'extraction. Ces quatre extractions successives ont été répétées sur trois échantillons différents pour les trois producteurs afin de vérifier la répétabilité des extractions et des profils par chromatographie.



*Figure 13 : Protocole d'extraction*

Après l'extraction, les extraits ont été évaporés à sec avec un évaporateur rotatif (R-3 Büchi) sous vide. Pour les extraits aqueux, une lyophilisation a permis de les sécher complètement. Les extraits secs successifs obtenus ont été nommés 1, 2, 3 et 4 (tableau 12) en fonction du producteur puis ils ont été conservés au réfrigérateur avant l'étape d'analyse.

*Tableau 12 : Nomenclature des différents extraits en fonction du solvant d'extraction*

Solvant d'extraction	Producteur A	Producteur B	Producteur C
Cyclohexane	A1	B1	C1
Chloroforme	A2	B2	C2
Ethanol	A3	B3	C3
Eau	A4	B4	C4

## 1.5 Criblage chimique sur chromatographie sur couche mince

Cette méthode a été utilisée dans cette étude non seulement pour identifier les différentes familles moléculaires présentes dans nos extraits mais aussi pour vérifier la répétabilité du profil chimique des extraits (extraction réalisée en triplicate) chez chacun des trois producteurs. Pour cela, des plaques de Silicagel 60 F254, 20 × 10 cm (Merck) en verre ont été utilisées. Nous avons déposé de façon symétrique et identique 20 µl de chaque extrait à la concentration de 2 mg/ml sur les plaques à l'aide du déposeur automatique (CAMAG TLC sampler 4, Suisse).

Les plaques ont été introduites dans la cuve chromatographique saturée et contenant l'éluant approprié en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de l'échantillon et le mélange de solvant. Dans notre cas les systèmes de solvant utilisés sont : cyclohexane-acétate d'éthyle (60 :40) pour les extraits cyclohexaniques et chloroformiques ; et le Butanol-Acétate d'éthyle-Eau ou BAE (60 : 20 : 20) pour les extraits éthanoliques et aqueux.

Après développement, les plaques ont été séchées par un sèche-cheveux avant d'être observées et photographiées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 366 nm.

Nous avons ensuite procédé à la détection des constituants à l'aide des révélateurs suivant :

- Acide sulfurique (révélateur universel). Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100 °C puis observée à la lumière visible et à 366 nm.
- Neu (Révélateur spécifique des flavonoïdes). Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100 °C puis observée à la lumière visible et à 366 nm.
- Ninhydrine (utilisée comme révélateur des acides aminés). Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100 °C puis observée à la lumière visible.
- DPPH (révélateur des molécules antioxydantes).

Le rapport frontal des spots issus de la séparation a été calculé selon la formule suivante :

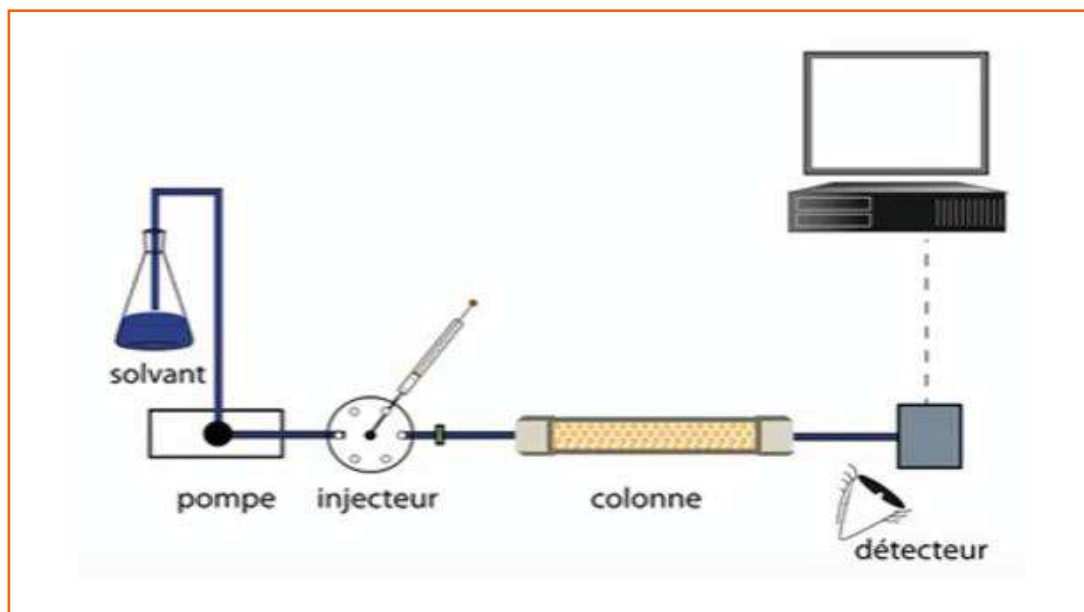
$$R_f = \frac{D_x \text{ (Distance parcourue par la molécule } x\text{)}}{D_y \text{ (Distance parcourue par le solvant)}} \quad \text{(Ballo, 2013)}$$

Si le  $R_f$  est faible, il est caractéristique d'une molécule qui a peu migré, donc possédant une affinité à la phase stationnaire. Par contre si le  $R_f$  est élevé, il est caractéristique d'une substance qui a fortement migré et ayant une affinité avec la phase mobile.

## 1.6 Caractérisation des extraits par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Cette méthode a été utilisée non seulement pour examiner la répétabilité des profils des extraits mais aussi pour leur caractérisation.

La chromatographie a été réalisée en utilisant une chaîne CLHP Ultimate 3000 (Thermo scientific) constituée: d'une pompe quaternaire (d'un débit maximum de 5 ml/min), d'un système d'injection automatique, d'une colonne C18 ODS Hypersil thermo scientific (250 × 4,6 mm) qui est protégée par une pré-colonne et d'un détecteur UV à barrettes de diodes DAD (figure 14). Le tout est piloté par le logiciel CHROMELON 7.



*Figure 14 : Schéma de fonctionnement d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse*

## 1.6.1 Analyse des polyphénols et de l'acide ascorbique

### 1.6.1.1 Préparation des extraits

Les extraits 1 et 2, sont préparés à 0,5 mg/ml en les ré-solubilisant dans du chloroforme, mis à l'ultrason pendant 5 minutes et vortexés avant l'ajout du méthanol avec une proportion méthanol-chloroforme (80:20). Quant aux extraits éthanoliques et aqueux, ils sont préparés à 2,5 mg/ml avec un mélange de méthanol et de l'eau pour un rapport de (40:60). Une centrifugation a été réalisée à 1000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant a été prélevé et mis dans des flacons de 2 ml pour l'analyse.

### 1.6.1.2 Analyse des extraits

La phase mobile est : solvant A = méthanol, solvant B = H<sub>2</sub>O et l'acide formique à 0,1%. Les échantillons ont été dissouts préalablement dans du méthanol à 1 mg/ml. Le volume de l'injection est de 20 µl. Les pics sont enregistrés puis examinés à 254 à 354 nm et identifiés par



temps de rétention comparés. La séparation a été réalisée à 35 °C sous un débit fixé à 1 ml/min (tableau 13) avec un gradient de solvant selon tableau suivant.

**Tableau 13 : Gradient de solvant pour acides phénoloques et acide ascorbique**

Temps (min)	%A (acide formique à 0,1% dans l'eau)	%B (Méthanol)	Débit (ml/min)
0	95	5	1
2	95	5	1
42	0	100	1
57	0	100	1
62	95	5	1
65	95	5	1

## 1.6.2 Identification et quantification de l'ergostérol

### 1.6.2.1 Préparation des extraits pour le dosage de l'ergostérol :

Pour les extraits 1 et 2, ils sont préparés à 0,5 mg/ml en les ré-solubilisant dans du chloroforme, mis à l'ultrason pendant 5 minutes et vortexés avant l'ajout du méthanol avec une proportion méthanol-chloroforme (80:20). Quant aux extraits éthanoliques et aqueux, ils sont préparés à 10 mg/l avec un mélange de méthanol et de l'eau pour un rapport de (40:60). Une centrifugation a été réalisée à 1000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant a été prélevé et mis dans des flacons de 2 ml pour l'analyse.

### 1.6.2.2 Dosage de l'ergostérol

L'identification et la quantification de l'ergostérol dans les extraits ont été réalisées conformément à la méthode décrite par **Barreira et al. (2014)** avec quelques modifications en utilisant la chaine HPLC décrite à la page précédente. La phase mobile utilisée est un mélange de méthanol et d'acétonitrile (70:30, V/V). Les échantillons préalablement préparés à 0,5 mg/ml pour les extraits 1 et 2 et 10 mg/ml pour les extraits 3 ont été injectés avec un volume de 20 µl à 30°C. La détection a été faite à 280 nm par temps de rétention comparé à celui du témoin avec un gradient du solvant selon le tableau 14. Chaque échantillon a été injecté trois (3) fois.

La quantification de l'ergostérol a été effectuée sur la base d'une courbe d'étalonnage obtenue avec un standard commercial à des concentrations de 0,25 ; 0,0625 ; 0,0156 et 0,0039 mg/ml. Les résultats ont été exprimés en mg/g de poids sec.

**Tableau 14 :** *Gradient du solvant pour l'ergostérol*

Temps (min)	% de A (Méthanol)	% de B (Acétonitrile)	Débit (ml/min)
0	30	70	1
30	30	70	1
40	100	0	1

### 1.6.3 Identification de la lovastatine et de $\alpha$ -tocophérol

La lovastatine et le  $\alpha$ -tocophérol ont été recherché selon la méthode utilisée pour le dosage des polyphénols décrite précédemment. Toutes les deux molécules ont été préparée à 0.1 mg/ml dans du méthanol.

## 1.7 Caractérisation des extraits par chromatographie sur couche mince

### 1.7.1 Détection des acides phénoliques (Acide vanillique et acide gallique) et acide ascorbique

Pour détecter les acides phénoliques (acide vanillique et acide gallique) et acide ascorbique dans les extraits polaires de Shiitake, des CCM ont été réalisées sur plaques de silice en verre F254, 20×10 (Merck) en utilisant comme éluant le Butanol-Acétone-Acide acétique- Eau ou BAAE (35: 35: 10: 20). Avec le déposeur automatique CAMAG TLC sampler 4, les extraits préparés à 10 mg/ml dans le méthanol, ont été déposés sur les plaques à raison de 20  $\mu$ l par dépôt. Quant aux témoins, ils ont été solubilisés à 0,1 mg/ml dans le méthanol.

Après développement dans la cuve chromatographique les plaques ont été séchées puis pulvérisées par un mélange (1 :1) de 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans de l'éthanol et d'une solution à 0,2% d'éthanol de p-diméthylaminocinnamaldéhyde puis observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm. Les tâches colorées apparaissant sur les chromatogrammes ont été numérisées à une longueur d'onde de 280 nm avec le scanner CAMAG TLC 3 qui est connecté à un ordinateur équipé du logiciel WinCAT.

### 1.7.2 Identification de l'ergostérol et de l' $\alpha$ -tocophérol

Afin de rechercher l'ergostérol et l' $\alpha$ -tocophérol dans les extraits apolaires de Shiitake, des CCM ont été réalisées sur plaques de silice en verre F254, 20×10 (Merck) en utilisant comme éluant le cyclohexane/acétate d'éthyle (90 : 10). Les dépôts sur plaques ont été réalisé par un déposeur automatique CAMAG TLC sampler 4. Ensuite, les plaques ont été observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm ainsi que par un CAMAG TLC scanner respectivement à 280 nm pour la plaque de l'ergostérol et 290 nm pour la plaque de l' $\alpha$ -tocophérol. Une numérisation des pics détectés a été aussi faite par le scanner du CAMAG. Pour pouvoir détecter les

molécules antioxydantes les plaques ont été révélées avec une solution de DPPH à 5 % dans le méthanol.

### 1.7.3 Identification, séparation et quantification des acides aminés

L'identification, la séparation et la quantification des acides aminés ont été réalisées par chromatographie sur couche mince en utilisant le déposeur et des plaques décrites précédemment. Les extraits éthanoliques des trois producteurs ont été préparés à 1 mg/ml dans le méthanol. Les standards (Acide aspartique, Acide glutamique, Alanine, Arginine, Glycine, Histidine, Isoleucine, Méthionine, Phénylalanine, Sérine, Thréonine et Valine) ont été solubilisés dans le méthanol à 0,1 mg/ml (puis mis à l'ultrason pendant 10 minutes) avant de préparer une gamme à des concentrations de 25 - 12,5 - 6,25 - 3,12 - 1,5 - 0,75 µg/ml. Le système de solvant utilisé comme élution est le Butanol-Acétone-Acide acétique- Eau ou BAAE (35: 35: 10: 20). Après développement, les plaques ont été séchées par un sèche-cheveux avant d'être pulvérisées par une solution de ninhydrine (8% dans le méthanol) puis chauffées à 100 °C pendant 2 à 3 minutes et observées à la lumière du jour.

Pour la quantification, les tâches colorées apparaissant sur les chromatogrammes ont été numérisées à une longueur d'onde de 550 nm avec le scanner CAMAG TLC 3 qui est connecté à un ordinateur équipé du logiciel WinCAT permettant de traiter les données.

## 1.8 Dosage des polyphénols totaux

Ce test a été réalisé en utilisant la méthode Folin Ciocalteu comme décrit par **Morel *et al.*, (2018)**. Brièvement, les extraits de Shiitake et celui du romarin ont été préparés dans du DMSO pour une concentration de 4 mg / ml avant d'être dilués dans de l'eau distillée pour avoir une concentration de 1 mg / ml. Une gamme étalon a été réalisée en milieu aqueux (1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25; 50 et 75 µg/ml) en utilisant l'acide gallique. Dans une plaque à 96 puits, 50 µl d'extrait de champignon, 50 µl d'acide gallique, et 50 µl de l'eau distillée ont été distribués en triplicate. Puis 50 µl de réactif de Folin Ciocalteu à 10% (1 ml de solution commerciale de Folin dans 9 ml d'eau) et 50 µl de solution de carbonate de sodium (1M) ont été ajoutés dans tous les puits. La lecture de l'absorbance à 650 nm a été réalisée grâce à un spectrophotomètre à microplaque muni d'un lecteur de microtitration Molecular Devices UV Max. Les résultats sont la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes (3 puits / concentration pour chaque expérience) et elles sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (GAE) par gramme d'extrait.

## 1.9 Détermination du pouvoir antioxydant des extraits *in vitro*

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Aucune de ces méthodes à elle seule n'est suffisante pour caractériser l'oxydation ou la protection contre l'oxydation, mais chacune contribue à la caractérisation globale des activités biologiques des composés ou mélanges testés. Le plus souvent il est nécessaire de combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une idée plus ou moins précise sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester. Par contre, l'ensemble des méthodes permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant *in vitro* peuvent être divisées en 2 groupes :

- ❖ Les méthodes basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène ou Hydrogen Atom Transfert (HAT) Tels que : la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) etc... La plupart de ces méthodes sont dépendantes du solvant utilisé et du pH, tandis que la présence de métaux peut interférer avec ces méthode (**Prior *et al.*, 2005 ; Shahidi & Zhong, 2015**).
- ❖ Les méthodes basées sur le transfert d'un électron ou Single Electron Transfert (SET) notamment : La méthode de DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazil) (considéré aussi comme méthode HAT, donc mixte), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (**Shahidi & Zhong, 2015**).

Dans notre cas, nous avons utilisé le DPPH pour la méthode SET et l'ORAC pour la méthode HAT. Le choix de ces méthodes se justifie par leurs simplicités et leurs rapidités. Elles sont également moins coûteuses.

### 1.9.1 DPPH

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode décrite par **Morel *et al.*, (2018)**. Les extraits de Shiitake testés ont été solubilisés d'abord dans le DMSO (solution mère à 4 mg/ml) avant d'être dilués dans l'éthanol absolu à différentes concentrations (1 ; 0,5 et 0,2 mg/ml) à partir de la solution mère. L'éthanol a été utilisé comme blanc et le trolox a servi de gamme d'étalonnage à des dilutions de 12.5, 25, 50 et 75 µM. L'extrait de romarin et l'acide chlorogénique ont été utilisé comme témoin positif. Puis, 100 µl de la gamme, de l'acide chlorogénique, du romarin et des extraits de Shiitake ont été déposés dans une plaque à 96 puits en triplicate pour chaque concentration testée. En fin, 75 µl d'éthanol absolu et 25 µl de la solution de DPPH fraîchement préparée ont été ajoutés afin de déclencher la réaction et d'avoir

un volume final égal à 200  $\mu$ l. La plaque a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière (dans du papier aluminium). L'absorbance a été mesurée à 550 nm en utilisant un lecteur de microplaque (MDS Inc., Toronto, Canada). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes (3 puits / concentration pour chaque expérience) et sont exprimés en équivalents Trolox (TE, micromoles d'ET par gramme d'extrait sec).

## 1.9.2 ORAC

Le dosage ORAC a été réalisé en utilisant la méthode de **Morel *et al.*, (2018)** avec quelques modifications. Les échantillons du Shiitake ont été solubilisés dans le DMSO à 1 mg/ml (solution mère). A partir de cette solution mère, ils ont été dilués à 25  $\mu$ g/ml dans une solution de tampon phosphate (75 mM) à un pH = 7,4. Dans une plaque opaque de 96 puits, 20  $\mu$ l de la gamme (trolox) à 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 75  $\mu$ M, de l'acide chlorogénique (8,8  $\mu$ M), de l'extrait éthanolique du romarin (12,5  $\mu$ g/ml) choisis comme témoin positif, des extraits de Shiitake à 25  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l de tampon phosphate et 100  $\mu$ l de solution de fluorescéine fraîchement préparée (0,1  $\mu$ M dans du tampon phosphate) ont été déposés en triplicate. La plaque a été incubée à 37°C pendant 10 minutes sous agitation. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 50  $\mu$ l de l'AAPH immédiatement préparés. La fluorescence a ensuite été mesurée et enregistrée à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission 535 nm, pendant 70 minutes en utilisant un lecteur de microplaques multimode TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne). Les valeurs d'ORAC finales ont été calculées en utilisant une équation de régression entre la concentration de Trolox et la surface nette sous la courbe de décroissance de la fluorescéine. Elles ont été exprimées en micromoles de trolox équivalent par gramme de matière d'extrait. L'aire sous la courbe aussi a été calculée en utilisant la méthode des trapèzes. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes (3 puits / concentration pour chaque expérience).

## 1.10 Activité anti-inflammatoire

### 1.10.1 Mesure de la viabilité cellulaire par le test MTS/PMS

L'effet des extraits du Shiitake sur la viabilité cellulaire a été réalisé par une technique colorimétrique utilisant un sel de tétrazolium, le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS) et d'un réactif capteur d'électron, la phénazine méthosulfate (PMS). Le MTS en milieu aqueux est réduit en un composé coloré soluble, le formazan, sous l'action des déshydrogénases retrouvées dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan formé est mesurée au lecteur de

microplaque à 490 nm (Molecular Devices) et est proportionnelle à la quantité de cellules viables (**Barltrop *et al.*, 1991**).

Pour cela,  $10^5$  cellules sous 100  $\mu$ l/puits sont incubées dans une plaque 96 puits en milieu RPMI 1640 Glutamax® additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100  $\mu$ g/mL de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline (milieu RPMI complet) à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité. Après 2 heures d'incubation, 100  $\mu$ l/puits de différentes concentrations d'extraits (de 3,125 à 100  $\mu$ g/ml) sont ajoutées puis la plaque est réincubée à 37°C pendant 22 heures environ. Quatre heures avant la fin de l'incubation à 37°C, 20  $\mu$ l du mélange MTS/PMS préalablement préparés sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est réincubée à 37 °C puis l'absorbance est mesurée à 490 nm.

La viabilité cellulaire est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times 100}{\text{Absorbance du controle}}$$

Le mélange MTS/PMS est préparé de la façon suivante : 2 mL de MTS (solution à 2 mg/ml dans l'HBSS : Hanks' Balanced Saline Solution) pour 100  $\mu$ L de PMS (solution à 0,92 mg/mL dans l'HBSS).

### 1.10.2 Effet des extrais sur la production de NO par les macrophages inflammatoires

L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques et aqueux des 3 producteurs a été évaluée *in vitro* dans un modèle inflammatoire de macrophages murins (cellules J774.A1 (lignée ATCC, TIB67). Pour cela, les cellules ( $5 \times 10^5$ /puits) sont incubées en milieu RPMI complet, dans une plaque 24 puits pendant 2 heures à 37 °C pour adhérer. Elles sont ensuite prétraitées par différentes concentrations d'extraits de Shiitake (de 3.125 à 50  $\mu$ g/ml) pendant 2 ou 4 heures selon les expériences puis stimulées par l'association LPS (*E. coli* 055B5, 100 ng/mL) et IFN $\gamma$  murin (10 ng/ml) puis incubées à 37 °C. Vingt quatre à 48 heures après l'activation des cellules par le LPS/IFN $\gamma$ , le NO (médiateur inflammatoire) est dosé dans le surnageant de culture sous forme de nitrites par la méthode colorimétrique de Griess.

### 1.10.3 Dosage du NO par la méthode de Griess

Cent  $\mu$ L/puits de chaque surnageant de culture cellulaire sont mélangés à 100  $\mu$ l/puits de réactif de Griess en plaque 96 puits. La plaque est incubée à l'obscurité pendant 10 minutes puis l'absorbance est mesurée à 550 nm au lecteur de microplaque (**Boudard *et al.*, 1994**).

Réactif de Griess : il est préparé extemporanément en mélangeant à volume égal une solution à 1 % (p/v) de sulphanilamide diluée dans l'eau distillée et une solution à 0,1 % (p/v) de naphthyléthylènediamine dihydrochloride diluée dans l'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 2%.

La quantité de nitrites dans les surnageants de culture est déterminée à partir d'une courbe étalon de nitrite de sodium dans l'eau distillée (de 1,56 à 100  $\mu$ M).

#### 1.10.4 Activité NO scavenging des extraits

Le nitroprusside de sodium se décompose en milieu aqueux à pH 7,2 pour donner du NO. Le NO produit, en condition aérobie se transforme en nitrates/nitrites. La quantité de nitrites produite est ensuite dosée par la réaction colorimétrique de Griess (**Parul et al, 2013**).

A partir d'une solution stock d'extraits à 10 mg/ml dans le DMSO, on réalise une gamme de dilutions successives au demi (de 6,25 à 50  $\mu$ g/ml) dans l'HBSS. Les différentes dilutions sont ensuite incubées volume à volume avec une solution de nitroprusside de sodium (5mM, diluée extemporanément dans l'HBSS) pendant 2 heures à température ambiante sous une lampe. En parallèle, on réalise un témoin HBSS seul (0%) et un témoin sodium nitroprusside (100%). Le NO est ensuite dosé sous forme de nitrites par la méthode de Griess.

Si les extraits piègent le NO produit par la dégradation spontanée du nitroprusside de sodium, la quantité de nitrites formés diminue comparativement au témoin nitroprusside de sodium sans extraits.

#### 1.10.5 Effet des extraits sur la production de TNF $\alpha$ par les macrophages inflammatoires

Pour le TNF $\alpha$  (cytokine inflammatoire), les cellules ont été prétraitées pendant 2 ou 4 heures avec les extraits avant d'être stimulées par le LPS/IFN $\gamma$  comme décrit au paragraphe 1.10.2. Six ou 48 heures après l'activation des cellules, les surnageants sont prélevés puis stockés à -80°C jusqu'au moment du dosage selon les expériences.

#### 1.10.6 Dosage du TNF $\alpha$ dans les surnageants de culture

Le TNF $\alpha$  est dosé par une méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sandwich à l'aide d'un kit commercial (mouse TNF $\alpha$  Elisa Ready-SET-Go, eBiosciences). Le seuil de détection du TNF $\alpha$  pour le kit est de 8 pg/ml.



**Résultats**



## 2 RESULTATS

### 2.1 Extraction et rendement d'extraction

L'extraction est un moyen qui permet le plus souvent de retirer des molécules chimiques d'un milieu solide ou liquide en les faisant passer d'une phase à une autre pour laquelle elles ont une plus grande affinité (Genthon, 2015). Les méthodes d'extraction dépendent aussi bien du matériel fongique que les molécules recherchées. L'extraction est influencée généralement par la méthode choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure (Mansour-djaalab H., 2014, Masoko *et al.*, 2008).

Selon les données de la littérature, plusieurs techniques d'extraction des molécules peuvent être mise en œuvre en présence de solvants notamment : l'heptane, l'hexane, éther diéthylique, toluène, dichlorométhane, acétone, acétate d'éthyle, éthanol ou de l'eau (Dieu, 2015).

Les résultats présentés dans le tableau N° 15 montrent que les extraits secs présentant le meilleur rendement d'extraction sont les extraits aqueux (extraits 4) suivis des extraits éthanoliques (extraits 3) pour tous les producteurs. Ces résultats semblent être cohérents et attendus compte tenu de la richesse des champignons en glucides et en composés phénoliques. Le rendement du producteur A est inférieur à B qui, lui aussi est inférieur à C. En considérant les extraits aqueux entre eux, on remarque que c'est le producteur C également qui possède le rendement le plus important (15,36%).

**Tableau 15 :** Rendement d'extraction des producteurs A, B et C en fonction de leurs extraits

Producteurs	Extraits	Masse extrait (mg)	Rendement par extrait (%)	Rendement total (%)
A	Extrait 1	0,057	1,15 ± 0,14	21,88 ± 2,14
	Extrait 2	0,034	0,68 ± 0,04	
	Extrait 3	0,329	6,59 ± 0,5	
	Extrait 4	0,672	13,45 ± 0,52	
B	Extrait 1	0,071	1,42 ± 0,16	28,58 ± 2,78
	Extrait 2	0,057	1,15 ± 0,06	
	Extrait 3	0,324	6,49 ± 0,52	
	Extrait 4	0,976	19,52 ± 2,14	

C	Extrait 1	0,048	0,97 ± 0,02	24,73 ± 2,47
	Extrait 2	0,045	0,91 ± 0,06	
	Extrait 3	0,374	7,49 ± 0,40	
	Extrait 4	0,767	15,36 ± 1,11	

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3).

## 2.2 Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM)

Ce criblage phytochimique a été réalisé en collaboration avec **Vallentin CELLARD** dans le cadre d'un stage de master recherche en sciences des aliments et nutrition (SAN) réalisé au laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie de la faculté de Pharmacie de l'Université de Montpellier.

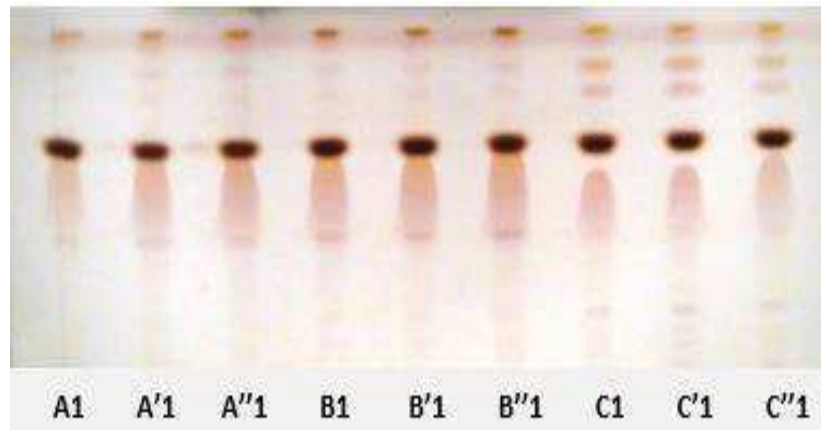
Suite à la révélation des chromatogrammes par les différents réactifs, nous avons mis en évidence 3 classes de molécules dans les extraits à savoir : polyphénols, antioxydants, et acides aminés (tableau 16).

*Tableau 16 : Molécules d'intérêt révélées par la CCM*

Producteurs	Extraits	Classe des molécules d'intérêts révélées		
		Polyphénols	Antioxydants	Acides aminés
A	Extrait 1	+	+	+
	Extrait 2	+	+	+
	Extrait 3	++	+	+++
	Extrait 4	++	++	++
B	Extrait 1	+	+	+
	Extrait 2	+	+	+
	Extrait 3	++	+	+++
	Extrait 4	++	++	++
C	Extrait 1	+	+	+
	Extrait 2	+	+	+
	Extrait 3	++	+	+++
	Extrait 4	++	++	++

- = Absent; + Presence faible; ++ =Présence moyenne; +++ = Abondamment

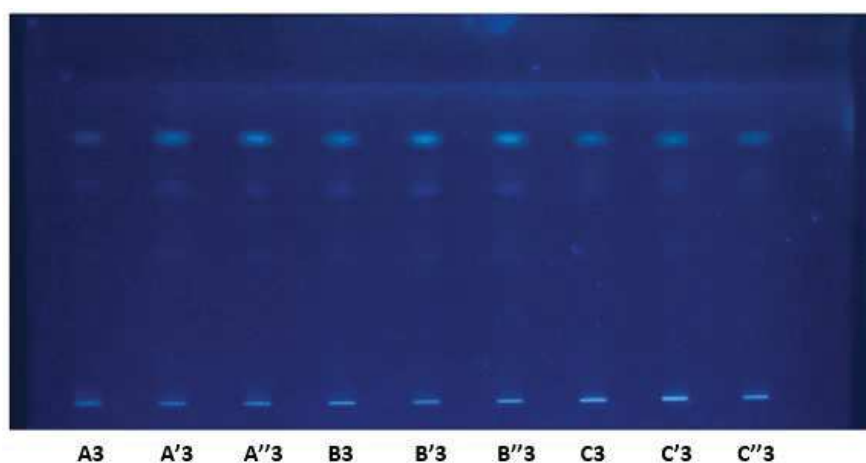
D'après ce tableau, nous notons que les molécules antioxydantes semblent être majoritairement dans les extraits aqueux. Quant aux polyphénols, ils ont été détectés dans les extraits polaires (extraits éthanoliques et aqueux). Les acides aminés sont majoritaires dans les éthanoliques. La chromatographie (CCM) a permis tout d'abord de montrer à travers le révélateur universel ( $H_2SO_4$ ) que les profils sont répétables pour les triplicatas d'extractions de chaque producteur (figure 15). Cela montre que la méthode d'extraction est fiable car les profils sont identiques pour chaque extraction.



*Figure 15 : Profils de la répétabilité des chromatogrammes des extraits apolaires des producteurs A, B et C, révélés au  $H_2SO_4$*

▪ **Caractérisation des polyphénols**

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence des composés phénoliques par le réactif de NEU (fluorescence bleue sous lumière UV à 365 nm) notamment dans les extraits 3 et 4 (alcooliques et aqueux) (figure 16).



*Figure 16 : Révélateur spécifique des composés phénoliques (NEU) : visualisation de composés phénoliques à 360 nm.*

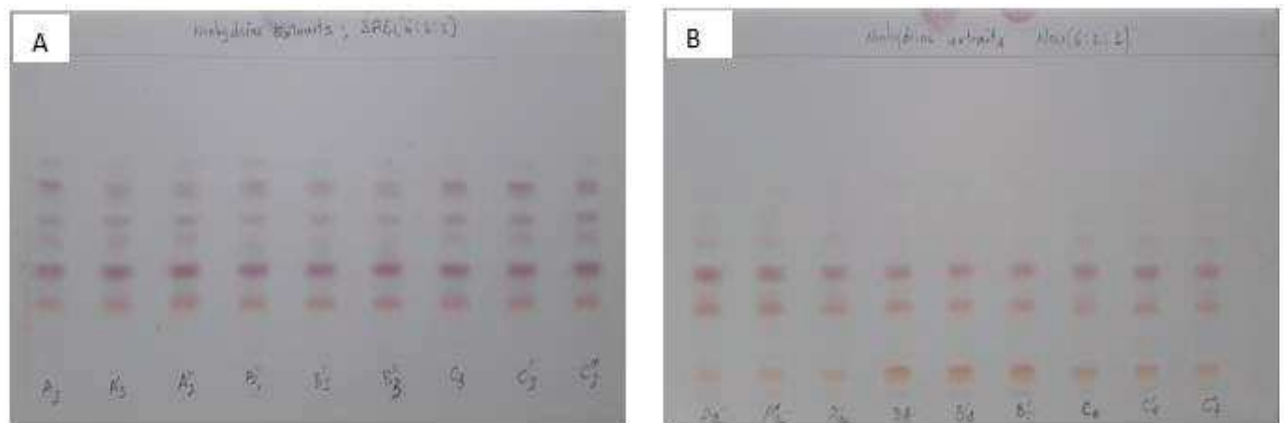
Ces résultats sont attendus par rapport à la nature des composés décrits dans les généralités et par de nombreuses revues scientifiques. L'examen de la figure 16 montre que le producteur B semble avoir des teneurs en composés phénoliques plus importantes que les 2 autres producteurs.

Nous avons tenté d'identifier certains composés témoins à savoir : acide abscissique, acide benzoïque, acide chlorogénique, acide cinnamique, acide férulique, acide gallique, acide  $p$ -hydroxybenzoïque, acide protocatéchique et l'acide  $p$ -coumarique, mais ils n'ont pas été mis en évidence par leur Rf et leur couleur après révélation au Neu dans les extraits. Cette observation pourrait donc signifier qu'il n'y a présence d'aucun de ces composés témoins ou bien en trop petites quantités pour être détectés.

- **Caractérisation des acides aminés**

La figure 17 présente une photographie dans le visible des plaques CCM des acides aminés après révélation spécifique.

La CCM a permis de montrer la présence d'acides aminés dans tous les extraits du champignon (extraits polaires et apolaires) par pulvérisation du révélateur spécifique : la Ninhydrine. Les spots des acides aminés révélés par la ninhydrine sont en taches roses-violettes, qui virent parfois au brun.



**Figure 17 :** CCM des extraits polaires révélés à la Ninhydrine. A) extraits éthanoliques, B) extraits aqueux

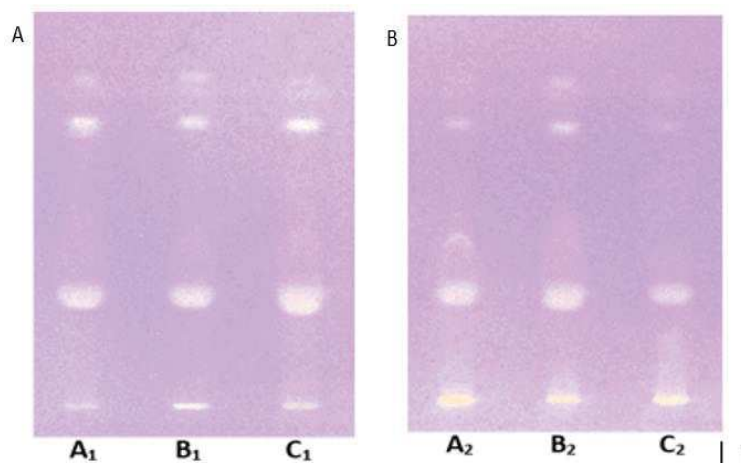
Du point de vue quantitatif, chaque extrait renferme des acides aminés avec des teneurs plus importantes dans les extraits polaires qui semblent en contenir davantage pour tous les répliquas et pour tous les producteurs (A, B, C). Par contre, en comparant les extraits polaires entre eux, on se rend compte que les extraits aqueux sont moins riches en acides aminés par rapport aux extraits éthanoliques.

### ▪ *Caractérisation des molécules antioxydantes*

Les CCM montrent également une activité antioxydante avec une présence de molécules antioxydantes pour chaque extrait grâce aux plaques révélées par la pulvérisation d'une solution de DPPH à 5% dans le méthanol (tableau 15). Après séchage et incubation d'une dizaine de minutes dans l'obscurité, les taches de migration apparaissent à l'œil nu en jaune-clair sur fond violet. Ceci traduit la présence de composés actifs capables de réduire le radical DPPH, donc ayant une activité antioxydante.

Ainsi les substances ayant manifestées une activité anti-radicalaire dans les extraits apolaires peuvent être de l'ergostérol ou du tocophérol. Par contre, dans les extraits polaires, ces molécules antioxydantes peuvent être des polyphénols ou autres substances.

Il faut néanmoins réaliser des tests DPPH sur microplaques de 96 puits car les CCM montrent la présence de molécules antioxydantes pour chaque extrait mais ne permettent pas de visualiser les différences d'intensités. Le test au DPPH sur CCM présente donc un manque de sensibilité qui ne conduit pas à ressortir de différences entre les extraits. En revanche la chromatographie sur couche mince permet de déduire que l'activité antioxydante n'est pas liée uniquement aux composés phénoliques puisqu'elle est présente pour chaque extrait, y compris les apolaires (figure18).



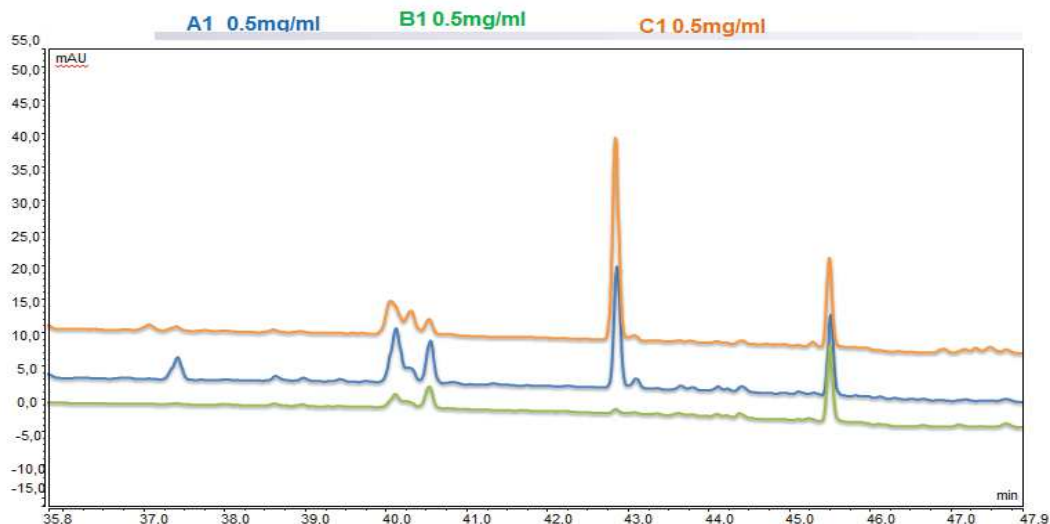
**Figure 18 :** CCM sur plaque de verre des extraits apolaires, éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (90:10) après pulvérisation de DPPH. A) extraits cyclohexaniques, B) extraits chloroformiques

### 2.3 Analyse des chromatogrammes par la chromatographie liquide à haute performance

Parallèlement à la chromatographie sur couche mince, nous avons réalisé une chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). Celle-ci a montré qu'en fonction du solvant

d'extraction utilisé, il y a une variation des profils chez le même producteur. Mais à l'image des CCM, elle montre aussi une répétabilité des profils pour les extractions réalisées avec un même solvant. Ces différents profils observés selon le solvant utilisé pour l'extraction s'expliquent par leur différence de polarité. Des molécules de nature différentes ont été successivement extraites par chaque solvant.

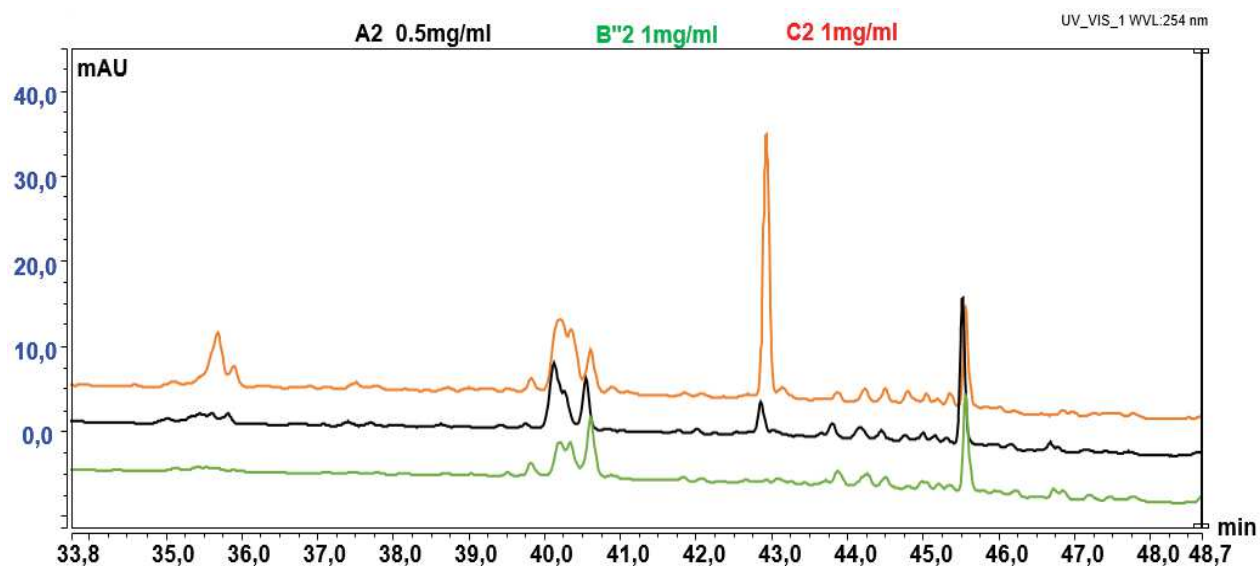
Tous les producteurs ont montrés le même profil dans leurs extraits polaires, par contre on note différence qualitative et quantitative entre les producteurs au niveau de leurs extraits apolaires à une longueur d'onde de 254 nm. Le producteur B est différent de A et C dans les extraits cyclohexaniques à la 43<sup>ème</sup> minute de temps de rétention. A ce temps, nous observons un pic très important qui apparait chez les producteurs A et C, par contre, ce pic est absent ou très petit (à faible intensité) chez le producteur B (figure 19).



**Figure 19 :** Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits cyclohexaniques des trois producteurs (A, B et C) à 254 nm

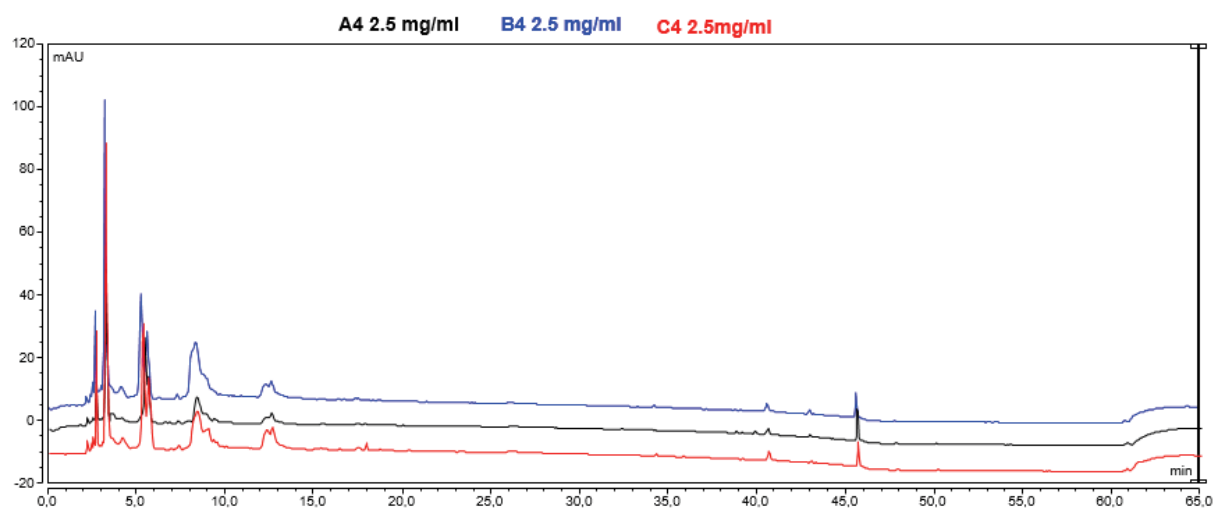
Pour les extraits chloroformiques, c'est le producteur C qui présente une différence par rapport aux autres pour le temps de rétention  $t = 43$  minutes (figures 20). On note que le pic qui apparait à ce temps de rétention, est plus important chez le producteur C par rapport aux 2 autres.

On remarque que, les molécules ayant un caractère apolaire sont plus retenues par la colonne C18 car ayant une affinité avec celle-ci. Par contre celles polaires se verraient moins retenues par la colonne. Donc, elles seront les premiers à être éluées et détectées par le détecteur.



**Figure 20 :** Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits chloroformiques des trois producteurs (A, B et C) à 254 nm.

Quant aux extraits polaires, aucune différence du point de vue qualitative n'a été observée entre les extraits des différents producteurs (figure 21).



**Figure 21 :** Profils chromatographiques en chromatographie liquide haute performance des extraits aqueux des producteurs A, B et C à 254 nm.

## 2.4 Caractérisation des extraits par la chromatographie liquide haute performance

### 2.4.1 Caractérisation des acides phénoliques et de l'acide ascorbique

Tous les extraits des 3 producteurs ont été analysés par la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrette de photodiodes (HPLC-DAD) pour une tentative d'identification et de quantification des composés phénoliques. La plupart des molécules phénoliques ont des maximums d'absorption dans les spectres ultraviolets (UV) à une longueur d'onde de 280 nm, bien que certaines ont une bande d'absorption allant jusqu'à 330 à 360 nm (**Gábor, 2013 ; Alexandre-Tudo et Du Toit, 2018**). Nous avons cherché à les identifier en comparant les temps de rétention et les spectres UV des échantillons avec ceux des témoins. Dix-sept composés phénoliques à savoir : Acide abscissique, acide benzoïque, acide caféique, acide chlorogénique, acide cinnamique, acide férulique, acide gallique, acide gentsique, acide  $\rho$ -hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide  $\rho$ -coumarique, acide sulfosalicylique, acide syringique, acide vanillique, acide vétratrique, et la rutine) ont été analysés (tableau 17). En plus, l'acide ascorbique a également été analysé.

Les profils chromatographiques des extraits 1, 2, et 4 des producteurs A, B et C sont représentés au niveau des figures 19, 20 et 21. L'analyse des résultats et la comparaison des temps de rétention des composés extraits ainsi que leurs spectres UV avec ceux des différents standards ne nous a permis que de suspecter la présence éventuelle dans les extraits polaires (éthanoliques et aqueux) de tous les producteurs d'un seul composé à savoir : l'acide ascorbique. Cette molécule apparaît à 3,24 minutes avec un pic très petit probablement à cause de sa concentration qui est très faible dans les extraits.

Pour les profils chromatographiques de tous les autres témoins testés, leurs temps de rétention et leurs spectres UV ne correspondaient à aucun pic des extraits des 3 producteurs. Ceci dit, ces composés phénoliques testés étaient absents ou leurs teneurs étaient très bas dans les champignons analysés pour être détectés. Étant donné que les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, leur production pourrait être influencée par les conditions associées à la croissance du champignon, ce qui pourrait expliquer les différences entre les différents échantillons et les différentes origines.



**Tableau 17 :** Identification et quantification des composés phénoliques des extraits des producteurs A, B et C déterminée par HPLC-DAD.

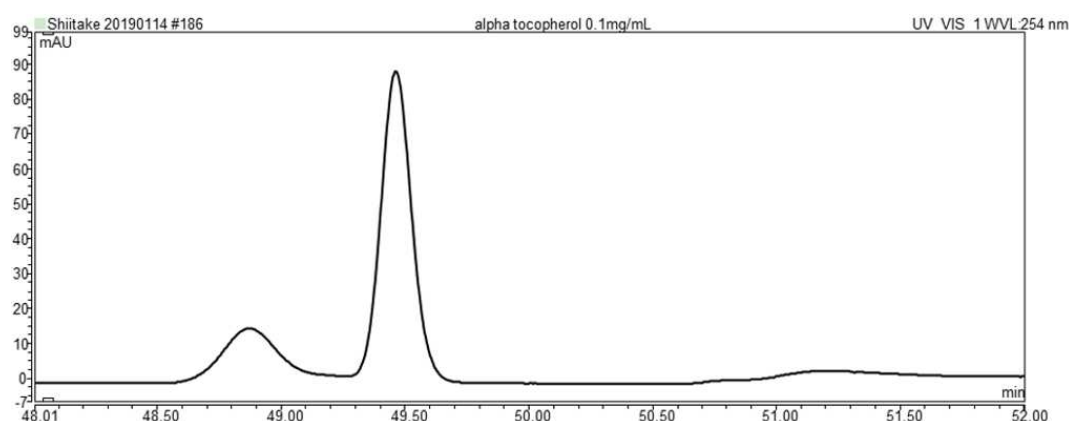
Témoins testés	Tr (min)	λ max (nm)	Présence potentielle dans les extraits (Comparaison des Tr et des spectres UV)											
			Producteur A				Producteur B				Producteur C			
			Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4	Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4	Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4
Acide abscissique	25,19	261,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acide ascorbique</b>	<b>3,24</b>	<b>206,25</b>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Acide benzoïque	22,05	273,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide caféique			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide chlorogénique	3,22	322,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide cinnamique	26,66	279,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide férulique	20,63	322,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide gallique	8,05	270,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide gentisique	13,56	326,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide p-hydroxybenzoïque	14,64	255,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide protocatéchique	11,39	259,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide p-coumarique	19,90	309,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide Sulfosalicylique	2,86	299,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide synapique	20,86	323,17												
Acide syringique	17,46	274,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide vanillique	16,38	260,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide vératrique	20,85	260,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rutine	22,6	355	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 2.4.2 Identification de l' $\alpha$ -tocophérol

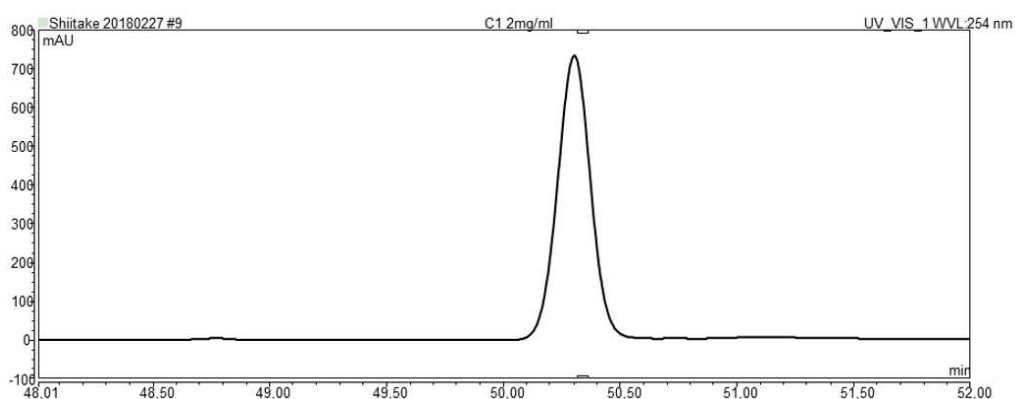
L' $\alpha$ -tocophérol a été analysé avec la même méthode que celle utilisée pour les extraits afin de vérifier sa présence dans les extraits cyclohexaniques et chloroformiques.

Les résultats montrent que l' $\alpha$ -tocophérol a été élué avec un temps de rétention de 49,5 minutes (figure 22). On observe également un pic minoritaire à 48,9 min correspondant certainement à un composé de dégradation de l' $\alpha$ -tocophérol. L'examen du spectre UV confirme effectivement que le pic qui est apparu à 49,5 min est bien la molécule de l' $\alpha$ -tocophérol ( $\lambda$  max = 292 nm).

Par contre, l'observation des chromatogrammes des extraits cyclohexaniques et chloroformiques, montre un pic avec un temps de rétention de 50,30 min qui est différent de celui observé pour l' $\alpha$ -tocophérol. Ce résultat donc, ne nous a pas permis de confirmer la présence effective de l' $\alpha$ -tocophérol dans ces extraits apolaires (figure 23).



**Figure 22:** Chromatogramme de l' $\alpha$ -tocophérol. On observe un pic majoritaire à 49,5 min ( $\alpha$ -tocophérol) et un autre à 48,9 min correspondant à un produit de dégradation.

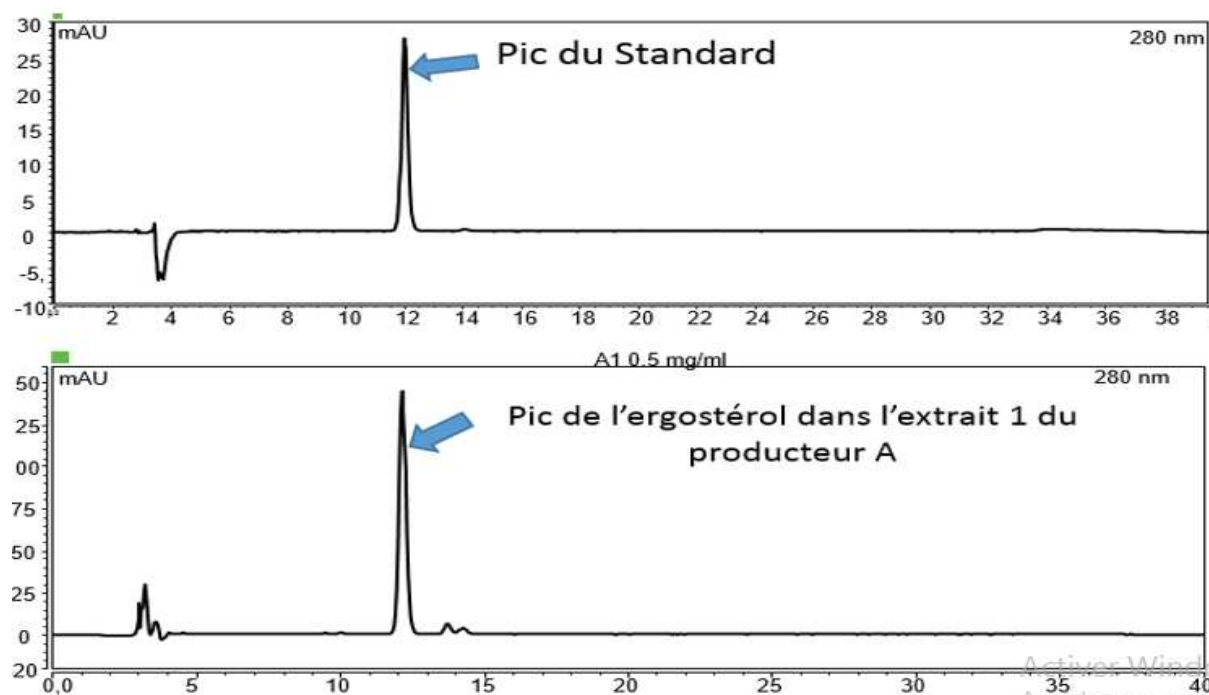


**Figure 23 :** Chromatogrammes de l'extrait C1 (identique pour cette portion à ceux des autres extraits).

### 2.4.3 Identification et quantification de l'ergostérol

L'identification et la quantification de l'ergostérol ont été faites uniquement dans les extraits 1, 2 et 3. En effet, les extraits 4 n'en contiennent pas (ergostérol non détecté à 10 mg/ml), donc la teneur est nettement inférieure à 0.001 mg/extrait.

En raison de son absorption dans l'ultraviolet (UV), l'ergostérol a été identifié à 280 nm en comparant son temps de rétention (12 minutes) et son spectre UV à celui du témoin (figure 24).



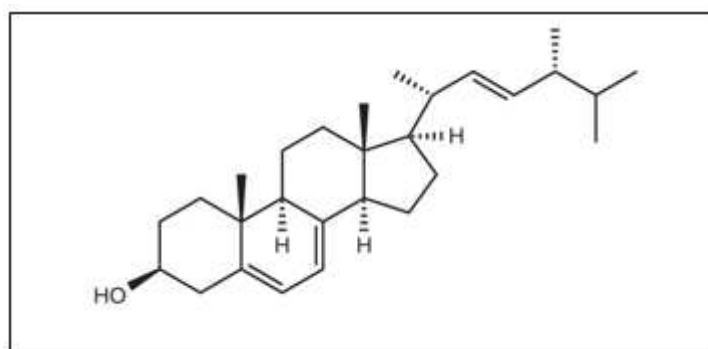
**Figure 24 :** Chromatogramme de l'ergostérol dans l'extrait 1 du producteur A et du standard avec un temps de rétention à 12 minutes.

Les résultats montrent que les extraits cyclohexaniques contiennent des quantités plus importantes en ergostérol avec 0,169 ; 0,183 et 0,235 mg/extrait respectivement pour le producteur A, B et C. Ils sont suivis sans surprise par les extraits chloroformiques. En comparant les producteurs entre eux, on constate que c'est le producteur C qui possède la teneur la plus élevée au niveau des extraits cyclohexaniques. Par contre pour les extraits chloroformiques c'est le producteur B qui en contient d'avantage.

En terme de quantité totale d'ergostérol, le tableau N° 18 montre que le producteur B (478,20 mg/100g de poids sec) renferme une teneur significativement plus élevée que le producteur A (294,44 mg/100g de poids sec) et C (341,28 mg/100g de poids sec). Ces données sont comparables à ceux rapportés par **Hammann et al. (2016)** qui mentionnent 351 mg/100g de

poids sec. Par contre, elles sont nettement inférieures aux valeurs trouvées par **Jasinghe & Perera. (2005)** et **Mattila *et al.* (2002)** qui ont observé respectivement une teneur de 605 mg/100g de poids sec et 679 mg/100g de poids sec. L'ergostérol se trouve dans toutes les parties du champignon, notamment le stipe et le sporophore, mais il s'accumule d'avantage dans le sporophore (**Jasinghe & Perera, 2005 ; Yuan *et al.*, 2008**). Il est connu pour être un inhibiteur efficace des radicaux libres et des travaux scientifiques antérieurs ont montrés une corrélation entre les propriétés antioxydantes et la quantité d'ergostérol contenue dans les champignons (**Shao *et al.* 2010**). Par contre, dans cette étude, cette corrélation n'est pas mise en évidence.

L'ergostérol est le stérol (figure 25) le plus abondant rencontré dans le règne des fungi représentant 70% des stérols totaux (**Rodrigues, 2018**) et possède une structure voisine de celle du cholestérol (**Kuo *et al.*, 2011**). Sa synthèse se passe au niveau du réticulum endoplasmique du champignon par l'action conjuguée d'une vingtaine d'enzymes. Compte tenu de la diversité et du nombre d'enzymes qui participent à sa synthèse, cette molécule est devenue à ce jour une cible privilégiée et convoitée dans la fabrication des médicaments antifongiques (**Dhingra & Cramer, 2017**). Sa concentration varie selon l'espèce et l'état physiologique du champignon (**Chiocchio & Matković, 2011**). Les données scientifiques récentes ont prouvées qu'hormis son potentiel antioxydant important (**Shao *et al.*, 2010**), l'ergostérol exerce un important effet anti-inflammatoire avec inhibition de la production de certaines cytokines comme le TNF $\alpha$  (**Kuo *et al.*, 2011**).



**Figure 25 : Formule chimique de la molécule d'ergostérol (Kuo *et al.*, 2011)**

Lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets, l'ergostérol subit une décomposition par la lumière appelée « photolyse » le permettant de se transformer en plusieurs molécules, notamment : le lumistérol, le tachystérol et la pré-vitamine D2. A travers un réarrangement spontané, la pré-vitamine D2 passe directement en vitamine D2 (ergocalciférol). En dehors des champignons, cette vitamine se trouve également dans les végétaux. Par contre la forme D3 (cholécalfiérol),

n'est présente que dans les produits animaux (**Jasinghe & Perera, 2005 ; Ko *et al.*, 2008 ; Banlangsawan & Sanoamuang, 2016**). L'importance de la vitamine D dans l'organisme humain n'est plus à démontrer car, elle joue le rôle de régulateur du métabolisme du calcium et du phosphore, facilite leur absorption au niveau de l'intestin et contribue à la minéralisation des os et des dents (**Ko *et al.*, 2008**).

Des études récentes ont mis en évidence que l'ergostérol est largement impliqué dans l'induction de la pyroptose (forme de mort cellulaire programmée avec de production des cytokines pro-inflammatoires). C'est ce qui justifie aussi son importance dans le domaine immunologique (**Boucher *et al.*, 2016 ; Koselny *et al.*, 2018**). Selon **Banlangsawan & Sanoamuang (2016)**, les apports quotidiens recommandés de la vitamine D est de (5-10 µg / jour). Une carence prononcée est associée à la fragilité des os et des dents, du rachitisme (pour les enfants) et l'apparition de l'ostéoporose qui touche généralement les personnes âgées.

**Tableau 18 : Quantité d'ergostérol dans les extraits des trois producteurs.**

Producteur	Extraits	Concentration (mg ergostérol/mg d'extrait)	Masse ergostérol (mg/100g poids sec)
A	Extrait 1	0,169 ± 0,012	294,43
	Extrait 2	0,095 ± 0,006	
	Extrait 3	0,001 ± 0,001	
	Extrait 4	< 0.001	
B	Extrait 1	0,183 ± 0,016	478,21
	Extrait 2	0,15 ± 0,019	
	Extrait 3	0,002 ± 0,001	
	Extrait 4	< 0.001	
C	Extrait 1	0,235 ± 0,016	341,29
	Extrait 2	0,093 ± 0,013	
	Extrait 3	0,001 ± 0,001	
	Extrait 4	< 0.001	

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± écart type (n = 3 expériences indépendantes).

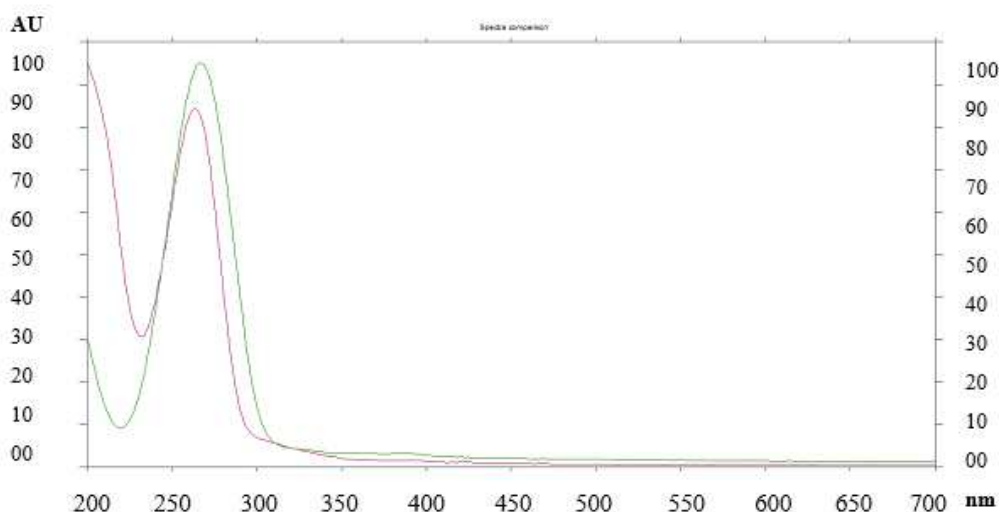
## 2.5 Caractérisation des extraits par chromatographie sur couche mince

### 2.5.1 Identification de l'acide ascorbique

Comme les résultats issus de la chromatographie en phase liquide à haute performance a permis de suspecter la présence éventuelle de l'acide ascorbique dans les extraits polaires (éthanoliques et aqueux) de tous les producteurs mais sans donner une certitude à 100% à cause de la faiblesse de la concentration utilisée (5 mg/ml). Sachant qu'en injectant une concentration supérieure à 5 mg/ml allait encastrier ou boucher la colonne, nous avons décidé de tourner vers la chromatographie sur couche mince en utilisant une concentration de 10 mg/ml avec un dépôt de 20 µl pour charger d'avantage la plaque afin de ressortir et de détecter aisément l'acide ascorbique suspecté (s'il existe).

Pour cela, après dépôt des échantillons et élution de la plaque, le réactif de détection a été pulvérisé. Quelques minutes après, les taches commencent à apparaître même à la lumière du jour, mais elles sont plus prononcées en les observant sous la lampe UV.

Après le scannage de la plaque, les Rf des tous les composés apparus ainsi que leur spectre UV ont été recueillis. L'examen et la comparaison des Rf et des spectres UV (figure 26), montre que la molécule à un Rf = 0,8 est bien l'acide ascorbique.



*Figure 26 : Spectre UV de l'acide ascorbique et des extraits*

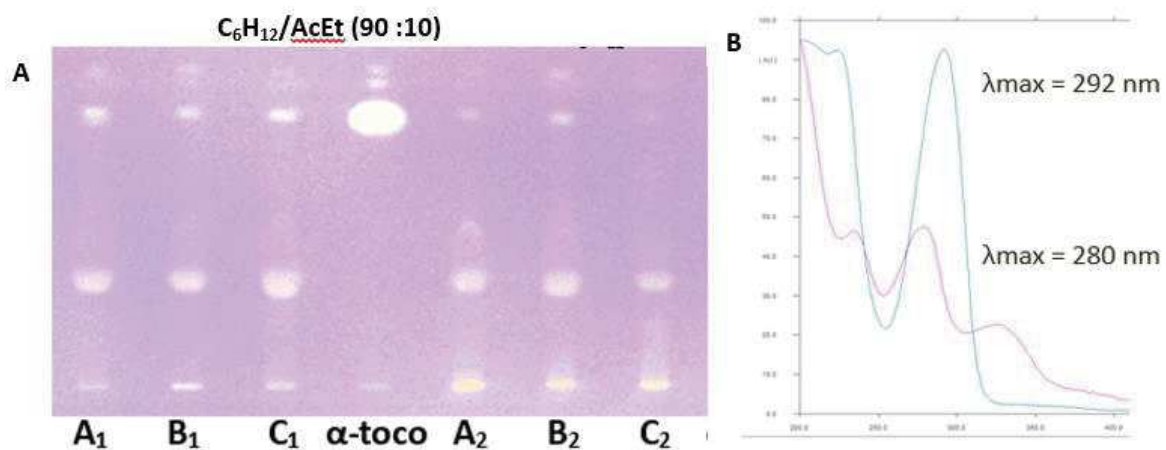
L'acide ascorbique est une vitamine hautement soluble dans l'eau. L'un des rôles majeurs de cette molécule est son implication dans la protection des tissus des mammifères contre les dommages oxydatifs aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. C'est aussi un agent potentiel

qui agit contre le vieillissement cellulaire et les maladies dégénératives (Kalalselvi *et al.*, 1996). Sa concentrations dans les champignons dépend du stade de maturation de la fructification, du génotype, des conditions météorologiques et géographiques (López-Vázquez *et al.*, 2017). Cette molécule antioxydante ne peut pas être synthétisée par l'homme. Elle doit être obligatoirement apportée par l'alimentation pour satisfaire les besoins de l'organisme.

### 2.5.2 Identification de $\alpha$ -tocophérol

En parallèle de la chromatographie en phase liquide et le test de DPPH, nous avons réalisés pour les extraits apolaires (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> et C<sub>2</sub>) des chromatographies sur couche mince en utilisant l' $\alpha$ -tocophérol comme témoin. Une solution de DPPH a été pulvérisée sur les plaques pour révéler les composés antioxydants. Après observation de la plaque, l' $\alpha$ -tocophérol réagit avec un délai de quelques minutes. Plusieurs autres molécules antioxydantes sont mises en évidence dans les extraits (figure 27).

À la première vue, les résultats montrent la présence probable de l' $\alpha$ -tocophérol dans les extraits (figure 27). Cependant, un examen approfondi des spectres UV montre que le composé qui sort au même Rf que l' $\alpha$ -tocophérol est en fait une autre molécule différente de l' $\alpha$ -tocophérol. Ce qui infirme l'hypothèse avancée au début. Ce résultat a été obtenu dans le cadre d'un stage de master réalisé par Chambaud MARINE.

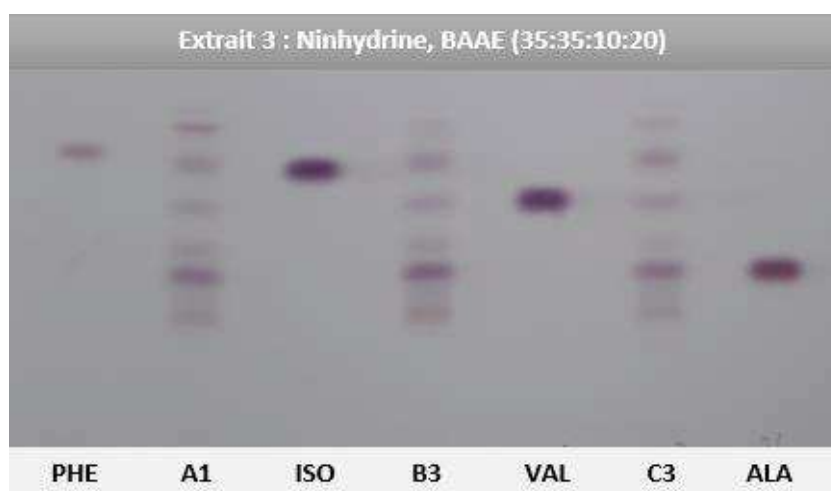


**Figure 27 :** A) Chromatographies sur couche mince des extraits apolaires des producteurs A, B et C utilisant l' $\alpha$ -tocophérol comme témoins. B) Comparaison des spectres UV des composés détectés en CCM: Au Rf = 0,73 de l' $\alpha$ -tocophérol (en vert,  $\lambda_{max}=292$  nm) et au Rf = 0,74 des extraits (en violet,  $\lambda_{max}=280$  nm).

### 2.5.3 Identification, séparation et quantification des acides aminés

Dans le but de développer un éluant efficace pour la séparation des molécules cibles, nous avons utilisé plusieurs combinaisons de phase mobile notamment : BAAE (40: 30: 15:15), BAAE (35: 35: 10: 20), BAE (50: 10: 40) et BAE (60: 20: 20). Ces phases mobiles testées ont été choisies en se basant sur des travaux antérieurs réalisant des séparations similaires dans d'autres matrices alimentaires (**Wagner *et al.*, 1984 ; Devi *et al.*, 2014**). Nous avons constaté que le système BAAE (35: 35: 10: 20) et BAE (60: 20: 20) donnaient la meilleure séparation, avec des spots symétriques et reproductibles des acides aminés.

La CCM a permis de montrer la présence d'acides aminés dans tous les extraits du champignon par pulvérisation du révélateur spécifique : la Ninhydrine. Chaque extrait en contient mais les extraits éthanoliques semblent en posséder plus que les autres dans tous les producteurs (figure 28). Raison pour laquelle nous avons décidé d'orienter l'identification et le dosage des acides aminés dans ces extraits éthanoliques. Tous les spots des acides aminés révélés dans les échantillons après la pulvérisation de la ninhydrine, avaient une coloration rouge violette ou rouge brune (figure 28).



**Figure 28** : Identification des acides aminés (Isoleucine, Valine et Alanine) par CCM avec révélation à la Ninhydrine

Pour l'identification, au total 12 témoins ont été recherchés dans les extraits alcooliques du Shiitake à savoir : Acide aspartique, Acide glutamique, Alanine, Arginine, Glycine, Histidine, Isoleucine, Méthionine, Phénylalanine, Sérine, Thréonine et Valine (tableau 19). Par comparaison des  $R_f$  et des spectres UV (pour la phénylalanine et l'histidine) des échantillons avec ceux des composés témoins, trois acides aminés ont pu être mis en évidence et quantifiés suite au scannage de la plaque de la CCM. Il s'agit de deux acides aminés essentiels (Valine et Isoleucine) et un acide aminé non essentiel l'alanine.



**Tableau 19 :** Acides aminés identifiés par chromatographie sur couche mince.

Témoins	Producteur A	Producteur B	Producteur C
Acide aspartique	-	-	-
Acide glutamique	-	-	-
Alanine	+	+	+
Arginine	-	-	-
Glycine	-	-	-
Histidine	-	-	-
Isoleucine	+	+	+
Méthionine	-	-	-
Phénylalanine	-	-	-
Sérine	-	-	-
Thréonine	-	-	-
Valine	+	+	+

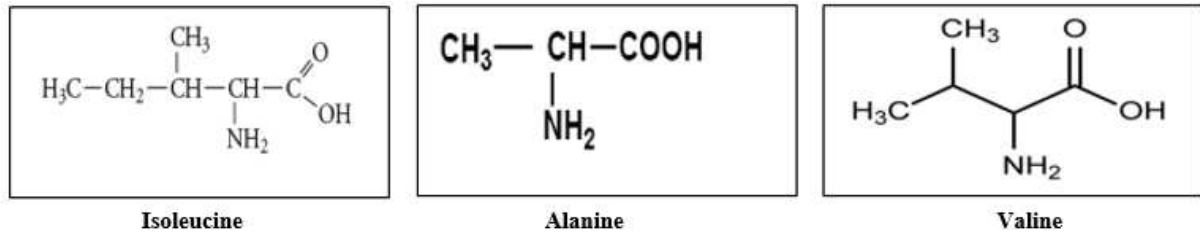
S'agissant de la quantification, les résultats montrent que le contenu en acides aminés varie de 5,92 à 8,21 µg/mg d'extrait pour l'alanine, 3,71 à 5,17 µg/mg d'extrait pour la valine et 5,42 à 7,29 µg/mg d'extrait pour l'isoleucine pour l'ensemble des producteurs.

**Tableau 20 :** Teneur en acides aminés dans les extraits.

Producteurs	Extraits	Concentration (µg/mg d'extrait)		
		Alanine Rf = 0,40	Valine Rf = 0,56	Isoleucine Rf = 0,66
A	Extrait 3	8,21 ± 0,46	3,77 ± 0,28	5,42 ± 0,17
B	Extrait 3	8,53 ± 0,25	3,71 ± 0,15	7,29 ± 0,97
C	Extrait 3	5,92 ± 0,50	5,17 ± 0,60	6,19 ± 0,71

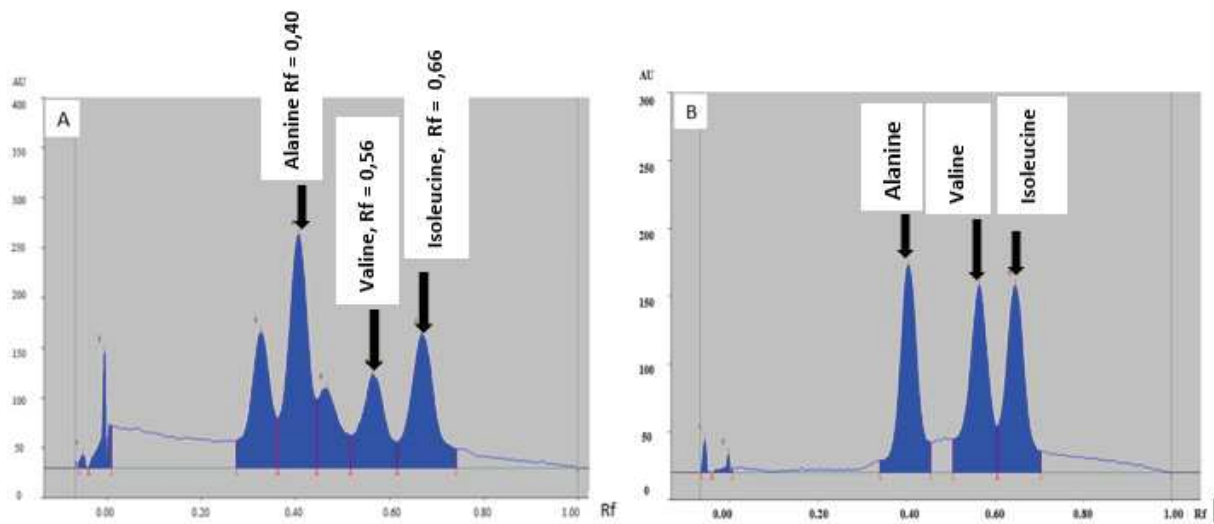
Les résultats sont la moyenne ± écart type de 3 expériences indépendantes

Le tableau 20 montre que les producteurs A et B possèdent des teneurs plus élevées en Alanine (8,21 et 8,53 µg/mg d'extrait). Par contre la teneur en isoleucine est plus importante chez le producteur Bio que les 2 autres.



**Figure 29 :** Formules des acides aminés identifiés par chromatographies sur couche mince dans les extraits éthanoliques des producteurs A, B et C.

Ces acides aminés (figure 29) sont des molécules organiques ayant un rôle vital pour l'organisme. Par exemple, l'alanine participe au métabolisme des sucres et potentialise le système immunitaire. Quant à la valine, elle est véritablement impliquée dans non seulement la régulation de la glycémie mais aussi dans la réparation des tissus endommagés (**Devi et al., 2014**). Leur carence provoque généralement des troubles psychologiques. D'où l'importance de leur présence dans un régime alimentaire.



**Figure 30 :** Chromatogrammes: A) de l'extrait éthanolique, B) des standards observés à 254

nm

## 2.6 Teneur en polyphénols totaux

Pour le dosage des polyphénols totaux, le réactif de Folin-Ciocalteu (F.C) a été utilisé. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de F.C qui est de couleur jaune. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune et virant au bleu lorsqu'il est réduit par les phénols. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 650 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques. Les résultats pour chaque producteur sont consignés dans le tableau suivant (tableau 21):

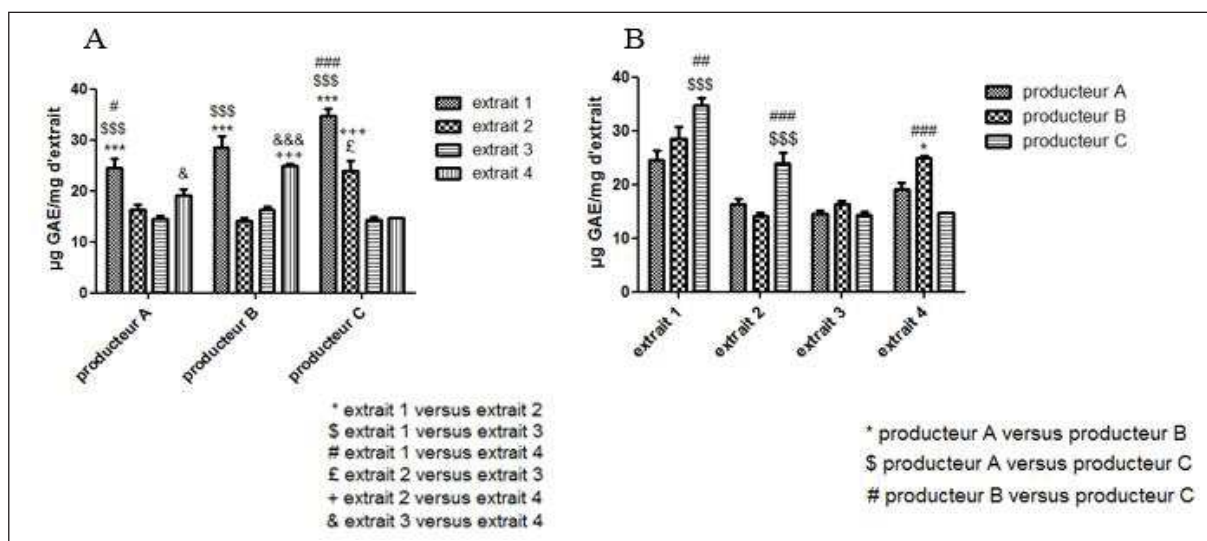
**Tableau 21** : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de chaque producteur en  $\mu\text{g}$  GAE/mg d'extrait

Producteur	Extrait	Dosage du Folin Ciocalteu $\mu\text{g}$ GAE/mg d'extrait
A	Extrait 1	24,47 $\pm$ 3,24
	Extrait 2	16,24 $\pm$ 1,9
	Extrait 3	14,53 $\pm$ 1,19
	Extrait 4	19,18 $\pm$ 2,05
B	Extrait 1	28,50 $\pm$ 3,79
	Extrait 2	14,21 $\pm$ 0,76
	Extrait 3	16,29 $\pm$ 1,21
	Extrait 4	24,87 $\pm$ 0,94
C	Extrait 1	34,78 $\pm$ 2,48
	Extrait 2	23,96 $\pm$ 3,29
	Extrait 3	14,29 $\pm$ 1,10
	Extrait 4	14,71 $\pm$ 0,18
Extrait éthanolique de Romarin		47,7 $\pm$ 6,94

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $n = 3$  expériences indépendantes).

Ces résultats exprimés en équivalent d'acide gallique ont montré qu'à 1 mg/ml, l'ensemble des extraits possède une teneur inférieure au témoin utilisé (extrait éthanolique de Romarin). Les extraits cyclohexaniques ont la teneur la plus élevée quel que soit le producteur. Ils sont suivis par les extraits aqueux chez les producteurs A et B (19,18  $\mu\text{g}$  de GAE/mg d'extrait et 24,87  $\mu\text{g}$  de GAE/mg d'extrait respectivement) et l'extrait chloroformique pour le producteur C avec 24,87  $\mu\text{g}$  de GAE/mg d'extrait. Il n'y a pas de différence significative entre les extraits 1, 2 et 3 des producteurs A et B (Figure 31 A). On remarque aussi que les extraits 1 et 2 du producteur

C en contiennent plus que ceux de A et B. Les extraits 1 et 4 du producteur B contiennent une teneur en polyphénols plus importante que les extraits 2 et 3 des deux autres producteurs (A et C).



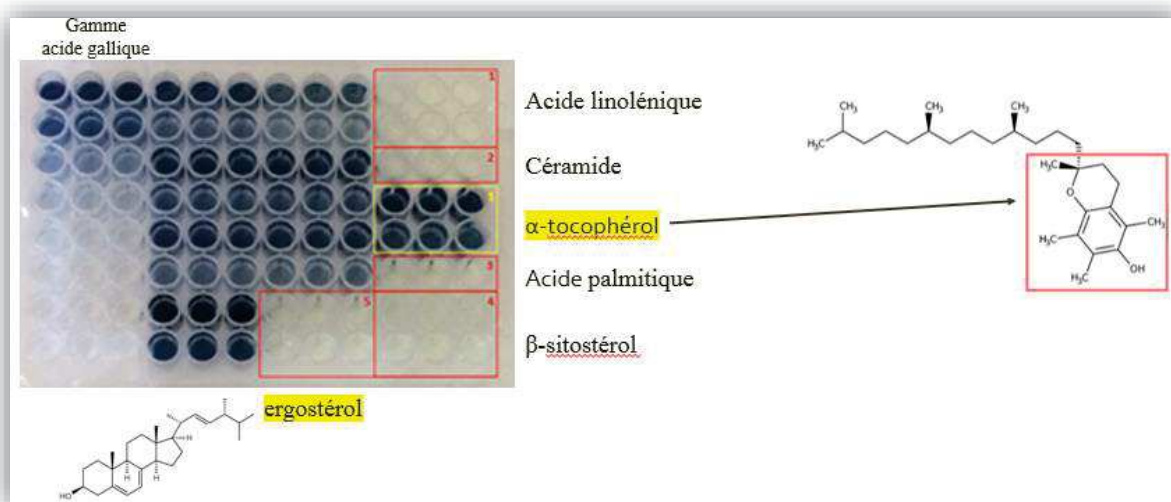
**Figure 31** : Teneur en polyphénols. A) en fonction des producteurs, B) en fonction des extraits. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$  expériences indépendantes)

En comparant les producteurs entre eux du point de vue statistique, aucune différence significative entre les producteurs A et B quelques soit l'extrait apolaire utilisé n'est observée. Par ailleurs, le producteur C, a une différence significative par rapport aux 2 autres dans tous les extraits, sauf celui éthanolique et aqueux où, ils sont tous identiques statistiquement (Figure 31 B).

Théoriquement le contenu phénolique devrait donner des résultats significativement plus élevés pour les extraits 3 et 4 car les composés phénoliques sont réputés être solubles dans les solvants polaires et y sont majoritaires. Or les résultats de ce test montrent des valeurs plus élevées dans les extraits 1 pour les 3 producteurs (Figure 31A et 31B). Ces résultats s'expliquent par les faux positifs susceptibles d'interférer avec le test de mesure de la teneur en phénols. En effet, le réactif de Folin-Ciocalteu réagit également avec certains composés azotés, thiols, vitamines, bases nucléotidiques et hydrates de carbone (Everette *et al.*, 2010). Comme les résultats montrent une teneur des extraits apolaires (cyclohexaniques et chloroformiques) qui laisse supposer la présence de phénoliques apolaires ou de faux positifs dans ces extraits, nous avons testé quelques molécules à caractères apolaires fréquemment retrouvées dans les extraits de champignons notamment : l' $\alpha$ -tocophérol, l'acide linoléique, l'ergostérol, le  $\beta$ -sitostérol, la

céramide et l'acide palmitique pour voir si elles réagissent avec le Folin pour justifier cette teneur observée particulièrement dans les extraits cyclohexaniques.

Le test donne deux types de résultats pour les composés apolaires testés : Pour la majorité (l'acide linoléique, l'ergostérol, le  $\beta$ -sitostérol, la céramide et l'acide palmitique), on observe un précipité blanc (figure 32) dû à la recristallisation des composés à l'ajout de la solution aqueuse de Folin-Ciocalteu. Ce précipité crée une interférence lors de la lecture de la plaque et donc un faux positif. Par contre, l' $\alpha$ -tocophérol réagit au test (Figure 32), ce qui est logique et normale car le noyau 6-chromanol est très proche de la structure d'un phénol. Nos résultats pour l'ergostérol sont appuyés par la corrélation (pour les extraits 1) entre son dosage par HPLC et le résultat au test de Folin.



**Figure 32 :** Test de quelques molécules polaires avec le Folin Ciocalteu. En rouge : 1=acide linoléique, 2=céramide, 3=acide palmitique, 4= $\beta$ -sitostérol, 5=ergostérol. En jaune : 1=  $\alpha$ -tocophérol

Ces résultats, montrent que l'ergostérol apparaît comme un faux positif, dont la présence dans les extraits apolaires surestime les valeurs obtenues précédemment lors du test de Folin.

## 2.7 Activité antioxydante des extraits

### 2.7.1 Activité antioxydante des extraits du Shiitake

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle, unique et fiable par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'une molécule ou d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, il est nécessaire le plus

souvent de combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une idée plus ou moins précise sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Cao et Prior, 1998). Dans cette présente étude, nous avons préféré la méthode DPPH et ORAC et avons fait le choix d'exprimer les résultats en micromoles de trolox équivalent par g d'extrait ( $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait) et en  $\text{EC}_{50}$  (uniquement pour le DPPH) (tableau 22). La valeur la plus élevée correspondra à l'activité la plus forte.

**Tableau 22:** *Activité antioxydante des extraits des producteurs A, B et C dans différents solvants d'extraction.*

Producteurs	Extraits	DPPH			ORAC
		$\text{EC}_{50}$ (mg/ml)	% d'inhibition	$\mu\text{mol TE/g}$ d'extrait sec	$\mu\text{mol TE/g}$ d'extrait sec
A	Extrait 1	> 1	$18 \pm 1,97$	$25,88 \pm 2,97$	$520 \pm 44$
	Extrait 2	> 1	$16,37 \pm 0,25$	$21,7 \pm 1,12$	$442 \pm 28$
	Extrait 3	> 1	$17,6 \pm 1,45$	$26,63 \pm 3,40$	$494 \pm 11$
	Extrait 4	> 1	$25,23 \pm 5,95$	$34,73 \pm 4,89$	$684 \pm 90$
B	Extrait 1	> 1	$10,03 \pm 1,77$	$12,88 \pm 1,69$	$549 \pm 26$
	Extrait 2	> 1	$12,41 \pm 1,13$	$16,94 \pm 1,16$	$578 \pm 52$
	Extrait 3	> 1	$17,16 \pm 1,65$	$22,78 \pm 1,34$	$528 \pm 77$
	Extrait 4	> 1	$18,4 \pm 1,89$	$25,82 \pm 0,47$	$749 \pm 65$
C	Extrait 1	> 1	$11 \pm 0,36$	$15,52 \pm 1,44$	$752 \pm 38$
	Extrait 2	> 1	$8,7 \pm 0,94$	$11,54 \pm 1,55$	$859 \pm 38$
	Extrait 3	> 1	$10,31 \pm 1,09$	$14,01 \pm 1,36$	$747 \pm 49$
	Extrait 4	> 1	$24 \pm 2,05$	$30,64 \pm 3,52$	$892 \pm 36$
<i>Rosmarinus officinalis</i>		$0,32 \pm 0,02$	nd	$261,67 \pm 1,13$	$2560 \pm 374$
Acide chlorogénique		nd	nd	$3077,4 \pm 225,07$	$11515 \pm 1721$

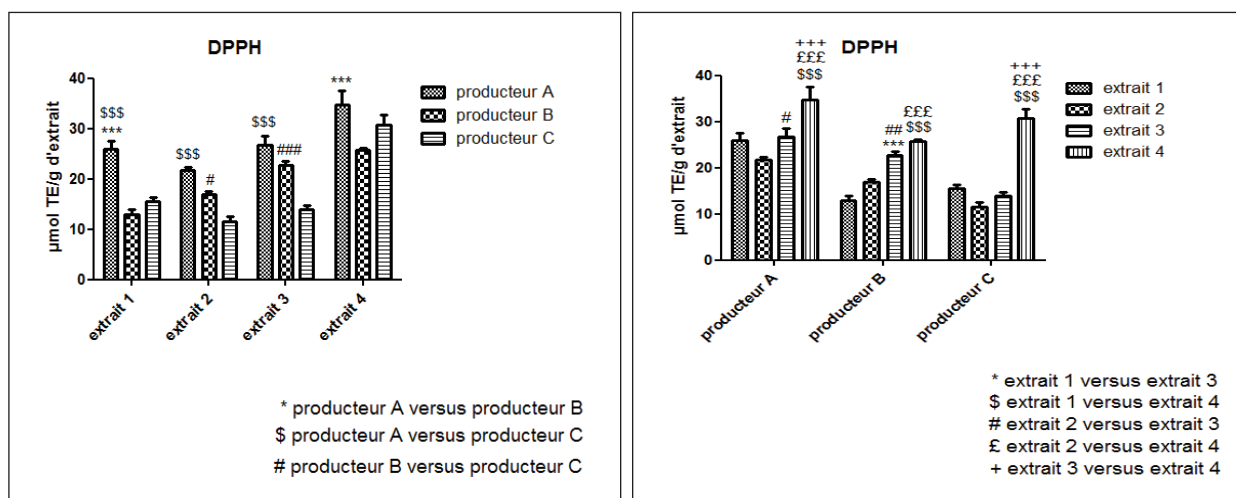
Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type (n = 3 expériences indépendantes).

### 2.7.2 2,2 diphenyle-1-picryl-hydrazyl (DPPH)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH sont exprimés en équivalents Trolox (TE). Le Trolox est un antioxydant reconnu et sert ici de référence. Les extraits testés présentent une activité antioxydante modeste variant entre ( $11,54$  à  $34,73 \mu\text{mol TE/g}$  d'extrait) soit dix fois inférieure au témoin de Romarin ( $261,67 \text{ TE}$ ) qui est également un antioxydant reconnu.

Dans l'ensemble, tous les extraits (1, 2, 3 et 4) montrent une activité antioxydante (Figure 33) mais les extraits aqueux (extraits 4) sont globalement supérieurs aux autres de 25,82 pour le producteur B à 34,73  $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait pour le producteur A, ils sont suivis par l'extrait 3 (26,63  $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait) et l'extrait 1 (25,83  $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait) du producteur A. Les extraits chloroformiques et éthanoliques du producteur C possèdent les valeurs les plus petites avec 11,54  $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait pour chacun (tableau 22).

Entre les producteurs, les résultats montrent clairement que le producteur A est plus antioxydant que les producteurs B et C quel que soit l'extrait et est statistiquement différent par rapport aux autres producteurs. Cependant il n'y a pas de différence significative entre le producteur A et B dans leurs extraits éthanoliques (26,63 ; 22,78  $\mu\text{mol TE/g}$  d'extrait, respectivement) (Figure 33). Pour le producteur B, l'activité antioxydante augmente proportionnellement avec la polarité des extraits, contrairement aux deux autres producteurs. L'activité antioxydante observée pour ce test confirme les résultats des tests antioxydants sur CCM et permet d'évaluer des différences quantitatives.



**Figure 33 :** Activité antioxydante des extraits des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$  expériences indépendantes). \*\*\* $p<0.001$  pour producteur A versus producteur B; \$\$\$ $p<0.001$  pour producteur A versus producteur C; # $p<0.05$ , ### $p<0.001$  pour producteur B versus producteur C.

L'ergostérol qui a été dosé par la chromatographie liquide à haute performance ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol qui a réagi au réactif de Folin Ciocalteu ont été testés avec le DPPH pour voir si ces composés pouvaient expliquer les activités observées dans les extraits apolaires.

Pour l'ergostérol, on obtient un EC<sub>50</sub> de 3,5 mg/ml (tableau 23), soit 0,115 mg/μg de DPPH. Ce résultat est comparable à celui obtenu par **Shao *et al.* (2010)** qui mentionne 0,112 mg/μg de DPPH. Cette EC<sub>50</sub> étant élevée, le potentiel antioxydant de l'ergostérol est trop faible pour être responsable des résultats trouvés dans les extraits apolaires des 3 producteurs. Il faut noter que certaines publications établissent une corrélation entre la concentration en ergostérol et les résultats de leur test au DPPH (**Shao *et al.*, 2010**).

Pour l'α-tocophérol, on obtient un EC<sub>50</sub> de 0.05 mg/ml (tableau 23), ce qui correspond à un potentiel antioxydant élevé. Ce n'est pas surprenant, puisque l'activité antioxydante de l'α-tocophérol est reconnue (**Heleno *et al.*, 2015**). Ce résultat signifie que si l'α-tocophérol est bien présent dans les extraits cyclohexaniques et chloroformiques des producteurs, il peut être en grande partie responsable de ses résultats au test de DPPH enregistrés précédemment. Alors, pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons cherché à identifier la molécule de l'α-tocophérol par CLHP et CCM dans la section *Caractérisation des extraits*.

Comme l'observation des chromatogrammes des extraits cyclohexaniques et chloroformiques à la page 96, ne nous a pas permis de confirmer la présence effective de l'α-tocophérol dans ces extraits apolaires, ça veut dire que l'α-tocophérol ne peut pas expliquer le potentiel antioxydant des extraits apolaires. Mais, pourrait être lié à une autre catégorie de molécules.

**Tableau 23** : Résultats test DPPH (EC<sub>50</sub> de l'ergostérol et de l'α-tocophérol).

Molécules	Ergostérol	α-tocophérol
EC <sub>50</sub> (mg/ml)	3.500 ± 0.398	0.047 ± 0.012

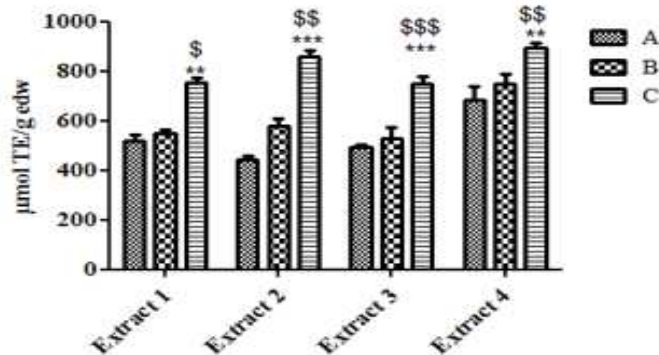
Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± écart type (n = 3 expériences indépendantes).

### 2.7.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test ORAC sont exprimés en micromole de Trolox équivalent par milligramme d'extrait (μmol de TE/mg d'extrait respectivement). À l'image du DPPH, les résultats montrent que dans l'ensemble ce sont les extraits aqueux (extraits 4) qui sont plus actifs chez tous les producteurs avec 684, 749 and 892 μmol TE/g pour A, B et C respectivement (Figure 34). Ils sont suivis par les extraits cyclohexanique pour le producteurs A et les extraits chloroformiques pour les producteurs B et C. Aucune différence significative entre les valeurs d'ORAC des extraits cyclohexaniques, chloroformiques et éthanoliques des producteurs A et B. Le producteur C possède une activité



antioxydante plus élevée par rapport aux producteurs A et B quel que soit l'extrait considéré (figure 34). On ne note pas de différence significative entre les valeurs d'ORAC de A et B dans tous les extraits.



**Figure 34 :** Valeurs ORAC des extraits des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$  expériences indépendantes).  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$  pour producteur A versus producteur C;  $\$p<0.05$ ,  $\$\$p<0.01$ ,  $\$\\$\\$p<0.001$ ; pour producteur B versus producteur C.

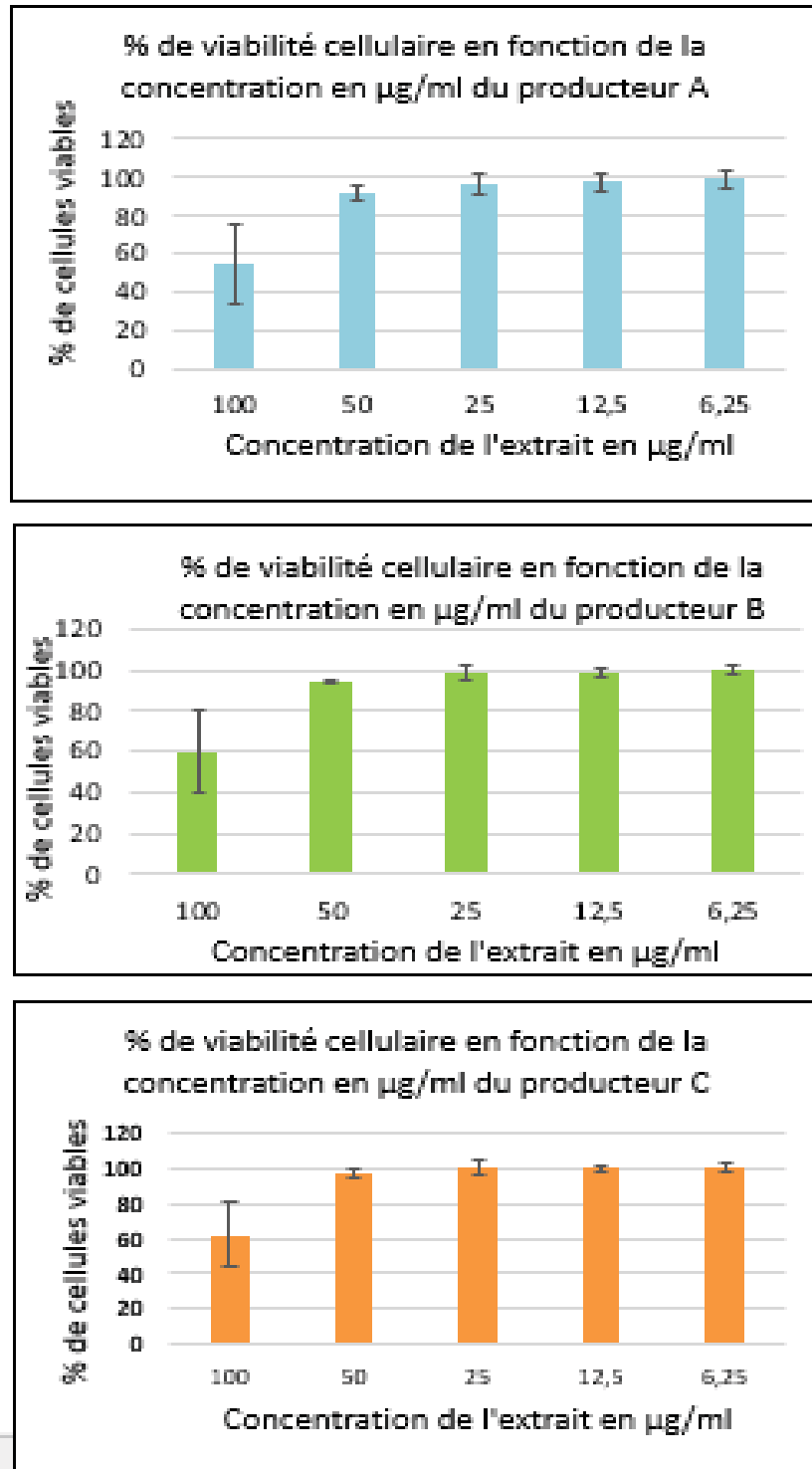
## 2.8 Activité anti-inflammatoire

Concernant l'activité anti-inflammatoire, nous n'avons pu tester que les extraits polaires. En effet, les extraits apolaires sont difficiles à tester de par leur incompatibilité avec les milieux aqueux utilisés en culture cellulaire. En conséquence, les résultats présentés dans cette partie ne concernent que les extraits éthanoliques et aqueux du Shiitake issus des 3 producteurs.

### 2.8.1 Effet des extraits éthanoliques et aqueux du Shiitake sur la viabilité cellulaire

Avant d'évaluer les effets anti-inflammatoires des extraits, il est important d'étudier leur activité sur la viabilité cellulaire, ce test nous permettant par la suite de choisir les concentrations des extraits à tester sur les cellules inflammatoires. La viabilité des cellules J774.A1 a été déterminée par la méthode MTS/PMS qui évalue l'activité des enzymes déshydrogénases présentes dans les cellules viables. Les résultats montrent qu'à la concentration la plus élevée (100 µg/ml), nous observons une perte de la viabilité cellulaire de 79% (producteur A), 76% (B) et 78% (C) pour les extraits éthanoliques et de 55% (A), 60% (B) et 63% (C) pour les extraits aqueux (figure 35). Ces résultats suggèrent que les extraits éthanoliques et aqueux, quelque soit les producteurs, ont une activité cytotoxique à la concentration de 100 µg/ml. A l'opposé, pour les concentrations de 6,26 µg/ml à 50 µg/ml, nous n'avons pas observé de modification de la viabilité cellulaire, quelque soit l'extrait ou le

producteur. Ces concentrations ont donc été choisies pour les activités anti-inflammatoires sur les macrophages.



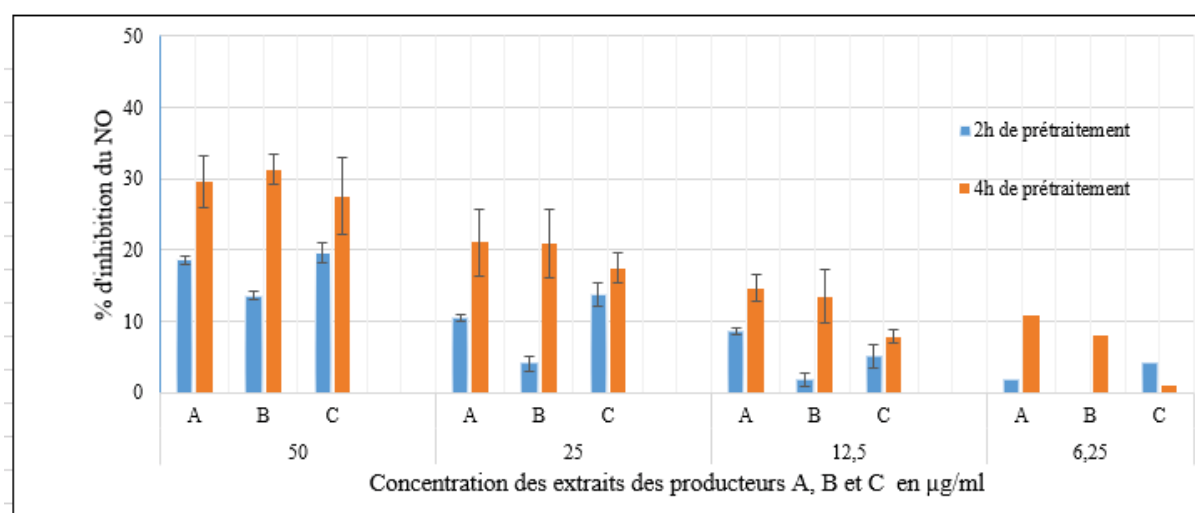
**Figure 35 :** Viabilité cellulaire de l'extrait aqueux des producteurs A, B et C. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$  expériences indépendantes)

## 2.8.2 Effet des extraits sur la production de NO par les macrophages inflammatoires

### 2.8.2.1 Détermination des conditions des prétraitements des cellules

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire, nous avons dans un premier temps recherché quel temps de prétraitement des cellules avec les extraits du champignon (2 ou 4 heures) était le plus efficace en dosant les nitrites (mesure indirecte de la production de NO) à 24 heures après le signal inflammatoire (LPS/IFN $\gamma$ ).

La figure 36 montre l'effet de 2 et de 4 heures de prétraitement pour les extraits éthanoliques sur la production de NO induite par le LPS/IFN $\gamma$  par les macrophages. On observe un effet inhibiteur concentration-dépendant d'environ 30 % pour 50  $\mu$ g/ml et ce, quelque soit le producteur pour un prétraitement des cellules de 4 heures par les extraits. Cet effet est plus faible lorsque les cellules sont prétraitées pendant 2 heures avant le signal inflammatoire.



**Figure 36 :** Effet de 2 et 4 heures de prétraitement des cellules J774 avec les extraits éthanoliques du Shiitake sur la production du NO induite par le LPS/IFN $\gamma$ . Les résultats sont la moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$  expériences indépendantes)

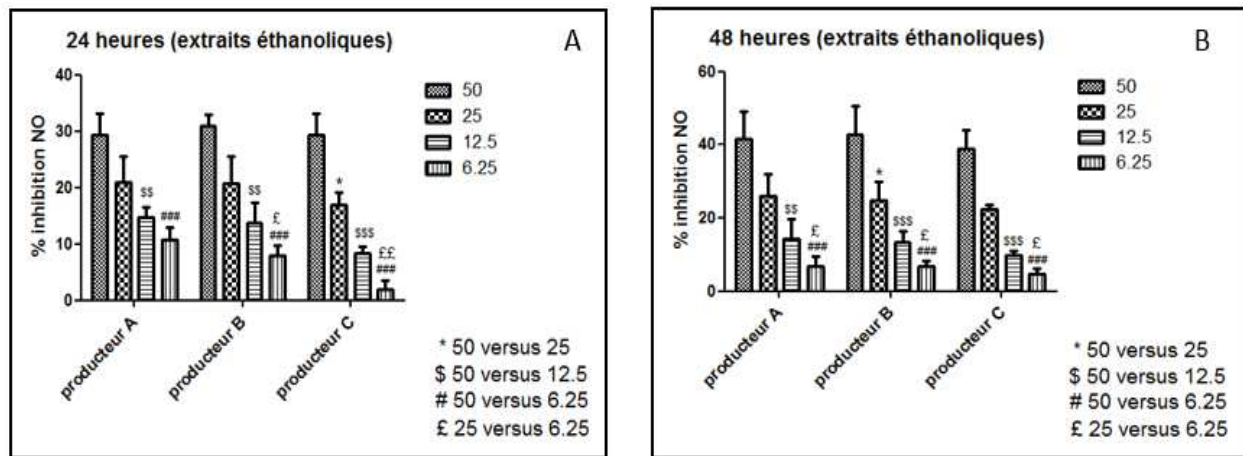
Suite à ces résultats, nous avons donc choisi 4 h de prétraitement par les extraits (éthanoliques et aqueux) avant l'activation des macrophages par le LPS/IFN $\gamma$ .

### 2.8.2.2 Effet des extraits éthanoliques du Shiitake sur la production du NO

Nous avons prétraités les cellules J774.A1 avec différentes concentrations d'extraits éthanoliques (de 6,25  $\mu$ g/ml à 50  $\mu$ g/ml) pendant 4 heures avant leur activation. Le NO est ensuite dosé dans les surnageants de culture 24 à 48 heures plus tard.

Le LPS associé à l'IFN $\gamma$  seuls, stimulent la production de NO par les macrophages. Les résultats montrent que les extraits éthanoliques des trois producteurs inhibent significativement la production du NO de façon concentration dépendante (29,66%, 31,30% et 27,56%

respectivement pour les producteurs A, B et C à 50 µg d'extrait/ml) lorsque les cellules sont prétraitées pendant 4 heures avec un temps de stimulation de 24 heures (figure 37A).



**Figure 37 :** Effet des extraits éthanoliques des producteurs A, B et C sur la production de l'oxyde nitrique à 24 h et 48 h de stimulation. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 3$  expériences indépendantes). \*\*\*  $p < 0,001$ , inhibition résultant de 50 µg / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition; \$  $p < 0,05$  ; \$\$  $p < 0,01$  ; \$\$\$  $p < 0,001$ , inhibition résultant de 25 µg / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition; £  $p = 0,01$ , inhibition résultant de 12,5 µg / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition; α  $p < 0,05$ , inhibition résultant de 6,25 µg / ml d'extrait par rapport à l'absence d'inhibition.

Il convient de noter également que la production du NO diminue fortement de manière dose-dépendante après 48 heures de stimulation (41,6 ; 42,6 et 39% pour les producteurs A, B et C, respectivement) à la dose la plus élevée (figure 37B). Lorsque l'on compare les producteurs entre eux à une concentration donnée, on n'observe pas de différences significatives entre les extraits éthanoliques des trois producteurs A, B et C. Le potentiel anti-inflammatoire apparaît équivalent quel que soit le temps de stimulation ou la concentration considérée, par contre, si on procède à une comparaison entre les concentrations testées pour un même producteur, nous observons clairement des différences statistiquement significatives.

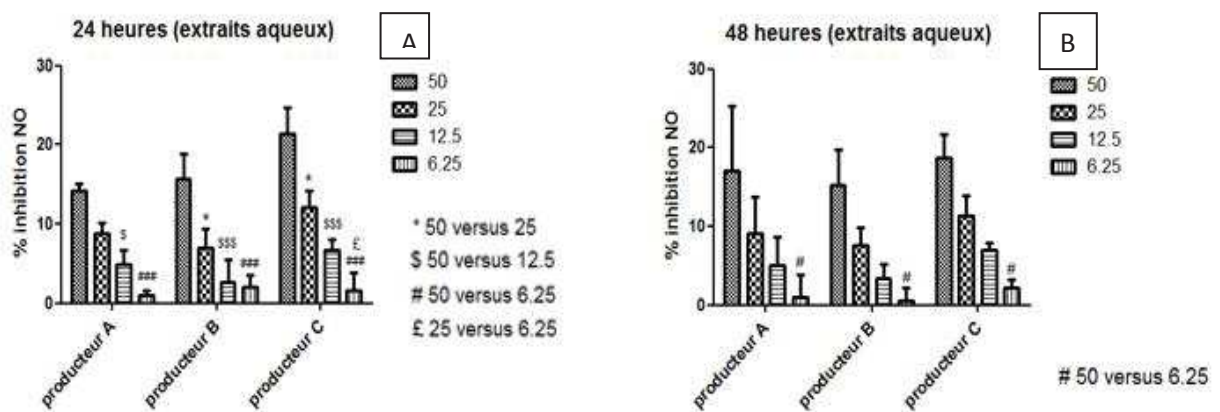
L'ensemble de ces résultats suggèrent donc, que les extraits éthanoliques de *Lentinula edodes* possèdent une activité anti-inflammatoire *in vitro*, sans qu'il n'y ait une différence statistique entre les producteurs « Non bio » et « Bio ».

### 2.8.2.3 Effet des extraits aqueux du Shiitake sur la production du NO

Les résultats présentés à la figure 38A montrent qu'un prétraitement cellulaire avec les extraits aqueux de Shiitake des différents producteurs induit une faible inhibition de la production de

nitrites et que cet effet est fonction de la concentration. L'inhibition la plus importante est observée à 50 µg/ml après 4 h de prétraitement avec 24 h de stimulation avec 14,23% , 15,60% et 20,93% pour les producteurs A, B et C respectivement. A environ 48 h de stimulation, l'inhibition de la production du NO enregistre une légère diminution avec respectivement 17,1%, 15,22% et 18,71% pour A, B et C (figure 38B).

En comparant les producteurs entre eux pour une même concentration testée, les résultats ne montrent aucune différence statistique chez les extraits aqueux (données non présentées).



**Figure 38 :** Effet des extraits aqueux des producteurs A, B et C sur la production de l'oxyde nitrique à 24 et 48 heures de stimulation. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 3$  expériences indépendantes).

### 2.8.3 Activité du NO scavenging des extraits éthanoliques et aqueux

Suite à l'effet inhibiteur des extraits éthanoliques et aqueux sur le NO, nous avons voulu savoir si les extraits avaient une activité NO scavenging autrement dit s'ils piègent le NO formé.

Le pouvoir des extraits à piéger le NO a été évalué par dosage du taux de nitrites présents après décomposition photochimique du nitroprusside de sodium (SNP) en présence de différentes concentrations des extraits. Si les valeurs trouvées après calcul sont négatives, correspondant ainsi à une inhibition du NO produit par dégradation du SNP, on conclut que les extraits piègent le NO. Dans le cas contraire, on observe une « accélération » de la dégradation du SNP.

Les résultats présentés dans le tableau 24 montrent que les extraits éthanoliques et aqueux ne piègent pas le NO produit par dégradation du SNP et donc ne possèdent pas d'activité NO scavenging. A l'opposé, les valeurs trouvées pour toutes les concentrations testées et quelque

soit les producteurs sont positives avec des écarts type parfois assez élevés, sans effet concentration dépendant. Cela suggère que les 2 extraits pourraient accélérer la dégradation du SNP par un mécanisme inconnu mais peu spécifique.

Suite à ces résultats, on peut conclure que l'effet inhibiteur des extraits éthanoliques ou aqueux sur la production du NO par les macrophages inflammatoires n'est pas du à une activité NO scavenging.

**Tableau 24 :** *Activité NO scavenging des extraits éthanoliques et aqueux pour les producteurs A, B et C.*

Producteurs	Extrait éthanoliques			Extraits aqueux		
	A	B	C	A	B	C
Témoin	0	0	0	0	0	0
50 µg/ml	6,2 ± 10	4,1 ± 7,7	4 ± 10,4	8,6 ± 4,7	8,8 ± 12,3	16,9 ± 10,6
25 µg/ml	7,7 ± 10,7	11,6 ± 5,6	6,4 ± 4,1	6,9 ± 5,4	10,3 ± 10,5	18,6 ± 10,5
12,5 µg/ml	12,8 ± 5,1	14,6 ± 10,5	11 ± 10,5	7,6 ± 5,6	3 ± 11,5	14,5 ± 9,8
6,25 µg/ml	9,2 ± 9,4	16,2 ± 11,1	12,9 ± 10,1	10,8 ± 7,1	8,6 ± 12,8	13,3 ± 8,9

Les valeurs, exprimées en % d'inhibition de NO produit par la dégradation du SNP, correspondent à la moyenne ± écart type de 3 expériences indépendantes).

#### 2.8.4 Dosage du TNF $\alpha$

Suite à l'activation des macrophages, plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 sont produites par les cellules puis libérées dans le surnageant cellulaire.

Nous avons donc poursuivi ce travail en recherchant l'effet inhibiteur des 2 extraits sur la production de TNF $\alpha$  par les macrophages activés. Le TNF $\alpha$  a été dosé dans les surnageants de culture par une technique ELISA sandwich, 6 et 48 heures après activation des cellules par l'association LPS/IFN $\gamma$ .

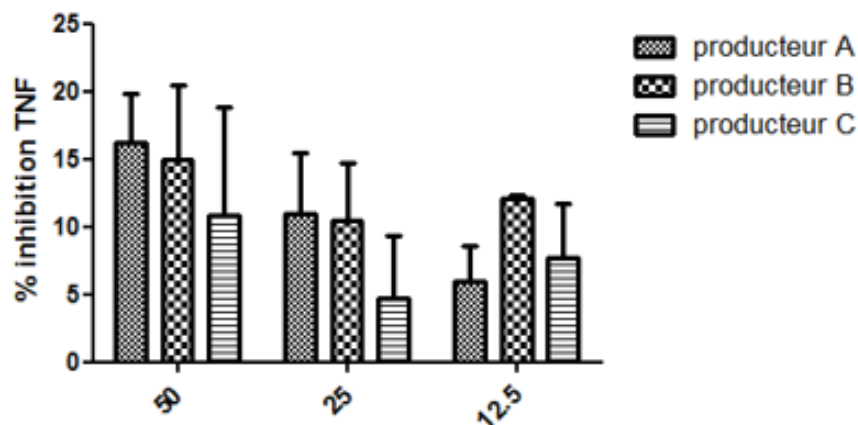
Dans des expériences préliminaires, les cellules ont été prétraitées pendant 4 heures puis activées durant 48 heures par le LPS/IFN $\gamma$ : cette condition ne nous a pas permis d'avoir des résultats probants car les surnageants prélevés à 48 heures ne contenaient pas de TNF $\alpha$  détectable (données non présentées).

Nous avons donc prétraité les cellules par les 2 extraits pendant 2 heures avant d'être activées pendant 6 heures par l'association LPS/IFN $\gamma$ . Dans ces conditions, le taux de TNF $\alpha$  augmente rapidement, comparé aux cellules non activées.

#### 2.8.4.1 Effet des extraits éthanoliques sur la production du TNF $\alpha$ par les macrophages activés au LPS/IFN $\gamma$ .

Une forte production du TNF $\alpha$  est observée dans les cellules non prétraitées par les extraits et stimulées par l'association LPS/IFN $\gamma$  avec une moyenne de 1312, 950 et 1030  $\mu$ g/ml respectivement pour le producteur A, B et C.

La figure 39 montre que les extraits de Shiitake inhibent de manière concentration dépendante la production de TNF $\alpha$ , mais cette inhibition est faible. Il n'y a pas de différence significative observée entre les producteurs à toutes les concentrations étudiées. Cette inhibition atteint 16,2%, 14,9% et 10,83% pour les producteurs A, B et C respectivement pour 50  $\mu$ g/ml d'extrait.



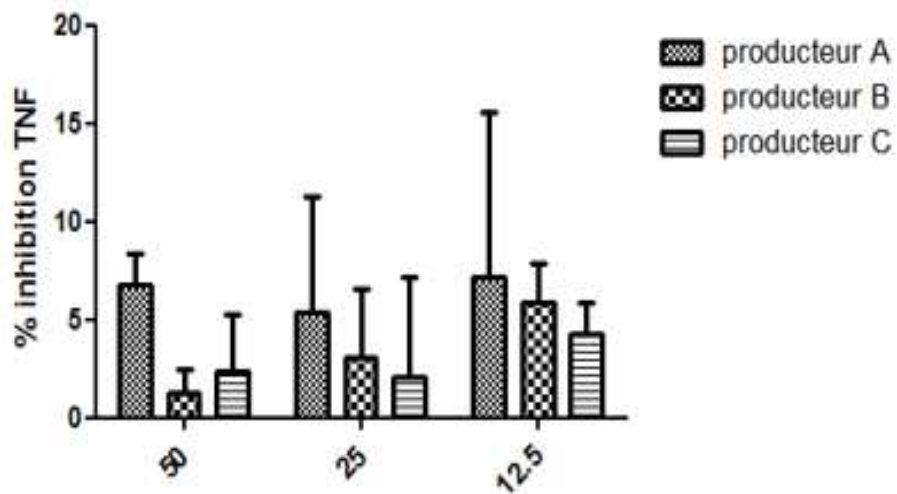
**Figure 39 :** Effet des extraits éthanoliques des producteurs A, B et C sur la production du TNF $\alpha$ . Les résultats, exprimés en % d'inhibition de la production de TNF $\alpha$  correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.

#### 2.8.4.2 Effet des extraits aqueux sur la production du TNF $\alpha$ par les macrophages activés au LPS/IFN $\gamma$ .

A l'image des extraits éthanoliques, on observe une production importante du TNF $\alpha$  dans les cellules non traitées par les extraits aqueux et stimulées par le LPS/IFN $\gamma$ .

Lorsque les cellules sont prétraitées par les extraits aqueux avant d'être activées, les résultats présentés dans la figure 41 montrent une faible diminution de la concentration du TNF $\alpha$ . Cette inhibition observée n'est pas concentration dépendante pour l'ensemble des producteurs car

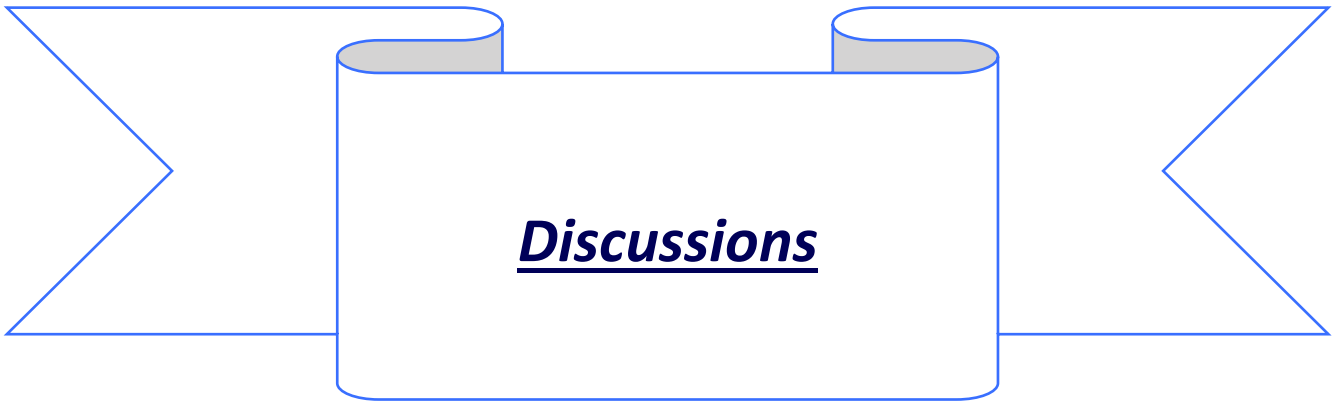
elle est plus marquée aux petites concentrations (figure 40). Par exemple, elle est de 6,7% ; 1,2% ; 2,3% à 50  $\mu\text{g/ml}$  et de 7,1% ; 5,8% et de 4,2% à 12,5  $\mu\text{g/ml}$  pour A, B et C respectivement.



**Figure 40 :** Effet des extraits aqueux des producteurs A, B et C sur la production du TNF $\alpha$ .

Les résultats, exprimés en % d'inhibition de la production de TNF $\alpha$  correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.





**Discussions**

### 3 DISCUSSION

#### 3.1 Extraction

L'extraction des molécules biologiquement actives nécessite l'utilisation de solvants de polarités différentes. Il est connu que certains composés sont mieux solubles dans les solvants polaires tels que le méthanol, l'eau, tandis que d'autres se dissolvent mieux dans les solvants apolaires (**Smolskaite et al., 2015**).

Pour extraire les molécules d'intérêts du champignon nous avons donc utilisé quatre (4) solvants de polarité différente à savoir : le cyclohexane, le chloroforme, l'éthanol et l'eau. Les extraits aqueux et alcooliques ont donné les rendements les plus élevés. Ces résultats semblent être cohérents et attendus compte tenu de la richesse des champignons en glucides et en composés phénoliques. Sachant que les glucides et les composés phénoliques sont des molécules polaires, leur présence dans les extraits 3 et 4 (extraction par solvant polaire) est donc justifiée. Les différences de rendements totaux pour chaque solvant et pour chaque producteur peuvent être liées à l'influence des conditions de culture, du stade de récolte, la temps d'extraction, la température d'extraction et de la taille même des champignons (**Mattila et al., 2001 ; de Melo Macoris et al., 2017 ; Čilerdžić et al., 2019 ; Khatua et al., 2019**).

Généralement, l'éthanol et l'eau sont les solvants le plus couramment utilisés dans l'extraction des molécules d'intérêts des champignons, car ils permettent d'obtenir des rendements élevés (**Kalyoncu et al., 2010 ; de Melo Macoris et al., 2017**) et ces solvants ne présentent pas de risques lorsqu'il s'agit d'utiliser les extraits pour la consommation humaine (**Khatua et al., 2019**). Peu d'études ont utilisés le chloroforme et le cyclohexane dans l'extraction des métabolites, par contre des extractions hydro-alcooliques sont souvent réalisées pour augmenter considérablement le rendement d'extraction et/ou la nature des molécules d'intérêts à extraire.

Les rendements présentés dans cette étude sont similaires à ceux rapportés par **Gaitán Hernández et al. (2017)**, qui cultivaient la souche IE-245 de Shiitake sur des copeaux de bois de chêne et de la bagasse de canne à sucre (25,45% et 23,63% respectivement). Par contre, nos valeurs sont nettement supérieures à celles trouvées par **Gaitán Hernández et al. (2006)** (20,33% et 21,86%) qui utilisaient respectivement la paille d'orge et de blé pour la culture de la souche IE-245 de shiitake.

En effet, les rendements obtenus pour les extraits aqueux des producteurs A, B et C (13,45% ; 15,17% et 15,36% respectivement) étaient également comparables à ceux mentionnés par

**Cheung et al. (2003)** (16,2%) sur des champignons commerciaux. Cependant, nos valeurs sur les mêmes extraits sont moins importantes à celles rapportées par **Da Silva et Jorge, 2011** avec des rendements variant de 29,92 à 30,57%. Nos résultats sur les extraits chloroformiques varient de 0,68% à 1,75% et de 6,49 à 7,49%.

Récemment, **Ferrari et al. (2012)** ont obtenus des rendements de 11% ; 13,6% ; 14 %; 27,2 %; 32,7% et 33,8% respectivement pour l'éthanol, le méthanol, l'acétone, éthanol-eau, méthanol-eau et acétone-eau. Ces différences entre nos valeurs et celles issus des autres auteurs pourraient aussi s'expliquer par la différence des méthodes d'extraction utilisées, de la souche, du stade de récolte, de la taille des champignons ou des conditions de culture (**Mattila et al., 2001 ; de Melo Macoris et al., 2017**).

### 3.2 Polyphénols totaux

Les champignons et les végétaux sont connus pour leur capacité à synthétiser une panoplie de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques pour se défendre contre les insectes et les micro-organismes (**Vaz et al., 2011 ; Ching-yu, 2013**). Par exemple, les mélanines sont des molécules phénoliques présents dans de nombreux champignons et il a été suggéré qu'elles interviennent dans la défense contre les agents pathogènes (**Islas-Flores et al., 2006 ; Ching-yu, 2013**). Les composés phénoliques jouent également un rôle important dans la santé de l'homme en luttant contre l'oxydation des cellules et certaines maladies non transmissibles (**Boonsong et al., 2016**).

En plus de leur action antioxydante ils joueraient aussi un rôle primordial dans la stabilisation de la peroxydation lipidique (**Del Carlo et al., 2004 ; Gharby et al., 2014**) en interceptant l'oxygène singulet et en décomposant les produits primaires d'oxydation en des composés stables non réactifs.

Ces molécules sont très connues pour leur réactivité avec le Folin. Ce dernier est souvent utilisé pour doser les polyphénols totaux des aliments, des extraits de champignons et de plantes. Cependant, le terme polyphénols totaux semble être incorrect, car le réactif de Folin est capable aussi de réagir avec d'autres molécules, notamment : les composés azotés, les thiols, les vitamines, les glucides et les bases de nucléotides (**Everette et al., 2010 ; Morel et al., 2018**). En réalité, il mesure la capacité antioxydante totale de l'échantillon étudié (**Everette et al., 2010**).

Les teneurs en polyphénols totaux obtenues pour les extraits éthanoliques des trois producteurs (14,53 ; 16,29 et 14,29  $\mu\text{g}$  GAE/mg d'extrait) sont comparables à celles mentionnées par **Jang et al. (2015)** (12,52 mg GAE/g d'extrait) et **Mujić et al. (2010)** (11,70 mg GAE/g d'extrait). Tandis qu'elles sont nettement supérieures aux résultats rapportés par **Heleno et al. (2015)** (0,33 mg/100 de poids sec) et de ceux trouvés par **Reis et al., 2012** pour un extrait hydro-alcoolique de Shiitake obtenu commercialement (8,8487 mg GAE/g d'extrait). Les teneurs en composés phénoliques présentées dans cette étude sont aussi également supérieures à celles rapportées par **Gaitán Hernández et al. (2017)**, qui cultivaient la souche IE-245 et IE-256 de shiitake sur des copeaux de bois de chêne et de la paille de sorgho (6,50 et 5,85 mg GAE/g de poids sec respectivement). Elles sont en outre légèrement plus élevées par rapport aux quantités totales de composés phénoliques enregistrées par **Vitrac et al. (2011)** (8–15 mg GAE/g de poids sec) dans des champignons cultivés sur un mélange composé de copeaux de chêne, de sciure de bois et du son de blé.

Par ailleurs, nos résultats montrent que nos extraits alcooliques sont également plus riches en polyphénols que ceux rapportés par **Wang et al., 2017** et **Woldegiorgis et al., 2014** pour les mêmes extraits obtenus avec un temps d'extraction de 24h (tableau 24). Dans l'ensemble, nos résultats vont dans le même sens que l'étude de **Rahman et al. (2016)** qui a indiqué que la fraction cyclohexanique obtenue après partition liquide/liquide de l'extrait brut du Shiitake possède la teneur la plus importante en polyphénols avec 60,16 mg GAE/g de fraction. Comparée à nos extraits du même solvant d'extraction, cette valeur est nettement supérieure à nos résultats qui varient de 24,47 à 34,78  $\mu\text{g}$  GAE/mg d'extrait.

Les champignons produisent des enzymes notamment la manganèse peroxydase et la laccase qui peuvent dégrader la lignine, la cellulose et l'hémicellulose contenues dans le substrat de culture pour produire des phénols simples (**Elisashvili et al., 2015 ; Gaitán Hernández et al., 2017**). En plus, il y a d'autres enzymes comme la phénylalanine-ammoniaque lyase qui catalyse la conversion de la phénylalanine et la tyrosine en acides phénoliques (**Gaitán Hernández et al., 2017 ; Melin et al., 1977**). Donc, les différences observées dans les teneurs en polyphénols pourraient être liées à l'activité de ces groupes d'enzymes dégradant le substrat et de ceux participant à la biosynthèse des polyphénols dans les basidiomes.

Théoriquement la mesure du contenu phénolique total était susceptible de donner des résultats significativement plus importants pour les extraits 3 et 4 car les composés phénoliques y sont majoritaires. Or les résultats de ce test ont montrés que les extraits 1 possèdent les valeurs les plus élevées dans les trois producteurs (figure 22). Ces résultats s'expliquent par les faux

positifs susceptibles d'interférer avec le test de mesure de la teneur en phénols. En effet, le solvant d'extraction emporte des molécules non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant l'évaluation phénolique (**Djeridane *et al.*, 2006**). Selon **Tawaha *et al.* (2007)** le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de l'ensemble des composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, car plusieurs molécules sont capables de réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé.

Il est important de constater que la majeure partie des études réalisées sur le dosage des polyphénols totaux du Shiitake porte sur des extraits polaires (alcooliques, aqueux et hydro-alcooliques) mais très rarement sur des extraits apolaires (tableau 25).

**Tableau 25 : Tableau comparatif du dosage du Folin, des conditions d'extraction et de l'expression des unités issu de la littérature**

Références	Nature de l'extrait	Rendement extraction	Temps d'extraction	Température d'extraction	Dosage du Folin	Expression des unités
Silva et Jorge., 2011	Aqueux	29,92	30 min	T° ambiante	120,44	mg/g d'extrait
Alispahić <i>et al.</i> , 2015		-	-	-	4,94	mg GAE/g de champignon
Cheung <i>et al.</i> , 2003		16,2	3h	-	1,33	mg GAE/g de champignon sec
Wang <i>et al.</i> , 2017		-	24h	-	4,26	mg GAE/g de champignon
Hsu Ching-yu, 2013		-	24h	T° ambiante	4604	µg GAE/g de poids sec
de Melo Macoris <i>et al.</i> , 2017		25	1h	T° ambiante	5,66	mg GAE/g de champignon
Silva et Jorge, 2011	Hydro-alcoolique	23,44	30 min	T° ambiante	45,33	mg/g d'extrait
Silva et Jorge, 2011		29,65	30 min	T° ambiante	43,13	mg/g d'extrait
Reis <i>et al.</i> , 2012b		-	1,5h	20°C	8,84	mg GAE/g d'extrait
Yang <i>et al.</i> , 2002	Alcoolique	18,8	24h	-	6,27	mg/g d'extrait
Silva et Jorge, 2011		11,46	30 min	T° ambiante	20	mg/g d'extrait
Cheung <i>et al.</i> , 2003		33,5	3h	-	4,7	mg GAE/g de champignon sec
Khaund et Joshi, 2015		-	24h	30°C	10,8	mg GAE/g d'extrait sec
Wang <i>et al.</i> , 2017		-	24h	-	0,06	mg GAE/g de champignon
Yildiz <i>et al.</i> , 2015		-	3h	60°C	7,25	mg /g de champignon sec
Heleno <i>et al.</i> , 2015		-	2h	25°C	0,33	mg/100 g de poids sec
Mujić <i>et al.</i> , 2010		20,82	40 min	45°C	11,70	mg GAE/g d'extrait sec

<b>Références</b>	<b>Nature de l'extrait</b>	<b>Rendement extraction</b>	<b>Temps d'extraction</b>	<b>Température d'extraction</b>	<b>Dosage du Folin</b>	<b>Expression des unités</b>
Woldegiorgis <i>et al.</i> , 2014		-	24h	25°C	3,4	mg GAE/g d'extrait sec
Wang <i>et al.</i> , 2017	Acétone	-	24h	-	0,06	mg GAE/g de champignon
Cheung <i>et al.</i> , 2003	éthyle acétate	3,65	3h	-	0,033	mg GAE/g de champignon
Islam <i>et al.</i> , 2016	Acétone-eau-acide acétique	-	3h	T° ambiante	2,72	mg GAE/g de champignon
Vitrac <i>et al.</i> , 2011	alcoolique	-	une nuit	T° ambiante	8-15	mg GAE/100 g de poids sec

En examinant ce tableau, on remarque qu'il est difficile de comparer nos résultats avec ceux issus des autres équipes de recherches en raison des différences de méthode d'extraction appliquée, du mode d'expression des résultats qui sont souvent exprimés en fonction de la matière sèche ou fraîche du champignon. D'autres chercheurs l'expriment en fonction de l'extrait sec.

### 3.3 Activités antioxydantes

Les propriétés antioxydantes du Shiitake ont été étudiées depuis des années en utilisant les tests de DPPH, FRAP, ORAC, inhibition de la peroxydation lipidique, chélation des métaux et ABTS avec une expression des résultats en des unités différentes. Cependant, on note que le radical DPPH est le plus souvent employé par la majorité des équipes de recherche avec une grande variabilité de la méthode en termes de concentration de l'extrait étudié, de la concentration du DPPH, et même de la durée de la réaction (**Ramirez-Anguiano et al., 2007 ; Kalyoncu et al., 2010 ; Kozarski et al., 2012 ; Reis et al., 2012b ; Shah et Modi, 2015**). C'est ce qui rend difficile la comparaison des résultats issus des différents laboratoires de recherche.

Dans notre cas, nous avons utilisés le DPPH qui a un mécanisme basé sur une réaction de transfert d'électrons (mais considéré comme une méthode mixte par certains chercheurs) et l'ORAC méthode basée sur un transfert d'atomes d'hydrogènes qui complète la description antioxydante des champignons (**Morel et al., 2018**).

#### 3.3.1 DPPH

Les résultats montrent que tous les extraits présentent une activité antioxydante quantifiable mais modérée. A une concentration de 1 mg/ml, les pourcentages d'inhibition trouvés sur nos extraits aqueux des producteurs A, B et C (25,23 ; 18,4 et 24 % respectivement) sont comparables à celui rapporté par **Shah et Modi. (2015)** (32,60 %) pour son extrait aqueux. A la même concentration, le niveau d'inhibition des radicaux libres par les extraits alcooliques pour le producteur A (26,63%), B (22,78%) et C (14,01%), sont similaires à ceux précédemment rapportés par **Da Silva et Jorge (2011)** (18,70 et 19,17% obtenus par extraction lente et rapide.

Les travaux réalisés par **Chowdhury et al. (2015)** et **Mujić et al. (2010)** avec un  $EC_{50} = 110$  µg/ml et 0,073 mg/ml respectivement, montrent clairement une activité antioxydante des extraits du Shiitake plus efficace que la nôtre. Dans cette même ordre d'idée, une autre étude réalisée au Brésil sur des extraits aqueux du *Lentinula edodes* montre un  $EC_{50}$  de 0,4 mg/ml (**de Melo Macoris et al., 2017**).

Quant aux données rapportées par **Yildiz et al. (2015)** et **Reis et al. (2012)** sur des champignons commerciaux, elles indiquent un  $EC_{50}$  très élevé estimé à 4,99 mg/ml et 6,43 mg/ml respectivement. Ce qui démontre la faiblesse de la capacité de ces extraits à inhiber les radicaux libres du DPPH.



S'agissant de nos extraits cyclohexaniques, à 1 mg/ml, ils sont moins actifs avec 25,83 ; 12,88 et 15,52 % d'inhibition respectivement pour les producteurs A, B et C que ceux trouvés par **Rahman et al. (2016)** sur sa fraction cyclohexanique obtenue suite à une partition liquide/liquide de l'extrait brut avec 67,38% d'inhibition des radicaux libres de DPPH à la même concentration.

La revue de la littérature montre qu'une diversité des extraits du Shiitake (aqueux, alcoolique, hydro-alcoolique, éther diéthylique...) a été testé dans le cadre de l'étude de son pouvoir antioxydant en utilisant le radical DPPH, mais la majeure partie des études porte essentiellement sur ses extraits aqueux, alcooliques et hydro-alcooliques (**Cheung et al., 2003 ; Ramirez-Anguiano et al., 2007 ; Ferrari et al., 2012 ; Zhang et al., 2013 ; Khaud et Joshi, 2016 ; Boonsong et al., 2016 ; Choi et al., 2016**). S'agissant de leur efficacité, les extraits hydro-alcooliques présentent la plus forte activité contre les radicaux DPPH (diphényl-picrylhydrazyl) (**Ferrari et al., 2012**) avec un EC<sub>50</sub> estimé 0,044 mg/ml. Cependant, les extraits aqueux semblent être plus efficaces dans le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (**Boonsong et al., 2016**). Des polysaccharides purifiés à partir du Shiitake ont été aussi analysés par certains auteurs ; ils ont montré un effet inhibiteur sur les radicaux hydroxyles, superoxydes et sur les métaux pro-oxydants (**Chen et al., 2012**).

### 3.3.2 ORAC

Il est à remarquer que dans la littérature, peu de travaux ont abordés l'étude de l'activité antioxydante du Shiitake en utilisant la méthode d'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), certainement à cause de son équipement onéreux et l'interférence des protéines au cours du test, ceci peut facilement biaiser les résultats.

Les valeurs ORAC obtenues pour l'ensemble de nos extraits varient de 442 à 892 µmol TE/g d'extrait. D'autres travaux réalisés sur des extraits aqueux du Shiitake montrent des valeurs d'ORAC de 16,39 µmol TE/g d'échantillon (**Kettawan et al., 2011**) et 81,5 µmol TE/mg/ml (**Ito et al., 2011**), tandis que le Département de l'Agriculture Américain mentionne une capacité antioxydante du *Lentinula edodes* estimée à 752 µmol TE/100 g (**Department of Agriculture, 2010**). Les analyses menées sur d'autres champignons qui sont couramment vendus dans le commerce ont établi que le *portobello* possède une valeur antioxydante de 138,33 µmol TE/g contre 105,67 µmol TE/g pour *crimini* (**Dubost et al., 2007**). En comparaison avec nos résultats, ces valeurs démontrent que nos extraits de tous les producteurs sont plus actifs. Cette différence observée pourrait s'expliquer par les aspects génétiques des souches utilisées, les conditions de croissance et les conditions environnementales ou la

méthode utilisée qui peuvent affecter la quantité de métabolites secondaires produits par les champignons (tableau 26) (**Dubost et al., 2007**).

De nombreuses études ont montré que l'ergostérol et les composés phénoliques ont été identifiés comme les principales molécules antioxydantes de ce champignon. En fait, ces molécules sont connues pour être des puissants piègeurs de radicaux libres et des chélateurs de métaux (**Heleno et al., 2011 ; Shao et al., 2010**).

Selon des chercheurs de l'Université de Pennsylvanie, aux États-Unis, l'action antioxydante des champignons est liée aux polyphénols qu'ils renferment. Ils concluent également que l'ergothioneine, un acide aminé synthétisé par les champignons, pourrait aussi être fortement impliqué à cette action. Leurs résultats indiquent que la consommation régulière de diverses variétés de champignons pourrait valablement contribuer à assurer un apport intéressant en molécules antioxydantes auxquelles on attribue des vertus thérapeutiques et préventives contre plusieurs maladies non transmissibles, notamment : le cancer, les maladies inflammatoires, l'Alzheimer et les troubles cardiovasculaires (**Dubost et al., 2007 ; Ito et al., 2011**).

Ces deux tests, DPPH et ORAC, étant des essais quantitatifs, nous ont permis de comparer les extraits entre eux et les producteurs entre eux selon leur capacité à piéger des radicaux libres (APPH et DPPH). Les résultats montrent que ces activités varient d'un extrait à un autre et d'un producteur à un autre selon le test effectué.

Les molécules ayant un pouvoir antioxydant dans les matrices alimentaires jouent des fonctions diverses, ceci montre que certaines parmi elles ne sont pas liées à la capacité d'absorber les radicaux libres. Déjà plusieurs études cliniques ayant pour but de tester les avantages et les bienfaits et les effets santé des antioxydants alimentaires ont donné des résultats mitigés. Donc, les données concernant la capacité antioxydante des aliments issues des méthodes *in vitro* ne peuvent pas être extrapolées aux effets *in vivo* (**US Department of Agriculture, 2010**).

Nos résultats ne montrent aucune corrélation entre les tests DPPH, ORAC et F.C, ce qui suggère que selon **Morel et al. (2018)**, différentes classes de composés sont impliquées dans le potentiel antioxydant du champignon Shiitake.

**Tableau 26 :** Comparaison de l'activité antioxydante, des conditions de cultures, de la souche utilisée, de la méthode d'extraction et du dosage issue de la littérature utilisant la méthode d'ORAC.

Références	Nature de l'extrait	Méthode d'extraction	Méthode de dosage de l'activité antioxydante	Conditions de cultures	Souches utilisées	Expression des unités
Dubost <i>et al.</i> , 2007	Extrait eau-acétone	15 g de champignon broyés extraits par 20 ml d'un mélange Eau-acétone (1 : 1) à température ambiante pendant 1 heure sous agitation puis centrifugation à 5 900 tr / min.	Dégradation de la fluorescéine par les radicaux hydroxyles générés par une réaction de type Fenton médiée par Co (II).	-	-	62.67 μmol TE/g DW
Ito <i>et al.</i> , 2011	Extrait aqueux	10 g de champignon séché dans 200 ml d'eau chaude sous agitation occasionnelle pendant 30 min puis centrifugation à 10 000 tr / min pendant 10 min suivi d'une filtration	Dégradation de la fluorescéine par les radicaux AAPH en présence de l'extrait	-	-	81.5 μmol TE/mg/ml
United States International Trade			Dégradation de la fluorescéine par les			

Commission (USITC), 2010	-	-	radicaux AAPH en présence de l'extrait	-	-	752 $\mu$ mol TE/100g DW
Vitrac <i>et al.</i> , 2011	Extrait éthanolique	100 mg de poudre séchée extraits par 5 ml de MeOH pendant une nuit, puis centrifugation à 3000 tr / min pendant 10 min	Dégradation de la fluorescéine par les radicaux AAPH en présence de l'extrait	Copeaux de chêne, sciure de bois, son de blé, Gypse et eau avec une température de 22°C et humidité relative de 92 à 98%	3706 Mycelia	1600 à 3500 $\mu$ mol TE/100g DW
Kettawan <i>et al.</i> , 2011	Acetone-Eau	0,5 g de champignon crus ou cuits homogénéisés dans 20 ml d'acétone à 50% dans de l'eau désionisée (v / v) à la température ambiante pendant 1 h, puis centrifugation à 4 400 g pendant 15 min	Dégradation de la fluorescéine par les radicaux AAPH en présence de l'extrait	-	-	16.39 $\mu$ mol TE/g of sample

### 3.4 Activité anti-inflammatoire des extraits polaires sur les cellules J774.A1

Vu l'effet antioxydant observé avec les extraits, il a été question dans une deuxième approche d'étudier l'effet des extraits polaires (éthanoliques et aqueux) du Shiitake dans le processus inflammatoire qui est largement impliqué dans diverses pathologies chroniques dont entre autres : le diabète, le cancer, l'Alzheimer, les maladies auto-immunes et l'asthme. Par ailleurs, plusieurs études ont rapportés le potentiel anti-inflammatoire de certaines molécules bioactives notamment les polyphénols et l'ergothioneine contenues dans le Shiitake.

#### 3.4.1 Dosage du NO

Les macrophages sont des cellules qui jouent un rôle central et essentiel dans le processus de défense de l'organisme contre les agressions dans le but de maintenir son intégrité (**Kuo *et al.*, 2011**). A travers leurs récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors) notamment les TLR (Toll like receptors) se trouvant à leur surface, ils sont capables de reconnaître le type d'agresseur (**Liu *et al.*, 2017 ; Amarante-Mendes *et al.*, 2018**). Cette reconnaissance conduit à leur activation (**Sterka *et al.*, 2006 ; Rubartelli *et al.*, 2007**) et est accompagnée par la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui assurent l'autorégulation de l'inflammation et la protection de l'hôte. Parmi ces molécules sécrétées par les macrophages, on peut citer l'oxyde nitrique (NO) et le Tumor Necros Factor alpha (TNF $\alpha$ ). Le NO est une molécule instable, qui se transforme rapidement en nitrite dans la cellule et ne possède pas de récepteurs cellulaires, mais il peut agir sur sa cellule cible de manière autocrine (NO endogène) ou paracrine (NO exogène).

Lorsque la production du NO est bien maîtrisée, il joue un rôle bénéfique pour l'organisme et se comporte comme un véritable médiateur pro-inflammatoire (**Pacheco sanchez, 2006**) en induisant des effets cytotoxiques contre les cellules bactériennes, les champignons et les virus. Il participe au recrutement des neutrophiles et provoque également une relaxation des muscles (**Guzik *et al.*, 2003 ; Korhonen *et al.*, 2005 ; Dahboul, 2013**). Par contre, à des concentrations élevées, le NO possède des effets délétères vis-à-vis des cellules de l'organisme allant de la cytotoxicité à des lésions cellulaires conduisant ainsi à la mutagenèse, donc responsable du développement de plusieurs maladies chroniques.

Pour rechercher les effets anti-inflammatoires des extraits aqueux et éthanoliques, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de macrophages de souris (cellules J774.A1) activés par l'association LPS/IFN $\gamma$ . Dans ces conditions, les cellules produisent du NO, que l'on peut doser dans les surnageants de culture, par la réaction colorimétrique de Griess. En parallèle, les cellules

libèrent une cytokine inflammatoire importante, le TNF $\alpha$  que l'on dose par une technique ELISA sandwich dans les surnageants de culture.

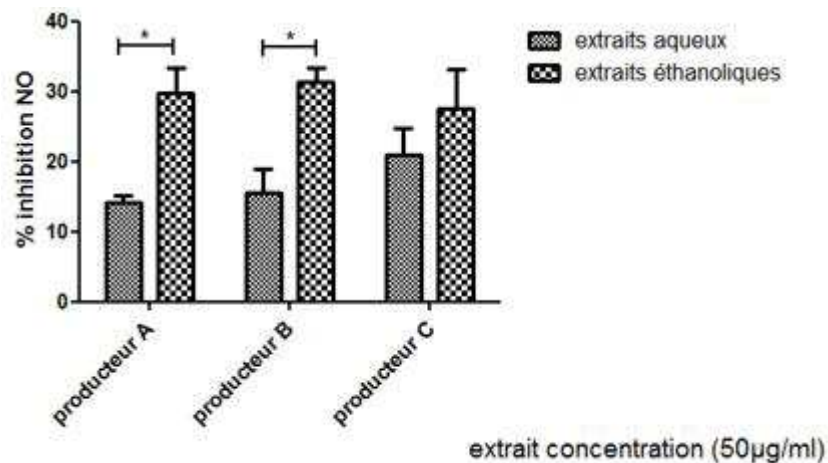
Dans les expériences préliminaires, nous avons montré que les extraits aux concentrations de 6,25 à 50  $\mu\text{g/mL}$  n'avaient pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Ces concentrations ont donc été choisies pour tester l'activité anti-inflammatoire des extraits *in vitro*. Les résultats de ce travail montrent que les extraits éthanoliques du Shiitake issus des 3 producteurs ont un effet inhibiteur intéressant sur la production de NO dans les cellules J774.A1 stimulées par l'association LPS/IFN $\gamma$ , suggérant que les composés présents dans ces extraits possèdent un potentiel anti-inflammatoire *in vitro*. Par exemple à 50  $\mu\text{g/ml}$  les extraits éthanoliques des trois producteurs inhibent significativement la production du NO de manière concentration dépendante (29,66%, 31,30% et 27,56% % respectivement pour les producteurs A, B et C) lorsque les cellules sont prétraitées pendant 4 heures avec un temps de stimulation de 24 heures (figure 37A). Cette inhibition est plus prononcée lorsque les cellules sont stimulées pendant 48 heures (figure 37B). L'analyse statistique des données montrent qu'aucune différence significative d'activité n'est observée entre le producteur « bio » (B) et les 2 autres producteurs « non bio » (A et C).

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par **Chien *et al.* (2016)** qui avaient étudié l'effet d'un extrait éthanolique de Shiitake sur l'inhibition du NO. Des valeurs similaires ont aussi été rapportées pour un polysaccharide isolé du champignon *Collybia dryophila*, nommé CDP (C *dryophila* polysaccharide) (**Pacheco Sánchez, 2006**). Quant à **Xu *et al.* (2012)**, en utilisant un extrait de Lentinan issu du sporophore du Shiitake, ils ont trouvé une inhibition plus importante (40% à 50 $\mu\text{g/ml}$ ) par rapport à nos résultats.

Contrairement aux extraits éthanoliques, les extraits aqueux ont une très faible activité anti-inflammatoire avec un effet inhibiteur de la production du NO allant de 14,23% à 20,93%. Cette diminution du NO suite au prétraitement des cellules par les extraits aqueux, n'évolue pas après 48 heures de stimulation, elle a tendance même à diminuer.

Nos valeurs trouvées pour les extraits aqueux sont inférieurs par rapport à celles trouvées par certains auteurs notamment **Tomassen *et al.* (2011)** qui ont démontrés que les extraits aqueux bruts de lentinane inhibent fortement la production de NO induite par le LPS.

La comparaison du pouvoir d'inhibition du NO entre les extraits éthanoliques et aqueux du même producteur à la concentration la plus élevée montrent que ce sont les extraits éthanoliques qui possèdent l'effet le plus important, quel que soit le producteur utilisé avec une différence statistique chez les producteurs A et B (figure 41).



**Figure 41 :** Comparaison entre les extraits éthanoliques et aqueux du même producteur sur la production de NO par les macrophages inflammatoires.

Les résultats sur le NO scavenging ont également montré que l'activité inhibitrice des extraits sur la production de NO par les macrophages inflammatoires, n'étaient pas dus au piégeage du NO produit par les cellules.

### 3.4.2 Dosage du TNF $\alpha$

S'agissant du TNF $\alpha$ , il est réputé être un véritable médiateur pro-inflammatoire qui participe à une panoplie d'activités biologiques. Mais avec une production non maîtrisée, l'action du TNF $\alpha$  conduit au désordre métabolique (diabète de type 2, insuffisance rénale et obésité) et le développement de la maladie de Crohn (Clemenzi *et al.*, 2018). Il a également sa part dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque chronique, de l'athérosclérose, de la polyarthrite rhumatoïde (Laviolle & Bellissant, 2006 ; Scrivo *et al.*, 2011). Ainsi, l'inhibition de cette molécule semble intéressante dans le contrôle d'un processus inflammatoire chronique.

Nous avons montré également que les extraits éthanoliques étaient capables de diminuer la sécrétion du TNF $\alpha$  de manière concentration dépendante, mais cet effet est faible comparativement à l'inhibition de la production du NO. A l'opposé, les extraits aqueux n'ont pas montré d'activité inhibitrice significative sur la production de cette cytokine inflammatoire. Son pourcentage d'inhibition observé chez les extraits éthanoliques était comparable à celui trouvé par Chien *et al.* (2016) sur un extrait aqueux issu du sporophore de Shiitake. Nous n'avons trouvé aucune différence significative du point de vue statistique entre les 3 producteurs.

Nos résultats ont donc montré que les extraits éthanoliques (inhibition du NO et du TNF $\alpha$ ) avaient une réelle activité anti-inflammatoire *in vitro* comparativement aux extraits aqueux.

Les effets des extraits polaires sur l'inhibition de la production des molécules inflammatoires (NO et TNF $\alpha$ ) pourraient trouver son explication par la présence éventuelle de certaines molécules bioactives du Shiitake. En effet, certaines parmi elles présentent des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* qui sont décrites dans la littérature. C'est le cas de l'ergothioneine, la lenthionine et les composés phénoliques (Ito *et al.*, 2011 ; Chien *et al.*, 2016).

Selon des travaux réalisés en République Tchèque, la lenthionine est également capable de diminuer de manière significative la production des cytokines inflammatoires tel que le TNF $\alpha$  et pourrait dans ce cas être en partie responsable de l'effet anti-inflammatoire observé du Shiitake (Kupcova *et al.*, 2018).

D'autres études *in vitro* ont attribué la capacité anti-inflammatoire observée chez les extraits polaires de *Lentinula edodes* aux polysaccharides contenus dans ce champignon, notamment le Lentinane (Tomassen *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2012).

Concernant le mécanisme d'action, plusieurs possibilités ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles la voie du NF-kB. Le NF-kB est un facteur de transcription composé d'un complexe protéique localisé au niveau du cytoplasme et associé à l'inhibiteur I $\kappa$ B (Baud & Jacque, 2008 ; Suryavanshi *et al.*, 2017). En réponse à divers stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ ), l'IFN $\gamma$ , les protéines virales, les produits bactériens tels que le LPS ou les radiations UV, l'inhibiteur I $\kappa$ B est phosphorylé par la kinase IKK puis dégradé (Bonizzi & Karin, 2004 ; Baud & Jacque, 2008, Coutois *et al.*, 2006). Cette dégradation favorise l'activation du NF-kB ainsi que sa libération pour rejoindre le noyau cellulaire où, il se fixe sur des gènes inflammatoires (active la transcription des gènes spécifiques) (Tak & Firestein, 2001). Ce qui va aboutir à la synthèse des cytokines et des médiateurs inflammatoires notamment le TNF $\alpha$  et le NO (Bonizzi & Karin, 2004).

Le facteur transcriptionnel NF-KB est connu pour son rôle primordial dans la réponse immunitaire et les réactions inflammatoires. Son activation dérégulée contribue favorablement à l'apparition de diverses maladies inflammatoires. Donc, l'inhibition de cette voie empêche ou ralentit la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Bonizzi & Karin, 2004 ; Liu *et al.*, 2017 ; Suryavanshi *et al.*, 2017). Elle constitue de ce fait, une cible thérapeutique explorée par les scientifiques et la médecine moderne pour soigner les pathologies inflammatoires et tumorales qui sévissent dans la société (Coutois *et al.*, 2006).



Dans notre cas, l'inhibition par les extraits de la production du NO induite par le LPS et l'IFN $\gamma$  chez les macrophages pourrait être liée à l'inhibition de l'expression de l'enzyme inductible, la nitric oxide synthase (iNOS) responsable de la synthèse du NO, cette enzyme étant sous le contrôle de NF-KB. De même, l'effet des extraits éthanoliques sur l'inhibition du TNF $\alpha$  pourrait être du à l'inhibition de sa transcription, puisque cette cytokine inflammatoire est également sous le contrôle de NF-KB. L'inflammation étant un processus complexe impliquant d'autres cytokines en plus du NO et du TNF $\alpha$ , il est primordial de réaliser des études supplémentaires pour évaluer l'effet des extraits sur d'autres médiateurs inflammatoires, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués.

## Conclusion et perspectives

Le Shiitake est un champignon comestible largement cultivé et commercialisé en Asie, aux Etats-Unis mais aussi en Europe. Très apprécié pour son goût parfumé, il est vendu frais ou sec sous le nom de Lentin du chêne en raison de sa richesse en protéines, en fibres, en minéraux et pauvre en calories. Le Shiitake a de multiples propriétés pharmacologiques (propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, hypoglycémiques, anticancéreuses). Toutes fois peu de travaux scientifiques ont été effectués en tenant compte de l'influence des conditions de culture sur ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. S'appuyant donc sur ce constat, l'objectif de ce travail a été d'évaluer et de comparer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de sporophores de différents producteurs issus d'une souche identique de Shiitake (Mycelia-3782) et achetés à trois (3) producteurs de la région Occitanie Française.

Tout d'abord, nous avons réalisé une extraction séquentielle utilisant 4 solvants de polarité croissante. Les extraits obtenus ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. Le screening phytochimique des extraits nous a permis d'avoir un aperçu général de la nature des différents constituants que l'on peut rencontrer dans ces extraits en mettant en évidence quelques classes de molécules notamment : les polyphénols, les acides aminés et des molécules anti-oxydantes qui ont été révélés par des réactifs spécifiques.

La caractérisation des extraits par chromatographie en phase liquide a permis d'identifier comme stérols, l'ergostérol. Sa quantification a conduit à mettre en évidence une forte teneur dans les extraits cyclohexaniques et chloroformiques. La teneur était plus importante chez le producteur Bio (utilisant un mélange de sciures de chataigniers et du son de blé comme substrat de culture) que les 2 autres. La chromatographie sur couche mince a permis quant à elle d'identifier et de quantifier quelques acides aminés, notamment : l'alanine, l'isoleucine et la valine. Ils étaient majoritairement dans les extraits éthanoliques du producteur Bio. Malgré les résultats des études phytochimiques attestant de la présence de polyphénols dans les extraits des différents producteurs, aucun des témoins testés n'a été mis en évidence. Par contre, l'acide ascorbique a été détecté dans les extraits polaires lors de ce travail par chromatographie sur couche mince et confirmé par la chromatographie liquide haute performance.

La caractérisation des extraits par CCM et CLHP indique également l'absence d' $\alpha$ -tocophérol dans les extraits de Shiitake provenant des trois producteurs.

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin Ciocalteu montrent que les extraits apolaires (extraits cyclohexaniques) ont la teneur la plus importante suivi par les extraits aqueux pour les producteurs A et B.

L'évaluation du pouvoir anti-radicalaire des extraits issus des 3 producteurs par la méthode de DPPH et d'ORAC a montré que dans l'ensemble tous les extraits avaient une activité antioxydante modérée, mais plus prononcée chez les extraits aqueux (extraits 4). Ceci donne l'impression que ces extraits renferment de puissants composés actifs capables de réduire les radicaux libres, puisqu'ils agissent à des plus ou moins faibles concentrations.

Nos travaux ont montré que le potentiel antioxydant des extraits apolaires des 3 producteurs pouvait être expliqué en partie par la présence d'ergostérol. Néanmoins, pour le test au réactif de Folin-Ciocalteu, l'ergostérol apparaît comme un faux positif, dont la présence dans les extraits apolaires surestime les valeurs obtenues lors du test au Folin. En ce qui concerne le test au DPPH, nos résultats montrent que l'ergostérol ne peut pas expliquer le potentiel antioxydant des extraits apolaires. D'autres composés sont impliqués. Il peut s'agir de composés proches de l'ergostérol ou de l' $\alpha$ -tocophérol. En parallèle des dégradations d'ergostérol et  $\alpha$ -tocophérol ont été menées pour tenter d'identifier ces composés, mais n'ont pas permis de les retrouver dans les extraits. Quant aux extraits aqueux, leurs activités pourraient s'expliquer par la présence des composés comme l'acide ascorbique qui a été mis en évidence par chromatographie sur couche mince.

Selon donc les résultats présentés dans cette étude, la consommation d'extraits de champignon pourrait conférer un certain degré de potentielle antioxydante et participer à la protection des cellules de l'organisme contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, considérés comme étant l'une des sources des maladies non transmissibles. Néanmoins, il faut préciser que dans certaines études, les bienfaits d'antioxydants tels que le  $\beta$ -carotène et la vitamine E sur la santé sont ambigus et paradoxaux.

Des travaux supplémentaires utilisant d'autres approches *in vivo*, permettraient d'examiner en profondeur le potentiel des extraits à réduire les radicaux libres impliqués dans le stress oxydatif.

Par ailleurs, les extraits apolaires (extraits éthanoliques et aqueux) des 3 producteurs ont démontré en utilisant un modèle de macrophages J774A.1, un effet concentration dépendante sur la production du NO lorsque les cellules sont prétraitées pendant 4 heures avant leur

activation par le LPS/IFN $\gamma$  avec absence de cytotoxicité vis-à-vis des macrophages pour des concentrations inférieures ou égales à 50  $\mu$ g/ml. Cette activité anti-inflammatoire est plus importante chez les extraits éthanoliques. Nous avons également montré que la forte inhibition de l'oxyde nitrique n'était pas due à un piégeage du NO. Nous nous sommes alors intéressés au TNF $\alpha$  qui est une molécule pro-inflammatoire pour examiner l'effet du traitement des cellules par les extraits apolaires sur sa production. Nos travaux ont montré que le TNF $\alpha$  sécrété dans les surnageants cellulaires des macrophages prétraités par les extraits éthanoliques de Shiitake était inhibé de manière concentration dépendante, contrairement aux extraits aqueux qui n'ont pas d'effet sur cette molécule.

Cette étude montre que si les conditions de cultures du Shiitake influencent de façon significative la teneur de certaines molécules notamment l'ergostérol et les acides aminés et le pouvoir antioxydant, elles n'affectent pas son potentiel anti-inflammatoire *in vitro*. Les résultats obtenus sont cependant préliminaires et n'ont pas permis lors de ce travail d'élucider les mécanismes responsables de la bioactivité des extraits testés.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour étudier les principaux composants actifs des extraits responsables de cette activité anti-inflammatoire ainsi que les différents mécanismes d'action impliqués. Il s'agira en particulier d'explorer l'effet des extraits sur l'activation de la voie NF-kB qui est considéré comme le facteur de transcription clé dans l'inflammation. En plus, des recherches sont à envisager pour évaluer les extraits sur d'autres molécules inflammatoires, tels que les cytokines ou des messagers secondaires.

D'autre part, nous n'avons pas testé les extraits apolaires pour leur pouvoir anti-inflammatoire à cause des raisons déjà évoquées, il serait donc intéressant d'évaluer leurs effets sur l'inflammation puisque la caractérisation montrent que ces extraits sont très riches en ergostérol qui est aussi une molécule à haute activité biologique dont les effets sont largement décrits dans la littérature.

## Références bibliographiques

**Acharya K, Mukherjee S, Mitra P.** Pharmacognostic standardisation of *Lentinula Edodes*: A widely explored medicinal mushroom. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2015;7(4):866—872.

**Adib-Conquy M, Cavaillon JM.** Réponse inflammatoire et anti-inflammatoire de l'hôte au cours du sepsis. Pathologie Biologie. 2012;60(5):306—313.

**Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.** <https://ciqual.anses.fr/>

**Aji IM.** Development and production of *Lentinula edodes* (Shiitake mushrooms) on inoculated logs of a range of tree species. Submitted in total fulfilment of the requirement for the degree of Master of Forest Science. University of Melbourne, Australia, 2009. 94 p.

**Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, Kawase M, Yagi K.** Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004;27(12): 1957—1960.

**Akowauh GA, Zhari I, Norgyati I, Sadikun A, Khamsah SM.** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chemistry. 2004;87: 559—566.

**Akyuz M, Onganer AN, Erecevit P, Kirbag S.** Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of turkey. Gazi University Journal of Science. 2010;23(2): 125—130.

**Alarcon-Gutierrez E.** Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de doctorat en biologie des populations et ecologie, Université Paul Cézanne, France, 2007. 241 p.

**Alexandre-Tudo JL, Du Toit W.** The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. In Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages 2018. IntechOpen.

**Alemu F.** Cultivation of Shiitake Mushroom on Corn Bran (Agricultural by-Product) at Dilla University, Ethiopia. *International Journal of Applied Science*. 2014;1(1): 037—048.

**Ales P, Escaut A, Choulet JC.** Polysaccharide extract of *Lentinus* and pharmaceutical, cosmetic or nutraceutical compositions comprising such an extract. European Patent Office. US 2009/0270343 A1.

**Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM.** Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;139(2):189—212.

**Almaksour Z, Boudard F, Villareal M, Grosmaire L, Guzman C, Isoda H, Larroque M, Margout D.** Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of different extra virgin olive oil varieties extracts. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2017;3(2):163—183.

**Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR.** Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in immunology* 2018;9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379.

**Avcı E, Avcı GA, Kose DA.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of medically important mushrooms using different solvents and chemical composition via GC/MS analyses. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014;2(8):429—434.

**Azofeifa G, Quesada S, Boudard F, Morena M, Cristol JP, Perez AM, Vaillant F, Michel A.** Antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activities of phenolic compounds from tropical highland Blackberry (*Rubus adenotrichos*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(24):5798—5804.

**Bak WC, Park JH, Park YA, Ka KH.** Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. *Mycobiology*. 2014;42(3):301—304.

**Bakasso S.** Études phytochimiques et potentialités biologiques de cinq espèces d'indigofera (fabaceae) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso. Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 2009. 154 p.

**Baker RG, Hayden MS, Ghosh S.** NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism*. 2011;13(1):11—22.

**Bakır KT, Boufars M, Karadeniz M, Ünal S.** Amino acid composition and antioxidant properties of five edible mushroom species from Kastamonu, Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2018;15(2):80—87.

**Balbi ME, Fabeni F, Lazinski LM, Melo ACS, Souza HF.** Análise nutricional e perfil aminoacídico de cogumelos Shitake (*Lentinus edodes*, Agaricaceae). *Visão Acadêmica*, Curitiba. 2013;14(4):49—61.

**Barreira JCM, Beatriz MPP, Ferreira ICFR.** Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. *Food Analytical Methods*. 2014;7(1):217—223.

**Bartrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG.** 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1991;1(11):611—614.

**Baud V, Jacque E.** Voie alternative d'activation de NF-kB et cancer. Amis ou ennemis? *Médecine/ Sciences*. 2008;24(12):1083—1088.

**Becker DE.** Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. *Anesthesia Progress*. 2013;60(1):25—32.

**Beck-Nielsen H, Henriksen JE, Vaag A, Hother-Nielsen O.** Pathophysiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1995;28:13—25.

**Benamar M.** Valorisation des résidus agricoles par la culture de 2 souches de champignons comestibles du genre pleurotus. Thèse de sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie. 2006. 257 p.

**Bender S, Dumitrache CN, Backhaus J, Christie G, Cross RF, Lonergan GT.** A case for caution in assessing the antibiotic activity of extracts of culinary-medicinal Shiitake mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.)Singer] (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2003;5(1):31—35.

**Benlemlih M, Ghanam J.** Polyphénols d'huile d'olive, trésors santé! *Medicatrix*. Embourg, Belgique, 2016. 208p.

**Benson KF, Ager DM, Landes B, Aruoma OI, Jensen GS.** Improvement of joint range of motion (ROM) and reduction of chronic pain after consumption of an ergothioneine-containing nutritional supplement. *Preventive Medicine*. 2012;54:S83—S89.

**Bernaś E, Jaworska G, Kmiecik W.** Storage and processing of edible mushrooms. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2006;5(2):5—23.

**Bigioni JW.** Culture du shiitake ou Lentin du Japon et méthodes pratiques et familles de conservation des champignons supérieurs. Thèse de pharmacie, Université de Montpellier 1, France, 1996. 98 p.

**Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad GBKS.** *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(22):2419—2430.

**Bogdan C.** Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*. 2015;36(3):161—178.

**Bonizzi G, Karin M.** The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*. 2001;25(6):280—288.

**Bony E.** Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*astrocaryum vulgare* m.). Thèse de doctorat, Université Montpellier 2, Sciences et Techniques du Languedoc, France, 2010. 236 p.

**Boonsong S, Klaypradit W, Wilaipun P.** Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *ANRES*. 2016;50:89—97.

**Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CK, Gershwin ME.** Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1999;221(4):281—293.

**Bouchet PH, Guignard JL, Villard J.** Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson: Paris, 1999. 194 p.

**Boudard F, Vallot N, Cabaner C, Bastide M.** Chemiluminescence and nitrite determination of MALU macrophage cell line. *Journal of Immunological Methods*. 1994;174(1-2):259—268.



**Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debre P, Gandjbakhch I.** The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2004;26(5):932—938.

**Bramki M, Nekia A.** Recherche des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotus eryngii* et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 2016. 79 p.

**Cao G, Prior RL.** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 1998;44(6):1309—1315.

**Capet C, Druesne L, Chassagne PH, Doucet J.** Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *Revue Gériatr*. 2001;26:379—384.

**Carbonero ER, Gracher AHP, Komura DL, Marcon R, Freitas CS, Baggio CH, Santos ARS, Torri G, Gorin PAJ, Iacomini M.** *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry*. 2008;111(3):531—537.

**Carip C.** Biologie appliquée à la santé. 2ème édition, collection BTS économie sociale et familiale. Lavoisier, paris, France, 2010. 313—315.

**Carmona B.** Les probiotiques (bactéries et levures) : où en est-on aujourd'hui ? Thèse de pharmacie, Université Montpellier, France, 2016. 116 p.

**Carneiro AA, Ferreira IC, Dueñas M, Barros L, Da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C.** Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*. 2013;138(4):2168—2173.

**Cassar A.** La culture des macromycètes entrant dans la composition des compléments alimentaires. Thèse de pharmacie, Université Montpellier 1, France, 2016. 165 p.

**Castan C.** La levure de bière : un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté. Thèse de pharmacie, Université Montpellier, France 2016. 89 p.

**Chakravarty B.** Trends in mushroom cultivation and breeding. *Australian Journal of Agricultural Engineering*. 2011;2(4):102—109.

**Chan GCF, Chan WK, Sze DMY.** The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*. 2009;2(25):1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25>.

**Chang S, Miles PG.** *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2nd ed. CRC Press LLC, New York, USA, 2004. 447 p.

**Chen AW, Kwon H, Hobbs C.** *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake cultivation*. Seoul, Korea: MushWorld, 2005. 292 p.

**Chen AW.** Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs. *Mushroom Growers' Newsletter*. 2001;10(4): 3—9.

**Chen DI, Dou QP.** Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;9(7):1196—1206.

**Chen H, Ju Y, Li J, Yu M.** Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention. *Int J Biol Macromol*. 2012;50:214—218.

**Chen J, Raymond K.** Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management*. 2008;4(6):1265—1272.

**Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R.** Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 2014;59: 16—40.

**Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC.** Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 2003;81(2):249—255.

**Chien RC, Lin LM, Chang YH, Lin YC, Wu PH, Asatiani MD, Wasser SG, Krakhmalnyi M, Agbarya A, Wasser SP, Mau JL.** Anti-inflammation properties of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2016;18(11):999—1009.

**Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Arai Y, Fukuoka F.** Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature*. 1970a;225(5236):943—944.

**Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Arai Y, Fukuoka F.** Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Research*. 1970b;30(11):2776—2781.

**Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Shiio T, Suga T, Takasuka N, Sasaki T.** Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer detection and prevention. Supplement.* 1987;1:423—443.

**Chihara G, Maeda YY, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F.** Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.). *Sing Nature.* 1969;222(5194):687—688.

**Ching-yu H.** Evaluation of antioxidant properties of some commercially available culinary and medicinal mushrooms from Taiwan. Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. Newcastle University, United Kingdom, 2013. 200 p.

**Cho DB, Seo HY, Kim KS.** Analysis of the volatile flavor compounds produced during the growth stages of the shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *Journal Food Science and Nutrition.* 2003;8(4):306—314.

**Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ.** Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin.* 2012;87:144—153.

**Choi EJ, Park ZY, Kim EK.** Chemical composition and inhibitory effect of *Lentinula edodes* ethanolic extract on experimentally induced atopic dermatitis *in vitro* and *in vivo*. *Molecules.* 2016;21(8):993, 13 p.

**Choi S, Saxena N, Dhammu T, Khan M, Singh AK, Singh I, Won J.** Regulation of endothelial barrier integrity by redox-dependent nitric oxide signaling: Implication in traumatic and inflammatory brain injuries. *Nitric Oxide.* 2018;1(83):83—51.

**Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J.** Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry.* 2006;99(2):381—387.

**Chowdhury MMH, Kubra K, Ahmed SR.** Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2015;14(8):1—6.

**Cicolella A.** Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. *Revue des Maladies Respiratoires.* 2008;25(2):155—163.

**Ćilerdžić J, Galić M, Vukojević J, Stajić M.** *Pleurotus ostreatus* and *Laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes): Possible agents against Alzheimer and Parkinson diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2019;21(3):275—289.

**Ciric L, Tymon A, Zaura E, Lingstrom P, Stauder M, Papetti A, Signoretto C, Pratten J, Wilson M, Spratt D.** *In vitro* assessment of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) extract for its antigingivitis activity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:1—7.

**Clemenzi MN, Wellhauser L, Aljghami ME, Belsham DD.** Tumour necrosis factor alpha induces neuroinflammation and insulin resistance in immortalized hypothalamic neurons through independent pathways. *Journal of Neuroendocrinology*. 2018;31(1):1—11.

**Costa LMS, de Carvalho Sousa MA, Souza TP, Duarte WF, Zied DC, Rinker DL, Dias ES.** HS-SPME/GC-MS Assisted Analysis of Volatile Constituents in Different Strains of Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2019;21(7):693—702.

**Coste E.** Trente-sept plantes chinoises (Magnoliidae, Ranunculidae, Asteridae) : Caractères botaniques, étude pharmacologique et intérêt thérapeutique. Thèse de pharmacie, Université Montpellier 1, France, 2015. 260 p.

**Courtecuisse R, Duhem B.** Guide des champignons de France et d'Europe. 172 espèces décrites et illustrées. Delachaux et Niestlé, Paris, France, 2011. 544p.

**Courtois G, Agou F, Michel L.** Inhibition pharmacologique de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. *Hématologie*. 2006;12(1):50—60.

**Coutinho AE, Chapman KE.** The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;335(1):2—13.

**Crea F, Biasucci LM.** Innate immune inflammatory response to danger: when, how, and why does a friend become a foe? *European Heart Journal*. 2012;33:1434—1437. doi:10.1093/eurheartj/ehs033.

**Crea F, Biasucci LM.** Innate immune inflammatory response to danger: when, how, and why does a friend become a foe?. *European Heart Journal*. 2012;33:1434—1437.

**Da Eira FC, Meirelles WF, Paccola – Meirelles LD.** Shiitake production in corn cob substrates. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2005;4(2):141—148.

**Da Silva AC, Jorge N.** Antioxidant properties of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts. *Journal of Food Quality*. 2011;34:386—394.

**Dahboul F.** Évaluations physico-chimique, biochimique et pharmacologique de S-nitrosothiols: rôle des enzymes membranaires dans la libération de l'oxyde nitrique. Doctoral dissertation, Université de Lorraine, 2013. 192 p.

**Danielson M, Reinsfelt B, Westerlind A, Zetterberg H, Blennow K, Ricksten SE.** Effects of methylprednisolone on blood-brain barrier and cerebral inflammation in cardiac surgery—a randomized trial. *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1):283.

**Dejean C, Richard D.** Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. *La Revue de Medecine Interne*. 2013;34(5):265—268.

**De Melo Macoris JD, Brugnari T, Boer CG, Contato AG, Peralta RM, de Souza CG.** Antioxidant Properties and antimicrobial potential of aqueous extract of basidioma from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.(Shiitake). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017;6(9):3757—3767.

**De Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*. 2006;1112(1-2):31—63.

**De Silva DD, Rapior S, Hyde KD, Bahkali AH.** Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*. 2012;56(1):1—29.

**De Silva DD, Rapior S, Sudarman E, Stadler M, Xu J, Alias AS, Hyde KD.** Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*. 2013;62:1—40.

**Denes E.** Les infections fongiques systémiques. *Actualités Pharmaceutiques Hospitalières*. 2005;1(3):12—14.

**Del Buono A, Bonucci M, Pugliese S, D'ORTA A, Fioranelli M.** Polysaccharide from *Lentinus edodes* for integrative cancer treatment: immunomodulatory effects on lymphocyte population. *World Cancer Research Journal*. 2016;3(1):1—7.

**Del Carlo M, Sacchetti G, Di Mattia C, Compagnone D, Mastrocola D, Liberatore L, Cichelli A.** Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(13):4072—4079.

**Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D.** Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 p.

**Dermiki M, Phanphensophon N, Mottram DS, Methven L.** Contributions of non-volatile and volatile compounds to the umami taste and overall flavour of shiitake mushroom extracts and their application as flavour enhancers in cooked minced meat. *Food Chemistry*. 2013;141(1):77–83.

**Dhingra AK, Chopra B, Bonthagarala B.** Natural Anti-Inflammatory Agents: Recent Progress and Future Perspectives. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*. 2018;3(5);1158.

**Diallo I, Michel A, Poucheret P, Morel S, Vitou M, Traoré L, Rapior S, Fons F.** *Lentinula edodes* (Shiitake), an edible nutritional and medicinal mushroom: health benefits and risks. iCEPS Conference 2017, 5ème édition. Non-pharmacological interventions: from methodology to evidence of efficacy (Montpellier, France, 18-20/05/2017a). Poster E9. hal-02267085.

**Diallo I, Michel A, Poucheret P, Morel S, Vitou M, Traoré L, Rapior S, Fons F.** *Lentinula edodes* (Shiitake): Intérêt nutritionnel, potentiel thérapeutique et risques. 27èmes Journées Scientifiques des Enseignants-Chercheurs en Sciences Végétales et Fongiques des UFR de Pharmacie francophones STOLON (Dijon, France, 28-30/08/2017c). hal-02267097.

**Diallo I, Michel A, Poucheret P, Morel S, Vitou M, Traoré L, Rapior S, Fons F.** *Lentinula edodes* (Shiitake) et cancer : Propriétés pharmacologiques, essais cliniques et preuves d'efficacité. iCEPS Conférence 2018, 6ème édition. Cancer : l'efficacité des Interactions Non Médicamenteuses (Montpellier, France, 23/03/2018). hal-02267074

**Diallo I, Morel S, Michel A, Poucheret P, Vitou M, Traoré L, Rapior S, Fons F.** Nutritional and antioxidant properties of *Lentinula edodes* (Shiitake) from various culture conditions. 5ème Symposium International AFERP « Pharmacognosy from here and there » (Angers, France, 17-19/07/2017b). Poster 19, page 51. hal-02267094.

**Diallo I, Morel S, Rapior S, Traoré L, Michel A, Poucheret P, Vitou M, Fons F.** Potentiel antioxydant de *Lentinula edodes* (Shiitake) issu de différents modes de culture. 7ème Journées Scientifiques de l'Agro-alimentaire (JSAA-2019) (Hammamet, Tunisie du 17 au 20 Mars 2019).

**Dieu A.** Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique. Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs. Thèse de doctorat en chimie appliquée, Université Limoges, France, 2015. 340 p.

**Douguet L.** Conséquences de l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) sur les fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$  au cours du développement du mélanome. Thèse de doctorat, Sorbonne Paris Cité, 2015. 159 p.

**Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, Daninos JM, Balarac N, Sauvanet JP.** Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolism*. 1999;25(1):72—83.

**Du B, Zhu F, Xu B.** An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms. *Journal of Functional Foods*. 2018;47: 334–342.

**Dubost NJ, Ou B, Beelman RB.** Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2007;105:727—735.

**Dworski R, Fitzgerald GA, Oates JA, Sheller JR.** Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994;149(4):953—959.

**Elisashvili V, Kachlishvili E, Asatiani MD.** Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (higher Basidiomycetes) productivity and lignocellulolytic enzyme profiles during wheat straw and tree leaf bioconversion. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015;17(1):77—86.

**El Rayess Y, Barbar R, Wilson EA, Bouajila J.** Analytical methods for wine polyphenols analysis and for their antioxidant activity evaluation. *Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits*. Editor : El Rayess Y, Nova Science Publishers, New York, USA, 2014. 71—101 p.

**Enman J, Rova U, Berglund KA.** Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4):1177—1180.

**Erdogan B, Is M, Aker FV, Emon ST, Engin T, Akar EA, Sayman E, Somay H.** Preventative effect of diclofenac sodium and/or diltiazem in rats with epidural fibrosis. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2019;120(11):813—818.

**Evans P. Halliwell B.** Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;8(884):19—40.

**Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW.** Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(14):8139—8144.

**Ezzudin MR, Rabeta MS, Shaida Fariza S, Leong Ooi K, Nurul Shafiqah H.** Primary and secondary antioxidant activities of nine edible mushrooms species. *Food Research*. 2019;3(1):14—20.

**Fang N, Li Q, Yu S, Zhang J, He L, Ronis MJ, Badger TM.** Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by an ethyl acetate fraction from shiitake mushrooms. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*. 2006;12(2):125—132.

**Farkas O, Jakus J, Heberger K.** Quantitative structure–antioxidant activity relationships of flavonoid compounds. *Molecules*. 2004;9(12):1079—1088.

**Favier A.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*. 2003;(11-12):108—115.

**Favier A.** Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises*, Elsevier Masson, Paris, France, 2006. 64(6):390—396 p.

**Ferrari GP, Soares AA, Bazanella GCD, Bracht A, De Souza CGM, Boer CG, Peralta RM.** Antioxidant properties of the most common edible mushrooms consumed in Brazil. In book: *Mushrooms: Types, Properties and Nutrition*. Nova Science Publishers Inc. New York, USA, 2012. 285—297 p.



**Ferreira ICFR, Barros L, Abreu RMV.** Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16:1543—1560.

**Finimundy TC, Dillon AJP, Henriques JAP, Ely MR.** A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. *Food and Nutrition Sciences*. 2014;5:1095—1105.

**Fofana S.** Etude des effets antiradicalaires et anti-lipoxygénases des extraits de *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae). Diplôme d'Etudes Approfondies en pharmacologie appliquée, Université de Ougadougou, Burkina Faso, 2011. 107 p.

**Foley WJ, Iason GR, McArthur C.** Rôle of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores - how far have we come in 25 years? In: *Nutritional ecology of herbivores: Proceedings of the 5th International Symposium on the Nutrition of Herbivores*. In: Jung, H-JG, Fahey, GC, editors, American Society of Animal Science. Savoy, 1999. 130-209 p.

**Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK.** Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*. 2018;122:877—902.

**Friedman M.** Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*. 2016;5(4):80.

**Fu HY, Shieh DE, Ho CT.** Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Edible Mushrooms. *Journal of Food Lipids*. 2002;9:35—46.

**Gábor K.** The examination of UV absorption of polyphenols (Natural Substances, in UV Protection). *Hadmérnök*. 2013;8(3):288—293.

**Gaitan-Hernandez R, Zavaleta MAB, Aquino-Bolaños EN.** Productivity, physicochemical changes, and antioxidant activity of Shiitake culinary-medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) cultivated on lignocellulosic residues. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2017;19(11):1041—1052.

**Ganeshpurkar A, Rai G, Jain AP.** Medicinal mushrooms: towards a new horizon. *Pharmacognosy Review*. 2010;4(8):127—135.

**Gao YH, Tang W, Gao H, Chan E, Lan J, Li X, Zhou S.** Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International*. 2005;21(2):211—229.

**Garcia-Moll X, Kaski JC.** Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*. 2005;52(11):990—1003.

**Geng Y, Zhu S, Lu Z, Xu H, Shi JS, Xu ZH.** Anti-inflammatory Activity of Mycelial Extracts from Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2014;16(4):319—325.

**Genthon L.** Etude et identification des composés cytotoxiques issus d'un champignon de la forêt boréale québécoise. Thèse du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Nantes, France, 2015. 74 p.

**Gharby S, Harhar H, Bouzoubaa Z, Roudani Z, Chafchaoui I, Kartah B, Charrouf Z.** Effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol (Effect of polyphenols extracts from margins on the stability of sunflower oil). *Journal of Materials and Environmental Science*. 2014;5(2):464—469.

**Ghosh K.** A Review Mushrooms: A Source of Immunomodulating and Antitumor Polysaccharides. *Journal of Physical Sciences*. 2015;20:239—252.

**Gil-Ramirez A, Caz V, Smiderie FR, Martin-Hernandez R, Largo C, Taberero M, Marin FR.** Water-Soluble Compounds from *Lentinula edodes* Influencing the HMG-CoA Reductase Activity and the Expression of Genes Involved in the Cholesterol Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(9):1910—1920.

**Givelet P.** Compléments alimentaires à base de champignons. Thèse de pharmacie, Université de Lille2, France, 2011. 92 p.

**Gomes DC, de Alencar MV, dos Reis AC, de Lima RM, de Oliveira Santos JV, da Mata AM, Dias AC, da Costa Junior JS, de Medeiros MD, Paz MF, e Sousa JM.** Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic/antitumoral bioactives from the phylum Basidiomycota and their possible mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;112:108643.

**Gomez I, Foudi N, Longrois D, Norel X.** The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2013;89(2-3):55—63.

**Grandin M.** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Thèse de pharmacie, Université d'Angers, France, 2013. 116 p.

**Greeshma P, Ravikumar KS, Neethu MN, Pandey M, Zuhara KF, Janardhanan KK.** Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of cultured mycelia and fruiting bodies of the elm oyster mushroom, *hypsizyguus ulmarius* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2016;18(3):235–244.

**Grotto D, Bueno DC, Ramos GK, DA Costa SR, Spim SR, Gerenutti M.** Assessment of the safety of the shiitake culinary-medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes), in Rats: Biochemical, Hematological, and Antioxidative Parameters. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2016;18(10):861—870.

**Guissou KML, Sanon E, Sankara P, Guinko S.** La mycothérapie au Burkina Faso : État des lieux et Perspectives. *Journal of Applied Biosciences*. 2014;79:6896 —6908.

**Gunawardena D, Bennett L, Shanmugam K, King K, Williams R, Zabarar D, Head R, Ooi L, Gyengesi G, Münch G.** Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon  $\gamma$  activated murine macrophages. *Food Chemistry*. 2014;148:92—96.

**Gunawardena D, Shanmugam K, Govindaraghavan S, Low M, Bennett L, Head R, Ooi L, Munch G.** Determination of anti-inflammatory activities of standardised preparations of plant- and mushroom-based foods. *European Journal of Nutrition*. 2014;53(1):335—343.

**Gupta S, Summuna B, Gupta M, Annepu SK.** Edible mushrooms: cultivation, bioactive molecules, and health benefits. In: Me´rillon JM, Ramawat K (eds) *Bioactive molecules in food*. Springer, Berlin, 2018. 1—33 p.

**Gutteridge JM.** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Research Communications*. 1993;19(3):141—158.

**Guzik T, Korbut R, Adamek-Guzik T.** Nitric oxide and superoxide in inflammation. *Journal of physiology and pharmacology*. 2003;54:469—487.

**Haimed M.** Biodiversité fongique du Maroc : Etude des champignons Basidiomycètes du Plateau Central et des Jardins Exotiques. Thèse de doctorat, Université ibn Tofail, Maroc, 2007. 299 p.

**Haioun A, Zohra HF.** Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité de la

Anethume Graveolens. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 2015. 29—36 p.

**Hajjaj G.** Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de matricaria chamomilla l. et de l'ormenis mixta l. (asteraceae). Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc, 2017. 216 p.

**Hajzadeh MAR, Rajaei Z, Ghamami G, Tamiz A.** The effect of salvia officinalis leaf extract on blood glucose in streptozotocin-diabetic rats. Pharmacologyonline. 2011;1:213—220.

**Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP.** Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège. 2007;62(10):628—638.

**Hamano K, Gohra H, Katoh T, Fujimura Y, Zempo N, Esato K.** The preoperative administration of lentinan ameliorated the impairment of natural killer activity after cardiopulmonary bypass. International Journal of Immunopharmacology. 1999;21(8):531—540.

**Han YH, Ueng WT, Chen LC, Cheng S.** Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Mushroom Science. 1981;11:623—658.

**Handayani D, Chen J, Meyer BJ, Huang XF.** Dietary shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) prevents fat deposition and lowers triglyceride in rats fed a high-fat diet. Journal of Obesity. 2011;2011(5): Article ID 258051, 8 pages.

**Hassan GS, Hegazy GH, Ibrahim NM, Fahim SH.** New ibuprofen derivatives as H<sub>2</sub>S and NO donors as safer anti-inflammatory agents. Future Medicinal Chemistry. 2019;11(23):3029—3045.

**Hashimoto F, Ono M, Masuoka C, Ito Y, Sakata Y, Shimizu K, Nonaka G, Nishioka I, Nohara T.** Evaluation of the anti-oxidative effect (in vitro) of tea polyphenols. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2003;67(2):396—401.

**Hassegawa RH, Kasuya MCM, Vanetti MCD.** Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. Electron Journal of Biotechnology. 2005;8(2): 212—217.

**Hatvani N.** Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001;7:71—74.

**Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, Yamamoto T, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Oka M.** Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan ( $\beta$ -1, 3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2009;29(7):2611—2617.

**Hearst R, Nelson D, Mccollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Rao JR, Moore JE.** An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2009;15:5—7.

**Heleno SA, Ferreira RC, Antonio AL, Queiroz MJRP, Barros L, Ferreira ICFR.** Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*. 2015;11:48—55.

**Heller W, Forkmann G.** Biosynthesis of the flavonoids. In: *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986*. Harborne (Ed.). Chapman & Hall, London, 1994. 499—536.

**Hemingway RW.** Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. In *Chemistry and significance of condensed tannins*. Springer, Boston, MA. 1989. 83-107 p.

**Hiraide M.** The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* III: substances that increase the odorous compound content. *Journal of Wood Science* 2006;52:265—69.

**Hirasawa M, Shouji N, Neta T, Fukushima K, Takada K.** Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999;11(2):151—157.

**Hirayama D, Iida T, Nakase H.** The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;19(1). pii: E92. doi: 10.3390/ijms19010092.

**Hobbs CH.** *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture*, 2nd Ed. Botanica Press Inc.: Santa Cruz, CA, USA. 1995. 252 p.

**Hussain SP, He P, Subleski J, Hofseth LJ, Trivers GE, Mechanic L, Hofseth AB, Bernard M, Schwank J, Nguyen G, Mathe E.** Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Research*. 2008;68(17):7130—7136.

**Ighodaro OM, Akinloye OA.** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54(4):287—293.

**Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F.** Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer research*. 1969;29(3):734—735.

**Ina K, Kataoka T, Ando T.** The Use of Lentinan for Treating Gastric Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2013;13(5):681—688.

**Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MCD.** Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001;32:206—210.

**Islam S, Moyen Uddin PKM.** Antihyperglycemic activity of edible mushroom, *Lentinus edodes* in alloxan induced diabetic swiss albino mice. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2014;6(2):121—126.

**Islam T, Ganesan K, Xu B.** New insight into mycochemical profiles and antioxidant potential of edible and medicinal mushrooms: A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2019;21(3):237—251.

**Islas-Flores I, Peraza-Echeverría L, Canto-Canché B, Rodríguez-García CM.** Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular biotechnology*. 2006;34(1):45—50.

**Ito T, Kato M, Tsuchida H, Harada E, Niwa T, Osawa T.** Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms. *Food Science and Technology Research*. 2011;17(2):103—110.

**Janes D, Kreft S, Jurc M, Seme K, Štrukelj B.** Antibacterial activity in higher fungi (Mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia. *Pharmaceutical Biology*. 2007;45(9):700—706.

**Jiang T, Wang Q, Xu S, Jahangir MM, Ying T.** Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(5):742—749.

**Kahl R, Kappus H.** Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung.* 1993;196(4):329—338.

**Kalalselvi MM, Vijayalakshmi GS.** Ascorbic acid content in three different fungi *Pleurotus* species from cotton waste. *Journal of Ecobiology.* 1996;8(1):077—078.

**Kalyoncu F, Oskay M, Kayalar H.** Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology.* 2010;1(3):195—199.

**Kapoor M, Shaw O, Appleton L.** Possible anti-inflammatory rôle of COX-2- derived prostaglandins: implications for inflammation research. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 2005;6(5):461—466.

**Katsinelos P, Lazaraki G, Anastasiadis S, Chatzimavroudis G, Katsinelos T, Terzoudis S, Gatopoulou A, Doulberis M, Papaefthymiou A, Kountouras J.** The impact of selective serotonin receptor inhibitors on post-endoscopic sphincterotomy bleeding, alone or with concurrent aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Gastroenterology.* 2019;32(6):614—619.

**Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K.** Prevention of type 1 diabetes: from the view point of  $\beta$ -cell damage. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2004;66: S27—S32.

**Kerfez K, Brik O.** Culture et clonage d'un tissu de champignon de paris (*Agaricus bisporus*) . Mémoire de master, Université Constantine 1, Algérie, 2015. 76p.

**Kettawan A, Chanlekha K, Kongkachuichai R, Charoensiri R.** Effects of cooking on antioxidant activities and polyphenol content of edible mushrooms commonly consumed in Thailand. *Pak J Nutr.* 2011;10(11):1094—1103.

**Khan N, Mukhtar H.** Tea polyphenols for health promotion. *Life Science.* 2007;81(7):519—533.

**Khatua S, Ghosh S, Acharya K.** Antioxidant properties and metabolites profiling of polyphenol-rich fraction from a folk mushroom, *Macrocybe lobayensis*, using different extractant. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences.* 2019;10(1):564—571.

**Khaund P, Joshi SR.** *Lentinula edodes* based GIS mapping, biometabolites and antiinflammatory activity of wild edible mushrooms from tropical ‘sacred grove’ forests of Meghalaya, India. *Revista de Biología Tropical*. 2016;64(1):247—257.

**Kim M, Seguin P, Ahn J, Kim J, Chun S, Kim E, Seo S, Kang E, Kim S, Park Y, Ro H, Chung I.** Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56:7265—7270.

**Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Tajima N.** Epidemiology of type 1 (insulin dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese children. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1994;24:S7—S13.

**Kitzberger CSG, Junior AS, Pedrosa RC, Ferreira SRS.** Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*. 2007;80(2):631—638.

**Klooster AR, Bernier SM.** Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor act additively to inhibit matrix gene expression by chondrocyte. *Arthritis! Research! & Therapy* 2005;7:127—138.

**Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E.** Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2005;4(4):471-479.

**Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, J Vunduk J, Petrovic P, Niksic M, Vrvic MM, Griensven LV.** Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*. 2015b;20:19489—19525.

**Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Vrvic MM, Todorovic N, Dragica Jakovljevic, Van Griensven LJLD.** Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012;26:144—153.

**Kozarski M, Klaus A, Vunduk J, Zizak Z, Niksic M, Jakovljevic D, Vrvic MM, Van Griensven LJLD.** Nutraceutical properties of the methanolic extract of edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries): Primary mechanisms. *Food & Function*. 2015a;6(6):1875—1886.



**Krittalak P, Panida P, Supaporn L, Nowwapan N, Takunrat T, Ubolwanna S.** Effect of drying process on the physicochemical properties and biological activities of enzymatic protein hydrolysate from Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). Chiang Mai Journal of Science. 2018;45(2):762—773.

**Kumar V, Sharma A, Kohli SK, Bali S, Sharma M, Kumar R, Bhardwaj R, Thukral AK.** Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. Biotechnology Research and Innovation. 2019;3(1):1—21.

**Kuntz S, Wenzel U, Daniel H.** Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. European Journal of Nutrition. 1999;38:133—142.

**Kupcova K, Stefanova I, Plavcova Z, Hosek J, Hrouzek P, Kubec R.** Antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and antioxidant activity of culinary processed Shiitake medicinal mushroom (*Lentinus edodes*, Agaricomycetes) and its major sulfur sensory-active compound-Lenthionine. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2018;20(2):165—175.

**Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T.** Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice. 2002;55(1):65—85.

**Lambrinoudaki I, Kaparos G, Papadimitriou T, Sergentanis TN, Creatsa M, Alexandrou M, Logothetis E, Christodoulakos G, Kouskouni E.** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with central adiposity and increased androgenicity in healthy postmenopausal women. European Journal of Endocrinology. 2008;159(3):233—241.

**Laurent P.** La culture du shiitake *Lentinula edodes*. Bulletin de la société mycologique de hautes vosges N°9, 2004. 8—15 p.

**Laviolle B, Bellissant E.** Les antagonistes du TNF $\alpha$  dans l'insuffisance cardiaque. La Lettre du pharmacologue. 2006;20(2):49—54.

**Le Guill E.** Les macromycètes : Une possibilité thérapeutique contre le cancer. Thèse de pharmacie, Université de Nantes, France, 2012. 94 p.

**Leatham GF, Stahmann MA.** Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. Transactions of the British Mycological Society. 1987;88(1):9—20.

**Lee J, Dosset M, Finn CE.** Rubus fruit phenolic research: The good, the bad and the confusing. Food chemistry. 2012;130(4):785—796.

**Le Thi Thu H, Nguyen Thi Van A, Thuc Thanh H, Nguyen Thi Dieu T, Le Thi Minh H.** Rôle des cytokines dans l'asthme. Journal Franco-vietnamien de Pneumologie. 2014;05(14):25—31.

**Li B, Kimatu BM, Pei F, Chen S, Feng X, Hu Q, Zhao L.** Non-volatile flavour components in *Lentinus edodes* after hot water blanching and microwave blanching, International Journal of Food Properties. 2017;20(3):S2532–S2542. DOI: 10.1080/10942912.2017.1373667.

**Li S, Wang A, Liu L, Tian G, Wei S, Xu F.** Evaluation of nutritional values of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) stipes. Journal of Food Measurement and Characterization. 2018;12(3):2012—2019.

**Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, Caruso C.** Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. Immunity and Ageing. 2005;2(8):1—14.

**Ligor M, Ratiu IA, Kielbasa A, Al-Suod H, Buszewski B.** Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. Electrophoresis. 2018;0:1—15.

**Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC.** NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. Signal transduction and targeted therapy. 2017;2:17023.

**López-Vázquez E, Prieto-García F, Gayosso-Canales M, Otazo Sánchez EM, Villagómez Ibarra JR.** Phenolic acids, flavonoids, ascorbic acid,  $\beta$ -glucans and antioxidant activity in mexican wild edible mushrooms. Italian Journal of Food Science. 2017;29:766—774.

**Madore C.** Plasticité morphofonctionnelle du système de l'immunité innée cérébrale : modulation par l'inflammation et la nutrition. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 2, 2013. 167 p.

**Maheshwari G, Sowrirajan S, Joseph B.** Extraction and Isolation of  $\beta$ -Glucan from Grain Sources - A Review. Journal of Food Science. 2017;82(7):1535—1545.

**Mah-Lee NG, Ann-Teck YAP.** Inhibition of human colon carcinoma development by Lentinan from Shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *Journal of Alternative Complementary Medicine*. 2002;8(5):581—589.

**Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L.** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79:727—747.

**Manallah A.** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas-Sétif, Algérie, 2012. 132 p.

**Mansour-Djaalab H.** Evaluation chimique et activité antidermatophyte de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse de doctorat en sciences, Université de Constantine 1, Algérie, 2014. 161 p.

**Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L.** Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*. 1999;65:477—482.

**Mao R, Zhang C, Chen J, Zhao G, Zhou R, Wang F, Xu J, Yang T, Su Y, Huang J, Wu Z, Cao L, Wang Y, Hu Y, Yuan C, Yi Z, Hong W, Wang Z, Peng D, Fang Y.** Different levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with unipolar and bipolar depression. *Journal of Affective Disorders*. 2018;237:65—72.

**Maroon JC, Bost JW, Maroon A.** Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*. 2010;1:80. doi: [10.4103/2152-7806.73804](https://doi.org/10.4103/2152-7806.73804).

**Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Chang CJ, Lin CS, Lai HC, Young JD.** Immunomodulatory properties of plants and mushrooms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017;38(11):967—981.

**Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 2002;51(6):304—315.

**Masoko P, Mokgotho MP, Mbazima VG, Mampuru LJ.** Biological activity of *Typha capensis* (Typhaceae) from Limpopo Province (South Africa). *African Journal of Biotechnology*. 2008;20:3743—3748.

**Mata G, Valdez K, Mendoza R, Trigos A.** HS/GC-MS analyzed chemical composition of the aroma of fruiting bodies of two species of genus *Lentinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2014;16(5):477—484.

**Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V.** Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(5):2343—2348.

**Mattila P, Salo-väänänen P, Könkö K, Aro H, Jalava T.** Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(22):6419—6422.

**McCoy R, Bruhn JN.** ‘Cultivating shiitake mushrooms through forest farming’ in agroforestry in action-growing shiitake mushroom in an agroforestry practice. Accessed 11 May 2018. From <<http://www.centerforagroforestry.org/pubs/mushguide.pdf>>.

**Mebirouk R.** Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-angiogénique. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie, 2017. 172 p.

**Medzhitov R.** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428—435.

**Melin C, Moulet AM, Dupin JF, Hartmann C.** Phénylalanine-ammoniaque lyase et composés phénoliques au cours de la maturation de la cerise. *Phytochemistry*. 1977;16(1):75—78.

**Merouane A, Noui A, Medjahed H, Nedjari Benhadj Ali K, Saadi A.** Activité antioxydante des composés phénoliques d’huile d’olive extraite par méthode traditionnelle. *International Journal of Biological Chemical and Sciences*. 2014;8(4):1865—1870.

**Migdal C, Serres M.** Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*. 2011;27(4):405—412.

**Miles PG, Chang ST.** *Mushroom biology: concise basics and current development*. World Scientific: Singapore, 1997. 193 p.

**Missaoui R.** Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis L.*). Université Laval Québec, Canada, 2018. 98 p.

**Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A.** Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(1):1—10.

**Mizuno T.** Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International*. 1995;11:7—21.

**Mizuno TA.** Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods & food Ingredients Journal of Japan*. 1996;167:69—85.

**Morales D, Piris AJ, Ruiz-Rodriguez A, Prodanov M, Soler-Rivas C.** Extraction of bioactive compounds against cardiovascular diseases from *Lentinula edodes* using a sequential extraction method. *Biotechnology Progress*. 2018;34(3):746—755.

**Morel S, Arnould S, Vitou M, Boudard F, Guzman C, Poucheret P, Fons F, Rapior S.** Antiproliferative and antioxidant activities of wild Boletales mushrooms from France. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018;20(1):13—29.

**Morse SS.** Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1995;1(1):7—15.

**Muanda FN.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, France. 2010. 294 p.

**Mujic I, Zekovic Z, Lepojevic Ž, Vidovic S, Živkovic J.** Antioxidant properties of selected edible mushroom species. *Journal of Central European Agriculture*. 2010;11(4):387—392.

**Muszyńska B, Grzywacz-Kisielewska A, Kala K, Gdula-Argasińska J.** Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 2018;243:373—381.

**Muszyńska B, Pazdur P, Lazur J, Sułkowska-Ziaja K.** *Lentinula edodes* (Shiitake) – biological activity. *Medicina internacia revuo*. 2017;27(3):189—195.

**Muta T.** Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1–3)- $\beta$ -D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12:4155—4161.

**Nathan C.** Points of control in inflammation. In *Nature*. 2002;420: 846—852.

**Newton K, Dixit VM.** Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(3) 19 pages, doi: 10.1101/cshperspect.a006049.

**Ngo R.** La mycothérapie, inspirée des savoirs ancestraux asiatiques, dans la pratique officinale française. Thèse de pharmacie, Université Montpellier 1, France, 2011. 191 p.

**Nishitani Y, Zhang L, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M.** Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: Influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*. 2013;8(4): e62441.

**Normand S.** Étude des profils cytokiniques et des mécanismes moléculaires induisant l'inflammation dans un modèle mimant les déficits en mévalonate kinase : un rôle central pour l'IL-1 et la caspase-1 dans les fièvres périodiques héréditaires. Thèse de doctorat, Université de Poitiers, 2009. 187 p.

**Oba K, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J.** Individual patient based meta-analysis of lentinane for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Research*. 2009;29(7):2739—2746.

**OMS. Organisation Mondiale de la Santé :** <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/r%C3%A9sistance-aux-antibiotiques>(consulté le 07/07/2018).

**Orliaguet G, Gall O, Benabess-Lambert F.** Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*. 2013;17(5):228—237.

**Ortega RM.** Importance of functional foods in the mediterranean diet. *Public Health Nutrition*. 2006;9(8A):1136—1140.

**Pacheco-Sánchez M, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ.** Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *European Journal of Pharmacology*. 2007;555(1):61—66.

**Pacheco-Sanchez M.** Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec. Thèse de Doctorat, Université Laval Québec, Canada, 2006. 119 p.

**Panicker VP, George S, Dhanush Krishna B.** Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;3(8):758—763.

**Paquet J.** Potentialités anti-inflammatoires de l'inhibition génomique et transcriptionnelle du TNF alpha par une approche de type oligonucléotidique. Thèse de doctorat, Université de Nancy, 2010. 265 p.

**Parola S, Chiodaroli L, Orlandi V, Vannini C, Panno L.** *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: functional food with antioxidant - antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. *Functional Foods in Health and Disease*. 2017;7(6):773—794.

**Parul R, Kundu SK, Saha P.** In vitro nitric oxide scavenging activity of methanol extracts of three Bangladeshi medicinal plants. *The pharma innovation*. 2013;1(12, Part A):83—88.

**Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J.** Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug discovery today*. 2017;22(1):186—193.

**Pauliuc I, Dorica B.** Antibacterial activity of *Pleurotus ostreatus* gemmotherapeutic extract. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 2013;17(1):242—245.

**Pavithra M, Sridhar KR, Greeshma AA, Tomita-Yokotani K.** Bioactive potential of the wild mushroom *Astraeus hygrometricus* in South-west India. *Mycology*. 2016;7(4):191—202.

**Pedneault K.** Etude de composés extractibles chez les champignons indigènes du Québec. Thèse de doctorat, Université de Laval, Canada, 2007. 219 p.

**Pengkumsri N, Sivamaruthi BS, Sirilun S, Peerajans, Kesika P, Chaiyasut K, Chaiyasut C.** Extraction of  $\beta$ -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and *in vivo* assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology Campinas*. 2017;37(1):124—130.

**Perez-Vizcaino F, Duarte J.** Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010;31(6):478—494.

**Phillips KM, Ruggio DM, Horst RL, Minor B, Simon RR, Feeney MJ, Byrdwell WC, Haytowitz DB.** Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:7841—7853.

**Piatte R.** Approche de la Médecine Traditionnelle Chinoise à travers l'étude de vingt-et-une drogues. Thèse de pharmacie, Université de Montpellier, France, 2016. 111 p.

**Politowicz J, Lech K, Lipan L, Figiel A, Carbonell-Barrachina AA.** Volatile composition and sensory profile of Shiitake mushrooms as affected by drying method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98:1511—1521.

**Poucheret P, Fons F, Rapior S.** Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. *Cryptogamie, Mycologie*. 2006;27(4):311—333.

**Pouyat Q.** La culture de shiitake sur billes de bois. Actes de la journée des innovations pour une alimentation durable, Montpellier, France, 2015. 17—24 p.

**Prior RL, Wu X, Schaich K.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:4290—4302.

**Priya JL, Srinivasan V.** Studies on the antibacterial activities of mushroom. *International Journal Current Microbiology Applied Sciences*. 2013;2(6):184—189.

**Przyłowicz P, Donoghue J.** Shiitake Grower's Handbook: The Art and Science of Mushroom Cultivation; Hunt Publ. Co.: Dubuque, Kendall, 1990. 199 p.

**Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA.** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*. 2006;72(11):1439—1452.

**Rahman MA, Abdullah N, Aminudin N.** *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom): An assessment of *in vitro* anti-atherosclerotic bio-functionality. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(8):1515—1523.

**Rahman T, Choudhury MBK.** Shiitake Mushroom: A tool of medicine. *Bangladesh Journal of Medical Biochemistry*. 2012;5(1):24—32.



**Ramirez C.** Manual and atlas of the penicillia. Amsterdam - New York -Oxford. Elsevier Biomédical press, 1982. 874 p.

**Ramirez-Anguiano AC, Santoyo S, Reglero G, Soler-Rivas C.** Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(12):2272—2278.

**Ramirez-Carrillo R, Leal-Lara H.** Culture conditions for increasing yields of *Lentinula edodes*. The 4th International conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, February20-23, Cuernavaca, Morelos, Mexico, 2002. 289—294 p.

**Rathore H. Prasad S, Sharma S.** Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition*. 2017;5(2):35—46.

**Regula J, Siwulski M.** Dried Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2007;6(4):135—142.

**Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR.** Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*. 2012a;50(2):191—197.

**Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira IC.** Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food and Chemical Toxicology*. 2012b;50(5):1201—1207.

**Revillard JP.** Immunologie. De Boeck Université, Bruxelles, Belgique, 2001. 595 p.

**Ricciotti E, Fitzgerald GA.** Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(5):986—1000.

**Roberts JS, Teichert A, Mchugh TH.** Vitamin D2 : Formation from postharvest UVB treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56:4541—4544.

**Rop O, Mlcek J, Jurikova T.** Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*. 2009;67(11):624—631.

**Roquilly A, Asehnoune K.** Corticoïdes et sepsis. *Anesthésie & Réanimation*. 2019;5(3):186—192.

**Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, Rotilio G.** Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*. 2008;33(12):2390—2400.

**Royse D.** A global perspective on the high five: *Agaricus, Pleurotus, Lentinula, Auricularia & Flammulina*. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*; November 19—22; Solan, India. 2014. 1—6 p.

**Rubartelli A, Lotze MT.** Inside, outside, upside down: damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunology*. 2007;28:429—436.

**Saintot C.** Place des basidiomycètes dans les pathologies respiratoires. Thèse de pharmacie, Université de Montpellier, France, 2017. XX p.

**Sajon SR, Sana S, Rana S, Rahman SM, Nishi ZM.** Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(1):464—475.

**Saluzzo JF, Vidal P, Gonzalez JP.** Les virus émergents. IRD Éditions Paris, France, 2004. 190 p.

**Sanchez C.** Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017;2:13—22.

**Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R.** Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry*. 2017;216:45—51.

**Sasidharan S, Aravindran S, Latha LY, Vijenthi R, Saravanan D, Amutha S.** *In vitro* antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Molecules*. 2010;15:4478—4489.

**Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M.** Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005a;81:215S—217S.

**Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005b;45:287—306.

**Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G.** Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(7):369—374.

**Shah P, Modi HA.** Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 2015;3(6):636—640.

**Shahidi F, Zhong Y.** Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:757—781.

**Shao S, Hernandez M, Kramer JKG, Rinker DL, Tsao R.** Ergosterol profiles, fatty Acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;(58):11616—11625.

**Sharma AK, Jana AM, Srivastav A, Gupta M, Sharma S, Gill SS.** Antimicrobial properties of some edible mushrooms: a review. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2014;3(5):1009—1023.

**Shimada Y, Morita T, Sugiyama K.** Eritadenine-induced alterations of plasma lipoprotein lipid concentrations and phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003;67:996—1006.

**Simon RR, Phillips KM, Horst RL, Munro IC.** Vitamin D mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) treated postharvest with UVB light or sunlight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(16):8724—8732.

**Singh HB, Adhikary RK, Sarma RK, Sarma TC, Rao PG.** Cultivation of shiitake mushroom-A potential agro-industry for hilly areas of north eastern India. *Natural Product Radiance*. 2008;7(1):74—78.

**Smolskaite L, Venskutonis PR, Talou T.** Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;60(1):462—471.

**Spicuzza L, Spicuzza A, La Rosa M, Polosa R, Di Maria G.** New and emerging infectious diseases. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2007;28(1):28—34.

- Stadler M, Pacini G, Petrie J, Luger A, Anderwald C, Investigators RISC.** Beta cell (dys) function in non-diabetic offspring of diabetic patients. *Diabetologia*. 2009;52(11):2435—2444.
- Sterka DJ, Marriott I.** Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *Journal Neuroimmunology*. 2006;179:65—75.
- Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography*. 2002;967:85—113.
- Sugiyama K, Akachi T, Yamakawa A.** Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid-metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1995;6(2):80—87.
- Sugiyama K, Yamakawa A, Kawagishi H, Saeki S.** Dietary eritadenine modifies plasma phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed different types of fat. *Journal of Nutrition*. 1997;127:593—599.
- Suryavanshi SV, Kulkarni YA.** NF- $\kappa$ B: A potential target in the management of vascular complications of diabetes. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:798. p 12.
- Suzuki S, Ohshima S.** Influence of *L. edodes* on human serum cholesterol. *Mushroom Science*. 1976;9(1):463—467.
- Tabata T, Tomioka K, Iwasaka Y, Shinohara H, Ogura T.** Comparison of chemical compositions of shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) cultivated on logs and sawdust substrate. *Food Science and Technology Research*. 2006;12(4):252—255.
- Taithe C.** Le lentin du chêne, de sa culture à ses propriétés surprenantes. Thèse de pharmacie, Université de Poitiers, France, 2016. 95 p.
- Tak PP, Firestein GS.** NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(1):7—11.
- Takeuchi K, Amagase K.** Roles of prostaglandin E and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Archives of Digestive Disorders*. 2017;1(2):8-16.

**Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP.** Nutrients and oxidative stress: friend or foe?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;Volume 2018, Article ID 9719584, 24 pages.

**Taofiq O, Martins A, Barreiro MF, Ferreira ICFR.** Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated Metabolites. Review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;50:193–210.

**Therouanne-Allard H.** *Grifola frondosa* (Maitake) et *Lentinula edodes* (Shiitake) : deux champignons aux activités biologiques prometteuses. Thèse de pharmacie. Université de Montpellier 1, France, 2002. 86 p.

**Tian Y, Zhao Y, Huang J, Zeng H, Zheng B.** Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms. *Food Chemistry*. 2016;197:714–722.

**Ting, H.G.** New technology on high speed and high yield cultivation of shiitake. Beijing, China: Golden Shield Press, 1994. 247 p.

**Tome D.** Besoins en protéines et en acides aminés & qualité des protéines alimentaires. *Cholédoc*, N° 11. 2009.

**United States International Trade Commission (USITC).** Mushrooms industry & trade summary. Office of Industries Publication ITS-07, Washington, USA, 2010. 70 p.

**USDA National Nutrient Database;** Basic Report 11238, Mushrooms shiitake raw. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169242/nutrients>. Consulté le 11 octobre 2019.

**USDA National Nutrient Database ;** Basic Report 11268, Mushrooms shiitake dried. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/query=Shiitake>: consulté le 11 octobre 2019.

**Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;266(1-2):37—56.

**Valverde ME, Hernandez-Perez T, Paredes-Lopez O.** Edible Mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*. 2015;7:1—14.

**Vaz JA, Barros L, Martins A, Morais JS, Vasconcelos MH, Ferreira IC.** Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*. 2011;44(1):343—6.

**Vitanyi G, Lelik L, Bihatsi-Karsai E, Lefler J, Nagy-Gasztonyi M, Vereczkey G.** Detection of eritadenine in extracts from shiitake mushroom by gas chromatography mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1998;12:120—122.

**Vitrac V, Reignier A, Henry-Vitrac C, Minvielle N, Mérillon JM, Savoie JM.** Changes in antioxidant activities and compounds during cultivation of Shiitake (*Lentinula edodes*). *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*; October 4—5; Arcachon, France. 2011. 247—253 p.

**Vujovic D, Pejin B, Popovic-Djordjevic J, Velickovic M, Tesevic V.** Phenolic natural products of the wines obtained from three new Merlot clone candidates. *Natural Products Research*. 2015;30(8):987—990.

**Wang J, Li W, Huang X, Liu Y, Li Q, Zheng Z, Wang K.** A polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits human colon cancer cell proliferation and suppresses tumor growth in athymic nude mice. *Oncotarget*. 2017;8(1):610—623.

**Wasser SP, Weis AL.** Medicinal Mushrooms. *Lentinus edodes* (Berk.) Singer; Nevo, E., Ed. Peledfus Publ. House: Haifa, Israel; 1997. 95 p.

**Wasser SP.** Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;60(3):258—274.

**White RW, Hackman RM, Soares SE, Beckett LA, Sun B.** Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*. 2002;60(4):640—644.

**Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D.** The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.

**Woldegiorgis AZ, Abate D, Haki GD, Ziegler GR.** Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food chemistry*. 2014;157:30—36

**Wu CH, Wu CC, Ho YS.** Antitumor activity of combination treatment of *Lentinus edodes* mycelium extracts with 5-Fluorouracil against human colon cancer Cells Xenografted in Nude Mice. *Journal of Cancer Molecules*. 2007;3(1):15—22.

**Wu CM, Wang Z.** Volatile compounds in fresh and processed Shiitake mushrooms (*Lentinus edodes* Sing.). *Food Science and Technology Research*. 2000;6:166—170.

**Xu X, Yasuda M, Nakamura-Tsuruta S, Mizuno M, Ashida H.**  $\beta$ -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(2):871—878.

**Ya G.** A *Lentinus edodes* polysaccharide induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;103:676—682.

**Yahaya NFM, Rahman MA, Abdullah N.** Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating hypertension. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;39:104—115.

**Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C.** The Immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 2018;10(11). pii: E1618. doi: 10.3390/nu10111618.

**Yang BK, Kim DH, Jeong SC, Das S, Choi YS, Shin JS, Lee SC, Song CH.** Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002;66(5):937—942.

**Yang H, Hwang I, Kim S, Hong EJ, Jeung EB.** *Lentinus edodes* promotes fat removal in hypercholesterolemic mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;6(6):1409—1413.

**Yap AT.** Immunopotentiating properties of lentinan (1-3)- $\beta$ -D-glucan extracted from culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2003;5(4):352—372.

**Yildiz O, Can Z, Laghari AQ, Sahin H, Malkoç M.** Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*. 2015;39:148—154.

**Yılmaz A, Yıldız S, Kılıç C, Can Z.** Total phenolics, flavonoids, tannin contents and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* cultivated on different wastes and sawdust. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2016;4(1).

**Yin Y, Fu W, Fu M, He G, Traore L.** The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007;16:258.

**Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H.** *Icones of Medicinal Fungi from China*. Science Press, Beijing, China, 1987. 249 p.

**Yoshida H, Sugahara T, Hayashi J.** Changes in the organic acids contents in fruit-bodies of shiitake-mushrooms [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] during post-harvest storage. *Journal of the Japanese Society for Cold Preservation of Food*. 1987;13(4):126—132.

**Yoshino S, Nishikawa K, Morita S, Takahashi T, Sakata K, Nagao J, Nemoto H, Murakami N, Matsuda T, Hasegawa H, Shimizu R, Yoshikawa T, Osanai H, Imano M, Naitoh H, Tanaka A, Tajiri T, Gochi A, Suzuki M, Sakamoto J, Saji S, Oka M.** Randomized phase III study of S-1 alone versus S-1 plus lentinan for unresectable or recurrent gastric cancer (JFMC36-0701). *European Journal of Cancer*. 2016;65:164—171.

**You RX, Liu JY, Li SJ, Wang L, Wang KP, Zhang Y.** Alkali-soluble polysaccharides isolated from *Lentinus edodes*, induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in H22 cells through microtubule depolymerization. *Phytotherapy Research*. 2014;28(12):1837—1845.

**Yu R, Tan TH, Kong AN.** Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:28962—28970.

**Yu S, Wu X, Ferguson M, Simmen RCM, Cleves MA, Simmen FA, Fang N.** Diets containing shiitake mushroom reduce serum lipids and serum lipophilic antioxidant capacity in rats. *The Journal of Nutrition*. 2016;146:2491—2496.

**Zhang JJ, Li Y, Zhou T, Xu DP, Zhang P, Li S, Li HB.** Bioactivities and health benefits of mushrooms mainly from china. *Molecules*. 2016;21(7):1—16. <https://doi.org/10.3390/molecules21070938>.

**Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Bartlett J, Shanmugam K, Münch G, Wu MJ.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(23):12361—12367.



**Zhang N, Chen H, Zhang Y, Ma L, Xu X.** Comparative studies on chemical parameters and antioxidant properties of stipes and caps of shiitake mushroom as affected by different drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(12):3107—3113.

**Zhang Z, Lv G, Pan H, Wu Y, Fan L.** Effects of different drying methods and extraction condition on antioxidant properties of Shiitake (*Lentinus edodes*). *Food Science and Technology Research*. 2009;15(5):547—552.

**Zhong M, Liu B, Liu L, Wang X, Li X, Liu L, Ning A, Cao J, Huang M.** The antitumor activities of *Lentinula edodes* C91-3 mycelia fermentation protein on S180 (Mouse sarcoma cell) *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(12):2488—2492.

**Zucker WV.** Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *The American Naturalist*. 1983;121(3):335—365.

## Annexes

### Annexe 1: Article 1

#### **Antioxydant and Anti-inflammatory Potential of *Lentinula edodes* (Shiitake) Sporophores from Various Culture Conditions.**

Ibrahima Diallo,<sup>a,b,c</sup> Frédéric Boudard,<sup>d</sup> Sylvie Morel,<sup>b</sup> Manon Vitou,<sup>b</sup> Caroline Guzman,<sup>d</sup> Nathalie Saint,<sup>e</sup> Alain Michel,<sup>a</sup> Sylvie Rapior,<sup>b</sup> Lonsény Traoré,<sup>c</sup> Patrick Poucheret,<sup>a,+</sup> & Françoise Fons<sup>b,\*,+</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, Faculté de Pharmacie, UMR 95 Qualisud CIRAD Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France; <sup>b</sup>Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE – IRD, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique de l'Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, BP : 1147, Conakry, Guinée; <sup>d</sup>Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Pharmacie, UMR 95 Qualisud CIRAD Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France; <sup>e</sup>PHYMEDEXP, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, 34090 Montpellier, France

#### **Short Title: Biological Activities of Cultivated Shiitake**

\*Address all correspondence to: Françoise Fons, Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, CEFE UMR 5175 CNRS Université de Montpellier Université Paul-Valéry Montpellier EPHE, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex, France 5; Tel. : 33 (0) 4 11 75 96 60, Email: [francoise.fons@umontpellier.fr](mailto:francoise.fons@umontpellier.fr)

<sup>+</sup> Both authors equally contributed to this work

**ABSTRACT:** *Lentinula edodes* is an edible mushroom grown and marketed for centuries due to its nutritional and medicinal properties. Shiitake has multiple pharmacological activities as antioxidant and anti-inflammatory. Few studies were performed taking into account the influence of culture conditions to optimize the biological properties of Shiitake mushroom on human health. Our work focused on the comparison of antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of Shiitake fruit bodies cultivated by three mushroom producers in the French Occitanie region using the same strain in various growing conditions (organic and non-organic). Sequential extraction was performed on freeze dried fungal materials. All extracts have a quantifiable but moderate antioxidant activity using the DPPH and ORAC tests. The anti-inflammatory activity of the ethanol and aqueous extracts was evaluated on a model of inflammatory macrophages. The ethanol extracts inhibit NO production in a dose-dependent manner when the cells are pre-treated for 4 h with a 24 h stimulation time.

**KEY WORDS:** anti-inflammatory, antioxidant, DPPH, food health benefit, J774.A1 macrophages, medicinal mushroom, nitric oxide, ORAC, pharmacology.

## Annexe 2 : Communication orale

**Titre :** Potentiel antioxydant de *Lentinula edodes* (Shiitake) issu de différents modes de culture

Ibrahima DIALLO<sup>1,2,3\*</sup>, Sylvie MOREL<sup>1</sup>, Manon VITOU<sup>1</sup>, Sylvie RAPIOR<sup>1</sup> Patrick  
POUCHERET<sup>2</sup>, Françoise FONS<sup>1</sup>

1. *Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 (CEFE), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France ; [\\*mougnal13@gmail.com](mailto:*mougnal13@gmail.com); [sylvie.morel@umontpellier.fr](mailto:sylvie.morel@umontpellier.fr), [sylvie.rapior@umontpellier.fr](mailto:sylvie.rapior@umontpellier.fr), [francoise.fons@umontpellier.fr](mailto:francoise.fons@umontpellier.fr)*
2. *Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR 95 (Qualisud), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France ; [patrick.poucheret@umontpellier.fr](mailto:patrick.poucheret@umontpellier.fr),*
3. *Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique ; Université Gamal Abdel Nasser de Conakry. BP : 1147 Conakry-Guinée ; [louncenytraore8@gmail.com](mailto:louncenytraore8@gmail.com)*

**Mots clés :** Antioxydante, Shiitake, DPPH, ORAC, Polyphénols

### Résumé

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler est un champignon comestible cultivé et commercialisé comme complément alimentaire en raison de ses propriétés nutritionnelles et médicinales [1]. Ce champignon fait l'objet d'une culture intensive en Asie, aux Etats-Unis mais aussi en Europe. Très apprécié pour son goût parfumé, il est vendu frais ou sec sous le nom de Lentin du chêne ou Shiitake [2]. Le Shiitake aurait de multiples propriétés pharmacologiques. De nombreux programmes de recherche sont menés sur les activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, hypoglycémiques, anticancéreuses [1]. Mais peu d'études ont été effectuées en tenant compte de l'influence des conditions de culture sur les propriétés antioxydantes. Nous présentons les résultats de travaux menés sur le potentiel antioxydant des sporophores de Shiitake issus d'une même souche mais produits selon différents modes de culture. Une extraction séquentielle a été réalisée par quatre solvants de polarité croissante (cyclohexane, chloroforme, éthanol et eau ; [3]) sur des champignons cultivés par trois producteurs (A, B et C) de la région Occitanie (France). La capacité antioxydante de chaque extrait a été évaluée par les tests diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH) et Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) [3, 4]. La teneur en composés phénoliques totaux (TCP) a été dosée par le réactif de Folin Ciocalteu (FC). Les résultats montrent que tous les extraits présentent une activité antioxydante quantifiable mais modérée.

### Références

1. Poucheret P. *et al.* (2006). Biological and pharmacological activity of Higher Fungi: 20-year retrospective analysis. *Cryptogamie, Mycologie*, 27 (4): 311-333.
2. Zhang N. *et al.* (2013). Comparative studies on chemical parameters and antioxidant properties of stipes and caps of Shiitake mushroom as affected by different drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (12): 3107-3113.
3. Morel S. *et al.* (2012). Preparative isolation, fast centrifugal partition chromatography purification and biological activity of cajaflavanone from *Derris ferruginea* stems. *Phytochemical Analysis*, 23 (2) : 152-158.
4. Morel S. *et al.* (2018). Antiproliferative and antioxidant activities of wild Boletales mushrooms from France. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20 (1): 13-29.

## Annexe 3 : Poster 1



[www.iceps.eu](http://www.iceps.eu)

Title: *Lentinula edodes* (Shiitake), an edible, nutritional and medicinal mushroom: health benefits and risks

Ibrahima DIALLO<sup>1,2,3</sup>, Alain MICHEL<sup>2</sup>, Patrick POUCHERET<sup>2</sup>, Sylvie MOREL<sup>1</sup>, Manon VITOU<sup>1</sup>,  
Loucény TRAORE<sup>3</sup>, Sylvie RAPIOR<sup>1</sup>, Françoise FONS<sup>1\*</sup>.

1 *Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 (CEFE), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France ; [ibrahima.diallo03@etu-umontpellier.fr](mailto:ibrahima.diallo03@etu-umontpellier.fr), [sylvie.rapior@umontpellier.fr](mailto:sylvie.rapior@umontpellier.fr),*

*\*[francoise.fons@umontpellier.fr](mailto:francoise.fons@umontpellier.fr)*

2 *Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR 95 (Qualisud), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5 ; [patrick.poucheret@umontpellier.fr](mailto:patrick.poucheret@umontpellier.fr), [alain.michel@umontpellier.fr](mailto:alain.michel@umontpellier.fr)*

3 *Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique; Université Gamal Abdel Nasser de Conakry. BP : 1147 Conakry-Guinée ; [loucenytraore8@gmail.com](mailto:loucenytraore8@gmail.com)*

**Key words:** Shiitake, Food nutrition, Medicinal mushroom, Food supplement, Dermatitis

### Abstract:

**Rationale:** *Lentinula edodes* (Shiitake) is an edible medicinal mushroom worldwide cultivated for nutritional compounds and pharmacological properties [1, 2]. It is well-known in Traditional Asian Medicine and marketed as food supplements. Lots of investigations are carried out on its significant therapeutic potential [3, 4]. Secondary effects were recently highlighted when consumed raw or poorly cooked [5].

**Method:** Shiitake was investigated for nutritional interest and pharmacological properties as potential agent in the metabolic syndrome, cancer treatment as well as antimicrobial natural drug. The various secondary effects mentioned by the hospitals were( listed and) analyzed.

**Results:** The consumption of Shiitake contributed to the intake of fibers, proteins, polysaccharides, fatty acids, vitamins (groups B, C, D, E) and minerals of great interest for health. Antioxidant and anti-inflammatory properties take part in prevention of the metabolic syndrome. Certain bioactive polysaccharides could be responsible for the secondary effects due to an immunological mechanism notably for dermatological infections, i.e., Shiitake flagellate dermatitis.

**Discussion:** Fresh or dried Shiitake is appreciated for its scented taste of various home cooking. However the nutritional composition and bioactive molecule content depend on the culture, storage and packing conditions of the fungal material [2].

**Conclusion:** Shiitake is eaten around the world as food and medicinal drug for health care benefits. Several ongoing research projects are carried out to prove different biological activities

of the medicinal mushroom. The DGCCRF and JORF recommend to high cook the Shiitake mushroom for its consumption, based on the increase of clinical cases when poorly cooked [6].

1. Finimundy TC, Henriques JA, Dillon AJ, *et al.* (2014) A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1095-1105. doi: 10.4236/fns.2014.512119.
2. Ning Zhang, Haixia Chen, Yu Zhang, *et al.* (2013) Comparative studies on chemical parameters and antioxidant properties of stipes and caps of shiitake mushroom as affected by different drying methods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (12), 3107–3113.
3. Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, *et al.* (2010) *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities, 17, 2419-2430.
4. Kozarski M, Klaus A, Niksic M, *et al.* (2012) Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*, *Journal of Food Composition and analysis*, 26, 144-153.
5. Boels D, Landreau A, Bruneau C, *et al.* (2014) Shiitake dermatitis recorded by French Poison Control Centers - new case series with clinical observations. *Clinical Toxicology*, 52 (6), 625–628.
6. *Journal officiel de la République Française (18 août 2016) Arrêté du 5 août 2016 relatif à la suspension de la mise sur les marché des champignons des espèces *Suillus granulatus*, *Russula olivacea*, *Armillaria mellea* et *Lentinula edodes*. JORF n°0191 du 18 août 2016 Texte n° 16 ELI: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/8/5/EINC1622686A/jo/texte>*

## NUTRITIONAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *LENTINULA EDODES* (SHIITAKE) FROM VARIOUS CULTURE CONDITIONS

**I. Diallo<sup>1,2,3</sup>, A. Michel<sup>2</sup>, P. Poucheret<sup>2</sup>, S. Morel<sup>1</sup>, M. Vitou<sup>1</sup>, L. Traoré<sup>3</sup>, S. Rapior<sup>1</sup>, F. Fons<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFE, [Ibrahimia.diallo03@etu.umontpellier.fr](mailto:Ibrahimia.diallo03@etu.umontpellier.fr); [sylvie.morel@umontpellier.fr](mailto:sylvie.morel@umontpellier.fr); [francoise.fons@umontpellier.fr](mailto:francoise.fons@umontpellier.fr)  
<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR 95 QuaIsud; [alain.michel@umontpellier.fr](mailto:alain.michel@umontpellier.fr); [patrick.poucheret@umontpellier.fr](mailto:patrick.poucheret@umontpellier.fr)  
<sup>3</sup> UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France  
<sup>3</sup> Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, BP : 1147 Conakry-Guinée; [lounceytraore@gmail.com](mailto:lounceytraore@gmail.com)

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) is popular in Asia due to its medicinal properties, taste and high nutritional value. It is the second most widely cultivated mushrooms species in the world. Annual production is estimated of 900.000 tons worldwide distributed. This mushroom has been cultivated in Asia since the 13th century. Cultivation has now expanded worldwide, i.e., in United State, South America, Australia and European countries including France. Shiitake was generally cultivated on logs, but to steep up production, blocks or bags are now used in Europe and America [1]. Shiitake is reported to have multiple bioactivities. Few studies concern the influence of cultivation conditions on chemical composition and biological activities. We presented here preliminary results of antioxidant properties of Shiitake sporophores harvested from different culture conditions.

### Nutritional value

Shiitake is a valuable nutritional source of proteins, fibers, vitamins (D, B5, B2, B3, B6, B9), minerals and trace elements (Cu, Zn, K, P, Mg, Mn) significant for health [1, 2, 3]. Although its content of native Selenium (Se) remains anecdotal (0.016 - 0.093 mg / 100 g dry weight) [4-5], special culture conditions make it an attractive source of Se [6 à vérifier].

### Therapeutic potential

Many research programmes are carried out on Shiitake biological activities, i.e., anti-microbial, anti-oxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, anti-cancer, hypocholesterolemic, immunostimulating [2-9]. Bioactive compounds of different natures have been isolated as sterols, lipids, polysaccharides, phenolic compounds and terpenoids; indeed the fungus chemical content can be affected by the cultivation, conservation, drying and conditioning conditions [2].

### Experimental procedure

Shiitake sporophores from the same strain were produced and harvested by three French producers. Shiitake were freeze dried and grounded. Sequential extraction with increasing polarity solvents (cyclohexane, chloroform, ethanol, water) were performed in order to extract both nonpolar and polar compounds (90 minutes under sonication). The four extracts obtained per producer were evaluated for antioxidant capacity (DPPH, Folin-Ciocalteu reagent) in 96-well plates.

Sequential extraction: sonication, 90 minutes, < 30°C, then filtration and concentration under reduced pressure

### Antioxidant capacity of Shiitake extracts from various culture conditions

Figure 1: DPPH assay on extracts from three producers. Figure 2: Folin-Ciocalteu (FC) assay on extracts from three producers. Data are presented as the mean ± standard deviation. Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

### Discussion

Shiitake extracts obtained from three producers were evaluated for antioxidant capacity on DPPH assay (Figure 1). Chloroformic and ethanolic extracts of Shiitake from producer A have the highest value on DPPH assay. The extracts were also evaluated on Folin-Ciocalteu assay, which is well known as Total Phenolic Content (TPC). The values obtained on FC assay were not link with DPPH values (Figures 1 and 2). The highest values on FC assay were obtained for cyclohexanic extract from producer A and from the aqueous extract from producer B.

These preliminary results indicate differences between the extracts obtained from different French producer. Other bioassays are in progress. Further analytical chemical analyses will be performed in order to compare the chemical profiles of the extracts and identify the chemical compounds content varying according to the culture conditions.

## Annexe 5 : Poster 3

# Le Shiitake (*Lentinula edodes*) : Intérêt nutritionnel, Potentiel Thérapeutique et Risques



I. Diallo<sup>1,2,3</sup>, A. Michel<sup>2</sup>, P. Poucheret<sup>2</sup>, S. Morel<sup>1</sup>, M. Vitou<sup>1</sup>, L. Traoré<sup>3</sup>, S. Rapior<sup>1</sup>, F. Fons<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFE, [ibrahima.diallo@etu.umontpellier.fr](mailto:ibrahima.diallo@etu.umontpellier.fr); [françoise.fons@umontpellier.fr](mailto:françoise.fons@umontpellier.fr)

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR 95 Qualisud; [alain.michel@umontpellier.fr](mailto:alain.michel@umontpellier.fr); [patrick.pouchere@umontpellier.fr](mailto:patrick.pouchere@umontpellier.fr)  
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique; Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, BP : 1147 Conakry-Guinée; [louncenytraore@gmail.com](mailto:louncenytraore@gmail.com)



*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake), deuxième champignon comestible le plus cultivé au monde et connu aussi sous le nom de Lentin du chêne, présente un apport nutritionnel très intéressant. Il possède également un potentiel thérapeutique valorisé en Asie faisant l'objet de nombreuses études scientifiques dans le monde entier. Cependant, des effets secondaires ont été décrits ces dernières années. Ce poster présente les différents aspects liés à sa consommation.

### Composition nutritionnelle du Shiitake D'après l'ANSES : Table Ciqual 2016 [1]

Pour 100 gr	Lentin séché	Lentin cuit
Energie	316 kcal	60,9 kcal
Eau	9,50 g	83,5 g
Protéines	9,58 g	1,56 g
Lipides	0,99 g	0,22 g
Glucides	63,90 g	12,30 g
Fibres	11,5 g	2,1 g
Sucres	2,21 g	3,84 g
Cendres	4,56 g	0,35 g
Fer	1,72 mg	0,44 mg
Sodium	13 mg	4 mg
Potassium	1530 mg	117 mg
Magnésium	132 mg	14 mg
Calcium	11 mg	3 mg
Vitamine D	3,9 µg	0,7 µg
Vitamine B2	1,27	0,17
Vitamine B3	14,1	1,5
Vitamine B5	21,9	3,59
Zinc	7,66	1,33
Cuivre	5,17 mg	0,9 mg
Phosphore	294 mg	29 mg
Manganèse	1,18 mg	0,2 mg
Vit B6	0,97 mg	0,16 mg
Vit B9	163 µg	21 µg
Vit C	3,5 mg	0,3 mg



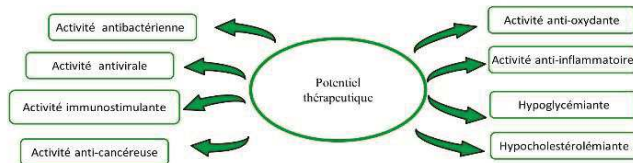
*Lentinula edodes*  
Crédit photo : F. Fons

### Aspect nutritionnel

Apprécié sur le plan gustatif, le Shiitake constitue un apport nutritif intéressant (voir tableau) en protéines, fibres, vitamines (D, B5, B2, B3, B6, B9), minéraux et oligo-éléments (Cu, Zn, K, P, Mg, Mn) importants pour la santé [1, 2, 3]. Même si ses teneurs en Sélénium (Se) natif restent anecdotiques (0,016 - 0,093 mg/100 g de poids sec) [4-5], des conditions particulières de culture permettent d'en faire une source intéressante de Se [6].

### Fort potentiel thérapeutique

Le Shiitake fait l'objet de projets de recherches concernant de nombreuses activités biologiques (anti-microbienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire, hypoglycémiant, anti-cancéreuse, hypocholestérolémiante, immunostimulante [2-9]). Des molécules actives de différentes natures ont été isolées (stérols, lipides, polysaccharides, composés phénoliques, terpénoïdes...) mais leur teneur dans le champignon peuvent être affectées par ses conditions de culture, de conservation, de séchage et de conditionnement [2].



### β-Glucanes et immunité

Parmi les molécules actives, le lentinane (β-Glucane) est un polysaccharide immunomodulateur [3] augmentant la production par les monocytes d'IL-1 et l'expression des cytokines (TNF-α, IFN-δ), activant les macrophages et les divers Lymphocytes T. Il présenterait donc différentes activités biologiques sous la dépendance de l'immunité. Il pourrait aussi être responsable d'effets secondaires d'origine allergique.

### Effets secondaires dermatologiques et allergiques

La consommation du Shiitake à l'état cru ou insuffisamment cuit, et quel que soit le mode de présentation (frais, séché puis réhydraté dans l'eau, poudre ou infusion), peut engendrer des dermatites toxiques dites flagellaires.

Ces atteintes cutanées sont caractérisées par une éruption de petites lésions extrêmement prurigineuses sur l'ensemble du corps [10, 11]. La DGCCRF recommande donc de ne pas consommer ce champignon sans l'avoir préalablement fait cuire suffisamment qu'il soit acheté frais, séché ou en poudre [12].

[1] <https://pro.anses.fr/TablesCiqual/index.htm>

[2] Zhang N., Chen H., Zhang Y. et al. (2013). Comparative studies on chemical parameters and antioxidant properties of stipes and caps of shiitake mushroom as affected by different drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (12), 3107-3113.

[3] Finimundy T.C., Henriques J.A. et Dillon A.J. (2014). A Review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1095-1105.

[4] Costa-Silva F., Marques G., Matos C.C. et al. (2011). Selenium contents of Portuguese commercial and wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 126, 91-96.

[5] Falandysz J. (2008). Selenium in Edible Mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26 (3), 256-299.

[6] Nunes R.G., da Luz J.M., Freitas R. de B. et al. (2012). Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element. *Journal of Food Science*, 77 (9), 983-986.

[7] Bisen P.S., Baghel R.K., Sanodiya B.S. et al. (2010). *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2419-2430.

[8] Kozarski M., Klaus A., Niksic M. et al. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 144-153.

[9] Dai X., Rowe C. A., Nieves et al. (2015). Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) mushrooms daily improves human immunity: A randomized dietary intervention in healthy young adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 34 (6), 1-10.

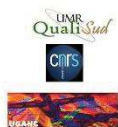
[10] Boels D., Landreau A., Brunreau C. et al. (2014). Shiitake dermatitis recorded by French Poison Control Centers - new case series with clinical observations. *Clinical Toxicology*, 52 (6), 625-628.

[11] Stophary M.P., Chung S., Handler M.Z. et al. (2016). Shiitake Mushroom Dermatitis: A Review. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17 (5), 485-489.

[12] Journal officiel de la République Française (18 août 2016). Arrêté du 5 août 2016 relatif à la suspension de la mise sur le marché des champignons des espèces *Suillus granulatus*, *Russula olivacea*, *Armillaria mellea* et *Lentinula edodes*.



## **Lentinula edodes (Shiitake) et cancer : Propriétés pharmacologiques, Essais cliniques et Preuves d'efficacité**



**I. Diallo<sup>1,2,3</sup>, A. Michel<sup>2</sup>, P. Poucheret<sup>2</sup>, S. Morel<sup>1</sup>, M. Vitou<sup>1</sup>, L. Traoré<sup>3</sup>, S. Rapior<sup>1</sup>, F. Fons<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFE ; [ibrahima.diallo3@etu.umontpellier.fr](mailto:ibrahima.diallo3@etu.umontpellier.fr) ; [francoise.fons@umontpellier.fr](mailto:francoise.fons@umontpellier.fr)

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentale, UMR 95 Qualisud ; [alain.michel@umontpellier.fr](mailto:alain.michel@umontpellier.fr) ; [patrick.poucheret@umontpellier.fr](mailto:patrick.poucheret@umontpellier.fr)

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Technologie Alimentaire du Département de Génie Chimique, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, BP : 1147 Conakry-Guinée ; [louencytraore8@gmail.com](mailto:louencytraore8@gmail.com)

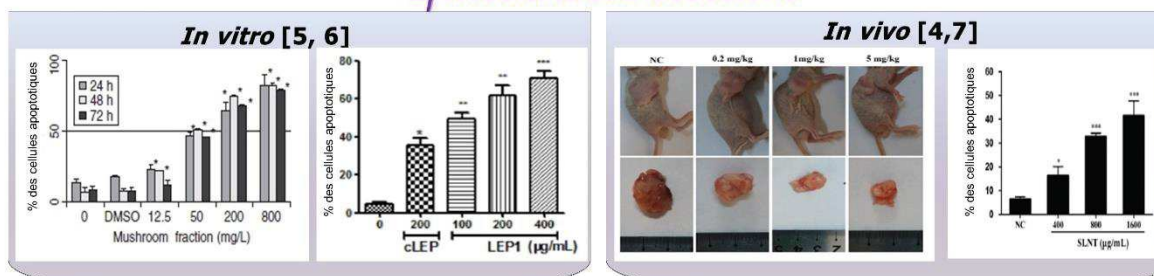


### 1) Introduction

Le Shiitake est un champignon comestible et largement cultivé en Chine, en Europe et dans d'autres pays de l'Asie de l'Est en raison de ses propriétés nutritionnelles et pharmacologiques [1]. Les recherches effectuées ces dernières années montrent que le *Lentinula edodes* possède des activités biologiques : antioxydant, anti-inflammatoire [2]. Ses polysaccharides comme le lentinane agit efficacement contre le cancer [3]. Son utilisation améliore la qualité de vie et les paramètres immunitaires des patients atteints du cancer [4].



### 2) Résultats et Discussions



Concentration de l'extrait (mg/kg)	Poids final de la tumeur (en g)	Taux d'inhibition (%)
<b>Contrôle Négatif</b>	1.0.27	-
<b>0.2</b>	0.83 ±0.17	17.88
<b>1.0</b>	0.60 ±0.13	48.87
<b>5.0</b>	0.42 ±0.15	57.90
<b>5-FU (20)</b>	0.33 ±0.10	67.23

- Les résultats *in vivo* montrent que l'ingestion du polysaccharide issu du mycélium de Shiitake (LEM) améliore la qualité de vie des patientes atteintes d'un cancer de sein.
- L'ingestion de LEM contribue aussi à l'amélioration des fonctions immunitaires chez les patientes atteintes d'un cancer de sein.

### 3) Conclusion et Perspectives

Bien que les polysaccharides (lentinane) du Shiitake possèdent une action anti-tumorale sur la plupart des cancers étudiés, il existe une controverse totale sur son mode d'action (mécanisme biologique). Pour certains auteurs, le lentinane ne provoquerait pas une attaque directe des cellules cancéreuses, mais il stimulerait le système immunitaire de l'hôte [8]. Pour d'autres, le lentinane exerce ses effets anti-tumoraux de façon directe contre les cellules cancéreuses ce qui conduit à la suppression de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose [6, 7]. Le Shiitake est un véritable potentialisateur cellulaire permettant la production d'un grand nombre de cytokines [9]. Il pourrait donc être un traitement adjuvant dans le cadre de la lutte contre le cancer.

[1] Poucheret P. et al. (2006). Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20-Year Retrospective Analysis. *Cryptogamie, Mycologie*, 27 (4) : 311-333.

[2] Diallo I. et al. (2017). Nutritional and antioxidant properties of *Lentinula edodes* (shiitake) from various culture conditions. *Séne Symposium International AFERP*. DOI: 10.13140/RG.2.2.14584.34566.

[3] Zheng R. et al. (2005). Characterization and Immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinula edodes*. *International Immunopharmacology*, 5 (5) : 811-820.

[4] Suzuki N. et al. (2013). Efficacy of Oral Administration of *Lentinula edodes* Mycelia Extract for Breast Cancer Patients Undergoing Postoperative Hormone Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14 (6) : 3469-3472.

[5] Fang N. et al. (2006). Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Human Cancer Cell Lines by an Ethyl Acetate Fraction from Shiitake Mushrooms. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12 (2) : 125-132.

[6] Ya G. (2017). A *Lentinula edodes* polysaccharide induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103 (10) : 676-682.

[7] Wang J. et al. (2016). A polysaccharide from *Lentinula edodes* inhibits human colon cancer cell proliferation and suppresses tumor growth in athymic nude mice. *Oncotarget*, 8 (1) : 610-623.

[8] Bisen P.S., Baghel R.K., Sanodiya B.S. et al. (2010). *Lentinula edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2419-2430.

[9] You R.X. et al. (2014). Alkali-soluble polysaccharides isolated from *Lentinula edodes*, induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in H22 cells through microtubule depolymerization. *Phytotherapy Research*, 28 (12) : 1837-1845.